

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**İÇ ANADOLU YÖRESİNDE SIĞIR COCCIDIOSIS'İNE YOL AÇAN
PATOJEN *EIMERIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE TEŞHİSTE TÜRE ÖZGÜ REAL TIME PCR
TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Proje No: TDA-2014-5151

Proje Türü
Kurum Dışı Destekli Araştırmalar İçin İhtiyaç Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Aralık 2015
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar bu çalışmaya TDA-2014-5151 kodlu proje ile finansman desteği veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

İÇİNDEKİLER

KAPAK	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	1
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	2
2.1 Sığırlarda <i>Eimer</i> a Türlerinin Taksonomi ve Morfolojisi	2
2.2 Sığırlarda <i>Eimer</i> a Türlerinin Biyoloji ve Epidemiyolojisi	3
2.2.1 Coccidiosis'in Türkiye'deki Yayılışı.....	7
2.2.2 Coccidiosis'in Dünyadaki Yayılışı	9
2.3 Sığır Coccidiosis'inde Klinik ve Patogenez.....	9
2.4 Sığır Coccidiosis'inde Tanı.....	13
2.4.1 Konvansiyonel Morfolojik Tanı	13
2.4.2 Serolojik Tanı	14
2.4.3 Ayırıcı Tanı.....	15
2.5 Konak-Parazit İlişkilerinde Evrimleşme Süreci ve Popülasyon Yapısı.....	15
2.6 Moleküler Çalışmalarda Coccidia Etkenlerinin Model Organizmler Olarak Kullanımı	16
2.6.1 Coccidian Parazitlerin Taksonomisi, Evrimi ve Filogenileri	16
2.7 Sığır <i>Eimeria</i> Türleri Üzerine Moleküler ve Filogenetik Çalışmalar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Saha Çalışmaları	20

3.1.1	Araştırma Sahası ve Dışkı Örneklerinin Toplanması	20
3.2	Laboratuvar Çalışmaları.....	21
3.2.1	Konvansiyonel Dışkı Muayenesi.....	21
3.2.2	Gram Dışkıdaki Ookist Sayısının (OPG) Belirlenmesi.....	21
3.2.3	<i>Eimeria</i> Ookistlerinin Sporlandırılması ve Tür Teşhisleri	22
3.2.4	Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	22
3.2.5	18S rRNA Geninin Amplifikasyonu	25
3.2.6	Ribozomal ITS-1 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	26
3.2.7	Patojenik Türler için Ribozomal ITS-1 Gen Bölgesinin Tür Spesifik Amplifikasyonu.....	29
3.2.8	Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	30
3.2.9	18S rRNA, ITS-1 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Klonlanması ve Plazmid DNA izolasyonu.....	30
3.2.10	18S rRNA, ITS-1 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizi	33
3.2.11	Patojenik <i>Eimeria</i> Türleri için TaqMan Real Time PCR Analizleri	34
3.3	İstatistiksel Analiz.....	37
4.	BULGULAR	38
4.1	Konvansiyonel Dışkı Muayenesi Sonuçları	38
4.2	Gram Dışkıdaki Ookist Sayısı (OPG) ve İstatistiksel Analizi	44
4.3	Morfolojik İdentifikasyon Sonuçları.....	51
4.4	Patojenik <i>Eimeria</i> Türleri için Ribosomal ITS-1 Geninin Amplifikasyonu	63
4.5	Patojen Türler İçin Real Time PCR Sonuçları.....	64
4.6	18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları	90
4.7	18S rRNA Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları	94
4.8	ITS-1 Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları	98

4.9 ITS-1 Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları	101
4.10 Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları.....	104
4.11 Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları.....	107
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	110
6. KAYNAKLAR.....	120

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Sığırlarda <i>Eimeria</i> türlerinin taksonomideki yeri.....	2
Tablo 3.1 Kayseri'nin Mahzemin yöresinde örneklenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları.....	20
Tablo 3.2 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA gen bölgesini amplifiye eden nested iç primerlerinin tür bazlı oluşturdukları ampikon büyüklükleri.....	26
Tablo 3.3 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA gen bölgesini amplifiye eden nested iç primerlerinin tür bazlı oluşturdukları ampikon büyüklükleri	28
Tablo 3.4 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için primer ve prob sekansları.....	36
Tablo 4.1 Araştırma illerinde <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırların yaş ve cinsiyet özelliklerine göre dağılımları.....	39
Tablo 4.2 Araştırma illerinde <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırların ırk ve dışkı karakterlerine göre dağılımları.....	40
Tablo 4.3 Yaş gruplarına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)	42
Tablo 4.4 Sığırların cinsiyetine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)	42
Tablo 4.5 Sığırların ırkına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20).....	43
Tablo 4.6 Dışkı karakterine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) ..	44
Tablo 4.7 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı	45
Tablo 4.8 Sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi	46
Tablo 4.9 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı .	47
Tablo 4.10 Sığırlarda OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımının istatistiksel analizi.....	47
Tablo 4.11 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımı	48
Tablo 4.12 Sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımının istatistiksel analizi	49
Tablo 4.13 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımı	50
Tablo 4.14 Sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımının istatistiksel analizi.....	51
Tablo 4.15 Pozitif örneklerde saptanan <i>Eimeria</i> türleri ve prevalansları.....	53
Tablo 4.16 Araştırma merkezlerine göre <i>Eimeria</i> türlerinin prevalansı	54
Tablo 4.17 Yaş gruplarına göre <i>Eimeria</i> türlerinin prevalansı	58

Tablo 4.18 Dışkı karakterine göre <i>Eimeria</i> türlerinin prevalansı	60
Tablo 4.19 <i>Eimeria</i> türleri ile tek ve miks enfeksiyonların prevalansı	62
Tablo 4.20 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif saptanan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının patojenik <i>Eimeria</i> türleri yönünden TaqMan Real Time PCR sonuçları	66
Tablo 4.21 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerleri	66
Tablo 4.22 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi .	67
Tablo 4.23 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerleri	68
Tablo 4.24 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	69
Tablo 4.25 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerleri.....	70
Tablo 4.26 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	71
Tablo 4.27 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerleri.....	71
Tablo 4.28 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	72
Tablo 4.29 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerleri.....	73
Tablo 4.30 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	74
Tablo 4.31 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerleri.....	74
Tablo 4.32 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	75
Tablo 4.33 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerleri	76
Tablo 4.34 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	77
Tablo 4.35 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerleri	77
Tablo 4.36 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	78
Tablo 4.37 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. ellipsoidalis</i> Ct (dR) değerleri	79
Tablo 4.38 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. ellipsoidalis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	80
Tablo 4.39 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. ellipsoidalis</i> Ct (dR) değerleri	80
Tablo 4.40 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. ellipsoidalis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi	81

Tablo 4.41 <3 ay yaş grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri	82
Tablo 4.42 4-12 ay yaş grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri	83
Tablo 4.43 >12 ay yaş grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri	84
Tablo 4.44 Kanlı ishalli dışkı grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri	86
Tablo 4.45 İshalli dışkı grubu örneklerinde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri	88
Tablo 4.46 Normal dışkı grubu örneklerinde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri	89
Tablo 4.47 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları	92
Tablo 4.48 18S rRNA sekansları sağlanan <i>Eimeria</i> izolatlarının tür, izolasyon bölgesi ve nükleotid kompozisyonları	93
Tablo 4.49 ITS-1 sekansları sağlanan <i>Eimeria</i> izolatlarının tür, izolasyon bölgesi ve nükleotid kompozisyonları	100
Tablo 4.50 Mt-COI sekansları sağlanan <i>Eimeria</i> izolatlarının tür, izolasyon bölgesi ve nükleotid kompozisyonları	105

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Sığırlarda görülen <i>Eimeria</i> türlerinin ookist ve sporocystlerinin morfolojik özellikleri.	3
Şekil 2.2 <i>E. bovis</i> 'in biyolojik döngüsü	5
Şekil 3.1 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA amplifikasyonu için dizayn edilen primerlerin GenBank'ta kayıtlı çeşitli <i>Eimeria</i> türlerine ait nükleotid sekanslarıyla bağlanma spesifiteleri	28
Şekil 3.2 pJET1.2/blunt cloningvector haritası	31
Şekil 3.3 LB katı besi yerinde üreyen koloniler	32
Şekil 3.4 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi.....	33
Şekil 3.5 <i>E. alabamensis</i> ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri.....	34
Şekil 3.6 <i>E. auburnensis</i> ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri.....	34
Şekil 3.7 <i>E. bovis</i> ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri	35
Şekil 3.8 <i>E. ellipsoidalis</i> ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri.....	35
Şekil 3.9 <i>E. zuernii</i> ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri	35
Şekil 4.1 Dışkı örneklerinde <i>Eimeria</i> ookistleri.....	38
Şekil 4.2 Örnekleme merkezlerine göre sığırlarda <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı.....	41
Şekil 4.3 Sığırların yaş gruplarına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı	41
Şekil 4.4 Sığırların cinsiyetine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı.....	42
Şekil 4.5 Sığırların ırkına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı	43
Şekil 4.6 Sığırlarda dışkı karakterine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı	44
Şekil 4.7 OPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği.....	46
Şekil 4.8 OPG değerlerinin sığırların cinsiyetine göre dağılım grafiği	47
Şekil 4.9 OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılım grafiği.....	49
Şekil 4.10 OPG değerlerinin sığırların dışkı karakterlerine göre dağılım grafiği.....	51
Şekil 4.11 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> ookistleri 1.	52
Şekil 4.12 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> ookistleri 2.	52

Şekil 4.13 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> ookistleri 3.	53
Şekil 4.14 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> ookistleri 4.	53
Şekil 4.15 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	54
Şekil 4.16 Kayseri yöresinde incelenen örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	56
Şekil 4.17 Nevşehir yöresinde incelenen örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	56
Şekil 4.18 Yozgat yöresinde incelenen örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	57
Şekil 4.19 Kırşehir yöresinde incelenen örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	57
Şekil 4.20 <3 ay yaş grubu örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği.....	59
Şekil 4.21 4-12 ay yaş grubu örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	59
Şekil 4.22 >12 ay yaş grubu örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği.....	60
Şekil 4.23 Kanlı ishali dışkı grubundaki örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği.....	61
Şekil 4.24 İshali dışkı grubundaki örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği.....	62
Şekil 4.25 Normal dışkı grubundaki örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği	62
Şekil 4.26 İncelenen örneklerde tek ve miks enfeksiyonların dağılım grafiği	63
Şekil 4.27. Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR analizi sonucu amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü.	64
Şekil 4.28 Patojenik <i>Eimeria</i> türlerine ait hedef ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primer ve problemlerle Real Time PCR'da belirlenen amplifikasyon eğrileri.	65
Şekil 4.29 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğriler ve etkinlik oranları.....	65
Şekil 4.30 <i>E. bovis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği.....	67
Şekil 4.31 <i>E. bovis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği.	69
Şekil 4.32 <i>E. zuernii</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği ..	70
Şekil 4.33 <i>E. zuernii</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği	72
Şekil 4.34 <i>E. auburnensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği	73
Şekil 4.35 <i>E. auburnensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği.....	75
Şekil 4.36 <i>E. alabamensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği	76

Şekil 4.37 <i>E. alabamensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği.....	78
Şekil 4.38 <i>E. ellipsoidalis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği	80
Şekil 4.39 <i>E. ellipsoidalis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği.....	81
Şekil 4.40 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri	82
Şekil 4.41 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları	83
Şekil 4.42 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için 4-12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri	84
Şekil 4.43 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için >12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri	85
Şekil 4.44 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için kanlı ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri	86
Şekil 4.45 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için kanlı ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları.....	87
Şekil 4.46 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri	88
Şekil 4.47 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları	89
Şekil 4.48 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için normal dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri	90
Şekil 4.49 Bazı <i>Eimeria</i> pozitif örneklerle ait izolatların parsiyel 18S subunit (SSU) rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü.....	91
Şekil 4.50 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle 18S rRNA gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları.	91
Şekil 4.51 <i>Eimeria</i> izolatlarına ait 18S rRNA nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	97
Şekil 4.52 <i>Eimeria</i> izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri.	98
Şekil 4.53 Bazı <i>Eimeria</i> pozitif örneklerle ait izolatların 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü.....	99

Şekil 4.54 Bazı <i>Eimeria</i> pozitif örneklerle ait izolatların 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü	99
Şekil 4.55 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle ITS-1 gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları.	100
Şekil 4.56 <i>Eimeria</i> izolatlarına ait ITS-1 nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	103
Şekil 4.57 <i>Eimeria</i> izolatlarının ITS-1 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri	104
Şekil 4.58 Bazı <i>Eimeria</i> pozitif örneklerle ait izolatların mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü	105
Şekil 4.59 Gen spesifik primerlerle koloni PCR sonucu mt-COI gen bölgesi amplifikasyonu.....	105
Şekil 4.60 <i>Eimeria</i> izolatlarına ait mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	109
Şekil 4.61 <i>Eimeria</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri	109

ÖZET

Çalışmada 2013-2015 yılları arasında Kayseri, Nevşehir, Yozgat ve Kırşehir illerindeki halk elinde yetiştiriciliği yapılan çeşitli sığırcılık işletmelerindeki farklı yaş, cinsiyet ve ırklara ait toplam 920 sığırdan uygun teknikle dışkı örnekleri toplanmıştır. Dışkı örnekleri laboratuvarında *Eimeria* ookistleri yönünden incelenmiş ve pozitif örneklerde gram dışkıdaki ookist sayısı belirlenmiştir. Pozitif belirlenen sığırlara ait dışkı örnekleri sporlandırma prosedürüne tabii tutulup ookist morfolojisine göre *Eimeria* türlerinin teşhisleri yapılmıştır. *Eimeria* ookistleriyle pozitif belirlenen örneklerle ait genomik DNA izolatları gen spesifik primerlerle 18S rRNA, ITS-1 ve mt-COI gen bölgeleri yönünden PCR analizlerine tabii tutulmuş ve klonlama, plazmid pürifikasyonu ve sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Her gen bölgesi için nükleotid dizileri saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları belirlendikten sonra GenBank aksesyonları sağlanmış ve filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. Nükleotid hizalama analizleriyle ITS-1 gen bölgesinden patojenik *Eimeria* türlerinin Real Time PCR ile kantitatif identifikasyonları için spesifik primer ve prob dizaynları yapılmıştır. İncelenen sığırlardan 434'ü (%47,2) *Eimeria* ookistleri yönünden pozitif bulunmuştur. *Eimeria* pozitifliğinin sığırların cinsiyet ve dışkı karakterine göre dağılımlarında istatistiksel önem saptanırken ($p<0,05$), yaş ve ırk gruplarında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). Pozitif sığırlarda ortalama OPG değeri $464,8\pm40,0$ saptanmıştır. OPG değerleri <3ay ve 4-12 ay yaş gruplarıyla kanlı ishalli ve ishalli dışkı karakteri gruplarında istatistiksel anlamda daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre patojenik *Eimeria* türleri non-patojenik türlere göre daha yaygın bulunmuştur. Patojenik türler için Real Time PCR analizleri sonucunda DNA kopya sayısı düzeyinde en yüksek pozitiflik *E. auburnensis* için belirlenmiş olup bunu sırasıyla *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* ve *E. alabamensis* pozitiflikleri izlemiştir. 1 yaş altı grubu ve ishalli dışkı karakterinde olan örneklerde *E. bovis* ve *E. zuernii* pozitifliği de DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. alabamensis* pozitifliklerine oranla daha yüksek belirlenmiştir. Mt-COI filogenetik çözünürlüğünün yüksek bootstrap değerleri desteğiyle 18S rRNA ve ribozomal ITS-1 gen bölgelerine göre daha efektif olduğu ve *Eimeria* türlerinin 5 ayrı monofiletik grupta kümelendikleri saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Sığır, coccidiosis, real time PCR, moleküler prevalans, filogenetik karakterizasyon

ABSTRACT

In this study, a total of 920 fecal samples from cattle with various age, gender and race, raised in public hand, were technically collected from Kayseri, Nevşehir, Yozgat and Kırşehir provinces between 2013-2015. Fecal samples from cattle were investigated for *Eimeria* oocysts at the laboratory and oocyst per gram of feces (OPG) were calculated in the positive samples. Species identifications of *Eimeria* oocysts were performed after the sporulation of the oocysts. Genomic DNA isolates belonging to the *Eimeria* positive specimens were analyzed with PCR for 18S rRNA, ITS-1 and mt-COI gene regions with gene specific primers. Afterwards cloning, plasmid purification and sequence analyses were performed. After the molecular characterization of the isolates in which the nucleotide sequences were determined for each gene region, GenBank accessions were provided and phylogenetic constructions were obtained. Specific primer and probes were designed from ITS-1 gene region using nucleotide alignment analyses in order to quantitative detection of pathogenic *Eimeria* species by Real Time PCR. 434 (47.2%) out of examined cattle were found to be positive with *Eimeria* oocysts. Statistically significant importance were determined ($p < 0.05$) in the distribution of *Eimeria* positivity over the gender and feces structure while no statistically importance ($p > 0.05$) were detected related to age and breed of the infected cattle. The mean OPG was determined as 464.8 ± 40.0 in the positive cattle. The OPG values were found to be statistically higher in the <3 month and 4-12 month age groups and also in bloody diarrheal and diarrheal groups. According to the morphological identification results, pathogenic *Eimeria* species were found more prevalent than the non-pathogenic species. The Real Time PCR assay results for pathogenic species revealed that *E. auburnensis* was the species with the maximum positivity and this was followed by *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* and *E. alabamensis* on the base of DNA copy number. The *E. bovis* and *E. zuernii* positivities in the under one year old and diarrheal groups were determined higher than the positivities for *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* and *E. alabamensis* based DNA copy number level and this difference was found statistically important. Phylogenetic resolution of mt-COI gene was found to be more effective than 18S rRNA and ribosomal ITS-1 genes with the support of high bootstrap values and the *Eimeria* species were clustered into the five different monophyletic groups.

Key words: Cattle, coccidiosis, real time PCR, molecular prevalence, phylogenetic characterization

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

İntestinal protozoonlar içerisinde *Eimeria* türleri sığırlarda dünya çapında yaygınlık göstermekte olup, bazen fibrin ve bağırsak dokusu da içerebilen, suludan hemorajiğe kadar değişen ishale karakterize hastalık tablosuna yol açmaktadırlar. Sığırlarda şimdiye kadar varlığı bilinen 21 *Eimeria* türünden morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre 12'si Türkiye'deki sığırlarda bildirilmiştir. Bu türlerden çoğu düşük patojeniteye sahipken başta *E. bovis* ve *E. zuernii* olmak üzere *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* türleri patojenik türler olarak nitelenmektedir. Türkiye'de günümüze kadar sığırlarda coccidiosis üzerine çalışmaların konvansiyonel parazitolojik yöntemlerle yapıldığı görülmekte olup moleküler epidemiyolojik ve genotiplendirme çalışmalarının eksikliği dikkati çekmiştir. Bunun yanında Dünyada da sığır coccidiosis'ine yol açan *Eimeria* türleri üzerine moleküler çalışmaların da oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Diğer birçok enfeksiyondaki gibi coccidiosis'de de bulaşma dinamiklerinin belirlenmesi, epidemiyolojik faktörlerin analizi ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde enfeksiyona yol açan tür ve genotiplerin ortaya konulması oldukça önem arz etmektedir.

TÜBİTAK tarafından da 113 O 597 kod numarası ile desteklenen bu araştırma projesiyle, İç Anadolu Yöresinde sığırlarda coccidiosis'e yol açan türlerin moleküler epidemiyolojisi araştırılmış, patojenik türlerin kantitatif moleküler teşhisi için TaqMan Real Time PCR tekniği geliştirilmiştir. Aynı zamanda Dünyada ilk olarak sığır *Eimeria* türlerinin 18S rRNA, ribozomal ITS-1 ve mt-COI gen bölgelerine göre eş zamanlı moleküler karakterizasyonları yapılmış ve filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur.

2. LİTERATÜR BİLGİ

Apicomplexa filumunda yer alan *Eimeria* türleri, çeşitli omurgalı konaklarda yerleşmekte olup tüm dünyada yaygınlık göstermektedir. Günümüze kadar bu soy içerisinde 1700'ün üzerinde tür tarif edilmiştir (Daugochies and Najdrowski, 2005). Bazı *Eimeria* türleri özellikle kanatlı ve ruminantlar olmak üzere çiftlik hayvanlarında tehdit oluşturmakta olup yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmektedir (Daugochies and Najdrowski, 2005; Hill et al., 2012). Sığırlarda büyük ekonomik kayıplara neden olan coccidiosis özellikle 6 aylıktan küçük buzağı ve 6-12 aylık sığırlarda akut klinik tabloya yol açmaktadır. Hastalık buzağılarda ve özellikle üç haftalıktan üç aya kadar olan yaş gruplarında daha yaygın görülürken daha yaşlı hayvanlarda gelişen konkomitant immuniteye bağlı olarak subklinik formda seyretmektedir (Cornelissen et al., 1995; Daugochies and Najdrowski, 2005). Bunun yanında hastalık daha yaşlı sığırlarda da verim kayıplarına yol açmaktadır (Svensson et al., 1996; Taylor and Catchpole, 1994).

2.1 Sığırlarda *Eimeria* Türlerinin Taksonomi ve Morfolojisi

Sığırlarda coccidiosis'e yol açan geçerli *Eimeria* türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yeri Tablo 2.1'de verilmiştir (Daugochies and Najdrowski, 2005; Levine, 1985).

Tablo 2.1 Sığırlarda *Eimeria* türlerinin taksonomideki yeri

Sınıflandırma
Superkingdom: Eukaryota
Kingdom: Chromalveolata
Süperfilum: Alveolata
Filum: Apicomplexa
Sınıf: Conoidasida
Takım: Eucoccidiorida
Aile: Eimeriidae
Soy: <i>Eimeria</i>
Tür: <i>E. bovis</i> , <i>E. zuernii</i> <i>E. auburnensis</i> <i>E. ellipsoidal</i> <i>E. cylindrica</i> <i>E. alabamensis</i> <i>E. subspherica</i> <i>E. illinoisensis</i> <i>E. brasiliensis</i> <i>E. canadensis</i> <i>E. pellita</i> <i>E. wyomingensis</i> <i>E. bukidnonensis</i>

Sığırlarda çok sayıda hastalık etkeni coccidiosis etiyolojisinde tanımlanmasına karşın bunlar arasında *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* patojen türler olarak kabul edilmektedir. Bu türlerden özellikle de *E. bovis* ve *E. zuernii*, buzağılarda klinik coccidiosis'e neden olmaktadır (Arslan, 1995; Levine, 1985).

Sığırlarda bulunan önemli coccidiosis etkenleri ile bu türlere ait bazı morfolojik, özellikleri Şekil 2.1’de verilmiştir (Daugochies and Najdrowski, 2005; Levine, 1985).

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

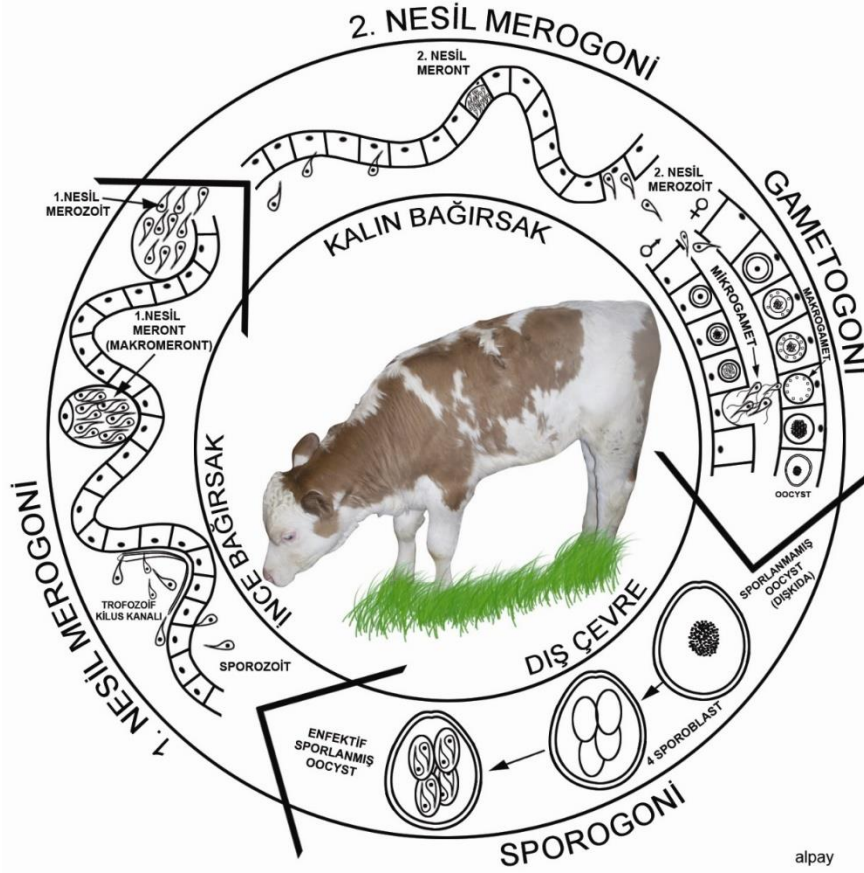
Şekil 2.1 Sığırlarda görülen *Eimeria* türlerinin ookist ve sporocystlerinin morfolojik özellikleri. MP: mikropil, OG: Ookist polar granül, OR: Ookist residüsü, SG: Sporozoit globülleri, SS: Sporozoit stieda cisimciği, SR: Sporozoit residüsü, E: elipsoidal, R: Yuvarlak, A: Asimetrik, O: Oval, P: Piriform,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

2.2 Sığırlarda *Eimeria* Türlerinin Biyoloji ve Epidemiyolojisi

Eimeria türleri sığırlarda ince bağırsak epitel hücrelerine yerleşmekte ayrıca sekum ve kolonda da bulunmaktadır. Etkenler barsak epitel hücrelerinde intrasitoplazmik olarak bulunmakta olup, sadece *E. alabamensis* epitel hücre çekirdeği içine yerleşmektedir. Yaşam çemberinde sırası ile merogoni (=şizogoni), gametogoni ve sporogoni çoğalma dönemleri görülmektedir. Merogoni ve gametogoni konakta bağırsak epitel hücrelerinde, sporogoni ise dış ortamda meydana gelmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).

Coccidia türleri ile enfekte sığırların dışkılarıyla dışarı atılan sporlanmamış ookistler, ortamda uygun ısı (27-30°C), nem (genellikle %75) ve yeterli oksijen bulunduğu sporogoni dönemi başlamaktadır. Sporont önce ikiye, daha sonra tekrar ikiye bölünmekte ve 4 adet sporoblast oluşmaktadır. Bu dönemde uzun ovalimsi bir şekil alan parazit, etrafında cidar oluştuktan sonra sporokist adını almaktadır. Sporokist içinde; ikiye bölünme ile muz dilimi şeklinde sporozoitler oluşmaktadır. Eimeria türlerinin sporlanmış ookistlerinde toplam 8 adet sporozoit bulunmaktadır. Sığırlarda bulunan coccidia türlerinin sporlanma süresi türlere göre değişmekle beraber, sporlanma süresinin genellikle 2-3 gün olduğu bildirilmektedir. Sporlanmış ookistler enfektif olup, sığırlar bu ookistleri ağız yolu ile aldıklarında enfekte olmaktadır. Sindirim sisteminde asit, enzim, safra, CO₂ gibi kimyasallar ve peristaltik hareketlerin etkisiyle ookistler parçalanmakta ve sporozoitler dışarı çıkmaktadırlar (ekskistasyon) (Arslan, 1995; Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).

Sindirim sisteminde serbest kalan sporozoitler, ince bağırsakların son kısımlarında epitel hücrelerine girmektedirler. *E. bovis* enfeksiyonlarında, bu kısım da lenf kanalı epitel hücrelerinde trofozoitler oluşmaktadır. Daha sonra merogoni dönemi başlamaktadır. *E. bovis* ve *E. zuernii*'nin biyolojisinde 2 nesil merogoni dönemi görülmektedir. Enfeksiyonun 5. gününde 1. nesil merogoni sonucu merontlar (makromerontlar) oluşmaktadır. Merontlar 14-18 gün sonra olgunlaşmakta olup, olgun merontların her biri 120.000 merozoit içermektedirler. Hücrelerin parçalanması ile serbest kalan 1. nesil merozoitler sekum ve kolon epitel hücrelerine girerek 2. nesil merogoniye başlatılmaktadırlar. Hücrelere girişten 2 gün sonra içlerinde 30-36 adet merozoit içeren 2. nesil merontlar oluşmaktadır. Bunların dağılması ile bağırsak boşluğuna 2. nesil merozoitler çıkmaktadır. Merozoitler sekum ve kolon epitel hücrelerine girmekte ve gametositleri oluşturmaktadırlar (gametogoni). Erkek gametositlerin her birinden bir çift kamçılı çok sayıda mikrogamet, dişi gametositlerin her birinden ise bir makrogamet oluşmaktadır. Mikrogametlerde biri makrogametinin içine girerek makrogameti dölemekte (singami) ve zigot oluşmaktadır. Makrogametlerin içinde ve çevresine yakın olarak bir veya iki sıra halinde, mukoprotein içeren eosinofilik plastik granüller dizilmiştir. Bu plastik granüller birleşerek zigotun etrafında bir duvar oluşturmaktadırlar. Etrafı kalın cidarla çevrili bu zigota ookist adı verilmektedir. Bağırsak epitel hücrelerinin parçalanması ile serbest kalan ookistler bağırsak boşluğuna düşmekte ve dışkı ile dışarı atılmaktadır (Şekil 2.2) (Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).



Şekil 2.2 *E. bovis*'in biyolojik döngüsü (Arslan and Sarı, 2013)

Coccidiosis'de sporlanmış ookistlerin alınmasından 10. gün sonra dışkıda ookistler görülmektedir. Ancak buzağılarda *E. bovis* ve *E. zuernii*'nin oluşturduğu klinik coccidiosis olgularında enfeksiyonun 18-21. günlerinde dışkıda ookistler görülmeye başlamaktadır. Bu patojen türlerde prepatent süre 5-15 gün, patent süre ise 16-21 gün arasında değişmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005; Özer and Şaki, 2001).

Coccidiosis tüm dünyada sığırlarda yaygın olup, özellikle buzağı coccidiosis'i büyük problem oluşturmaktadır. Dünyada kapalı yetiştirme sistemlerinin yapıldığı sığır işletmelerinde hastalığın daha yaygın olduğu bildirilmektedir. Amerika kıtasından Japonya'ya, Hindistan'dan Ortadoğu ve Avrupa'ya kadar, bütün dünya ülkeleri çiftliklerinde hastalık varlığını sürdürmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005; Levine, 1985). Sığırlarda coccidiosis epidemiyolojisinde birçok risk faktörünün etkili olduğu belirtilmiştir. Hastalığın prevalansı yağmurlu mevsimlerde ya da yağmurlu günleri takiben daha yüksek

görülmektedir. Coccidiosis olgularının görülme sıklığında yemleme sistemi, sulama şekli, ahır tipi, ahırın betonarme olması, yer tipi ve sürü büyüklüğünün etkili olduğu bildirilmiştir (Arslan and Sarı, 2013; Rehman et al., 2011). Klinik coccidiosis olgularının ortaya çıkmasında buzağların önemli rolü bulunmaktadır. Özellikle iki aylığa kadar olan buzağlar dışkıları ile daha fazla sayıda ookist çıkararak çevreyi kontamine etmektedirler. Buzağlar hastalığın başlangıcından itibaren dışkıları ile oldukça fazla ookist çıkarmaktadırlar (Arslan and Sarı, 2013; Sanchez et al., 2008).

Sığırlarda coccidiosis kapalı yetiştirme tiplerinde önemli olmaktadır. Çünkü kapalı ortamlarda *Eimeria* ookistlerinin çok hızlı çoğalma potansiyeli bulunmaktadır. Bu tip ahır ve işletmelerdeki enfekte birkaç hayvan bile milyonlarca ookist çıkarmak süratiyle çevreyi kontamine etmektedirler. Çiftlik ya da ahır ortamında ookistler bir yıldan daha fazla enfektif özelliğini korumaktadırlar. Ayrıca ookistler 40°C sıcaklıktaki ahır altlıklarında ve çevrede canlılığını bir yıldan fazla koruyabilmektedirler. Ookistlerin hayvan yemleri ile saman ve otlar içerisinde sekiz ay kadar enfektif şekilde kaldığı bildirilmiştir (Arslan and Sarı, 2013; Lassen, 2009).

Coccidiosis'in yayılışında hayvanların bir arada kalabalık olarak bulundurulmaları, altlıkların temiz olmaması, yemlik ve sulukların dışkılarla bulaşması etkili olmaktadır. Hayvan sayısının fazla olduğu sürülerde bulaşma riskide yüksek bulunmuştur. Sürü büyüklüğü ile bağırsak protozoonlarının (*Eimeria*, *Cryptosporidium*) arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Coccidiosis endüstriyel işletmelerde yani; hayvan sayısının fazla olduğu kapalı ve yarı kapalı işletmelerde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Sığırlarda coccidiosis oluşumunda etkili çevresel ve yetiştiricilikle ilgili faktörler olduğu için mevsim geçiş dönemleri, doğum sezonları ve hayvan nakilleri önemli olmaktadır. Coccidiosis görülmeyen bir işletmeye, enfekte ahırlardan ya da bölgelerden hayvan ticareti ile gelen değişimlerde, 2-3 hafta sonra bu işletmelerde hastalık ortaya çıkabilmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Arslan et al., 2012; Jolley and Bardsley, 2006; Taylor and Catchpole, 1994).

Enfeksiyon; sporlanmış ookistlerin su ve gıdalarla ağız yoluyla alınması ile bulaşmaktadır. Hastalık etkeni *Eimeria* ookistlerinin sporlanması için gerekli olan rutubet, oksijen ve sıcaklık, hastalık riskini artırmaktadır. Kontaminasyonun fazla olduğu yerlerde, danalarda ve hatta yaşlı hayvanlarda hastalık görülebilmektedir. *Coccidia* ookistleri ile kontamine meralardan hazırlanan kuru otların buzağlara yedirilmesi sonucu, bu hayvanlarda enfeksiyon görülmüştür.

Hayvanların bir yerden başka bir yere naklinden sonra bulaşmada bir artış olduğu da belirtilmiştir. Bunlara ilaveten 1-5 aylık buzağların meraya bırakılmadan önce ahır besisinde tutulmaları ya da bir yaşına kadarki dönemde kapalı alanda bir arada tutulan hayvanların toplu halde meraya bırakılmalarının da etkili faktörler olduğu bildirilmiştir (Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985; Marshall et al., 1998).

Eimeria enfeksiyonlarının karakteristik özelliği; çok sayıda sığırın enfekte olmasına rağmen, sadece birkaç işletmede ya da sınırlı sayıda hayvanın hastalanmasına neden olmasıdır. Yaşlı hayvanlar daha önce geçirdikleri enfeksiyonlar sonucu bağışıklık kazanmaktadır. Dolayısı ile bunlarda subklinik enfeksiyonlar görülmektedir. Sığır coccidiosisinde morbidite %100'lere kadar varmasına rağmen, klinik vakalar genellikle buzağlarda ortaya çıkmakta ve ölümler görülmektedir. Klinik vakalar buzağların tekli bölmelerden toplu halde bulundukları işletme önlerindeki padoklara alınmasını takiben ya da meraya toplu halde bırakılması süresince ortaya çıkmaktadır. Coccidiosisın ortaya çıkmasında ve devamlılığının sağlanmasında etkili predispoze faktörler; düzensiz beslenme, ahır ısısının 18-21⁰C den yüksek olması, havadaki nem oranının %75'i geçmesi, bakteriyel ve viral hastalıklar sayılmaktadır. Ayrıca mide-bağırsak nematod enfeksiyonları (*Trichostrongylus* sp., *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp. gibi) coccidiosis'in daha ciddi seyretmesine neden olmaktadır. Sığırlarda çoğunlukla *E. zuernii*'nin neden olduğu "kış coccidiosis'inin" ortaya çıkmasında stres, sütten kesilme, yem değişikliği, yetersiz beslenme, soğuk ve yer değişikliği gibi predispoze faktörler rol oynamaktadır. Bunlara ilaveten hayvanların altlarına serilen altlıklar, deri rutubeti, vücut ısısı da ookistlerin sporlanması için uygun ortamı oluşturmakta ve latent enfeksiyonlar akut hale geçmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005; Parker and Jones, 1990). Coccidiosis genellikle iki veya daha fazla türün oluşturduğu miks enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir. Klinik coccidiosis olgularında da çoğunlukla miks enfeksiyonlar görülmüştür (Arslan, 1997; Arslan, 1995; Arslan and Sarı, 2013; Ernst et al., 1987).

2.2.1 Coccidiosis'in Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de sığırlarda coccidiosis etkenleri oldukça yaygın görülmektedir. Buzağlarda *Eimeria* türlerinin prevalansı %60-90 arasında değişmektedir. Dana ve yaşlı sığırlarda da coccidia ookistleri %90'lara varan yaygınlık göstermektedir (Arslan and Sarı, 2013). Ancak klinik coccidiosis vakalarına bir yaşına kadar olan buzağı ve danalarda rastlanmakta, bu hayvanlarda dışkı ile atılan ookist sayısı da daha fazla olmaktadır. Enfekte buzağlar dışkıları ile en yoğun

ookisti 3-5 haftalık yaşlarda çıkarmaktadırlar (Arslan and Sarı, 2013; Arslan and Tüzer, 1998). Ülkemizin farklı bölgelerindeki 17 ilde bulunan buzağılarda 2010 yılında *Eimeria* ookistlerinin prevalansı %28,9 düzeyinde bulunmuştur (Arslan and Sarı, 2013). Bu durum hastalık yaygınlığının azaldığını göstermektedir. Ancak %30'lar düzeyindeki ookist görülme sıklığı olan işletmelerde bile, her zaman klinik coccidiosis olgularının görülmesi kaçınılmazdır. Coccidiosis belirtileri görülmeyen etçi sığır işletmelerindeki buzağılarda %27, ineklerde ise %15,7 oranlarında *Eimeria* türleri saptanmıştır (Cicek et al., 2007). Ülkemizde etçi veya sütçü sığır işletmesi olsun, yetiştirme tarzında büyük farklılıkların olmadığı bilinmektedir. Nitekim sütçü sığır işletmelerindeki buzağılarda %25,9 düzeyinde coccidia ookisti saptanmıştır. Bu tip işletmelerdeki ishalleri buzağılarda ve köy koşullarındaki ahırlarda bulunan hayvanlarda hastalık etkeni daha yaygın olarak bildirilmesine rağmen bu yaygınlığın %30'lar düzeyinde seyrettiği belirtilmiştir (Aktaş et al., 2008).

Erişkin sığırlarda coccidiosis olguları genellikle subklinik enfeksiyon şeklinde görülmektedir. Ancak buzağılar başta olmak üzere 3-8 haftalık buzağılarda klinik coccidiosis vakalarına rastlanmaktadır. Ülkemizde sığırlarda *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. ellipsoidalis* tüm bölgelerde yaygın olarak görülen coccidiosis etkenleri olup, Türkiye'de sığırlarda; *Eimeria alabamensis* (%2-29), *E. auburnensis* (%17-55), *E. bovis* (%29-48), *E. brasiliensis* (%1-11), *E. bukidnonensis* (%1-12), *E. canadensis* (%6-28), *E. cylindrica* (%4-26), *E. ellipsoidalis* (%3-26), *E. illinoisensis* (%2-5), *E. subspherica* (%2-24), *E. zuernii* (%12-36) ve *E. wyomingensis* bildirilmiştir (Aktaş et al., 2008; Arslan, 1997; Arslan, 1995; Arslan et al., 2012; Arslan and Tüzer, 1998; Cicek et al., 2007; Değer et al., 2001; Dumanlı et al., 1993; Göz and Aydın, 2005; Gül et al., 2000; Gül et al., 2008; Güleğen and Okursoy, 2000; Güven et al., 2010; Mimioğlu et al., 1956; Sayın, 1970). Türkiye'de yaşlı sığırlarda coccidiosis latent ya da subklinik enfeksiyonlar halinde görülmektedir. Yaşlı hayvanlarda coccidia ookistleri oldukça yaygındır. Altı aylıktan büyük dana ve yaşlı sığırlar dışkıları ile sürekli ookist çıkardıklarından buzağılar için portör olarak görev yapmaktadırlar. Hatta periparturient dönemdeki ineklerde %65 oranında *Eimeria* türleri saptanmıştır. Bu durum doğumu takiben yeni doğan buzağılarda klinik coccidiosis olgularının görülmesine neden olabilmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Arslan et al., 2012).

2.2.2 Coccidiosis'in Dünyadaki Yayılışı

Dünya'da sığırlarda coccidia ookistleri yaygın olarak görülmekte olup, tüm yaş grubundaki sığırlarda görülmektedir. Klinik coccidiosis vakalarına ise buzağılarda rastlanmaktadır. Neonatal buzağı ishallerinde önemli etiyolojik ajan olan *Eimeria* türleri, iki haftalıktan itibaren sorun olmaya başlamaktadır. Özellikle üç haftalıktan altı aylığa kadar olan buzağılarda önem arz etmektedir. Daha yaşlılarda ciddi sorun oluşturmadığı kaydedilmiştir. Ancak yaşlı hayvanlar enfekte olduklarında az sayıda ookistleri dışkıları ile atarak gençler için portörlük görevi yaptıkları belirtilmiştir. Dünya'nın birçok ülkesinde, genel olarak tüm dünya'da coccidiosis yaygın olarak rastlanmaktadır. Klinik coccidiosis olguları da buzağılarda sıklıkla görülmektedir. *Eimeria* ookistlerinin prevalansı hayvanların yaşı başta olmak üzere coccidiosis risk faktörlerine göre değişmekle beraber %80'lere kadar çıkmaktadır. Dünyada sığırlarda *Eimeria bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* ve *E. auburnensis* yaygın olarak saptanan coccidiosis etkenleridir (Dauguschies and Najdrowski, 2005; Ernst et al., 1987; Lassen, 2009; Parker and Jones, 1990). Son yıllarda yapılan çalışmalarda sığırlarda *Eimeria* türlerinin yaygınlığı Pakistan'da %47 (Rehman et al., 2011), Estonya'da %37 (Lassen, 2009), Polonya'da %52,8 (Tomczuk et al., 2015) oranlarında bildirilmiştir.

2.3 Sığır Coccidiosis'inde Klinik ve Patogenez

Coccidiosisde klinik belirtiler, hastalığa neden olan *Eimeria* türüne göre değişmektedir. Çünkü enfeksiyonun şiddeti üzerinde, *Eimeria* türü, alınan sporlanmış ookist sayısı ve konağın bağışıklık durumu etkili olmaktadır. Klinik olgulara *E. bovis* ve *E. zuernii* türleri neden olmaktadır. Prepatent süre 7-21 gün arasında değişmektedir. Klinik belirtiler akut coccidiosisın görüldüğü buzağı ve danalarda dikkati çekmektedir. Daha yaşlı sığırlarda subklinik enfeksiyonlar şekillenmektedir. Hastalık akut, subklinik ve perakut coccidiosis olmak üzere üç farklı klinik formda görülmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Dauguschies and Najdrowski, 2005; Levine, 1985).

Akut coccidiosis 1-3 aylık buzağılarda sıklıkla görülmektedir. Ancak bir yaş civarı danalarda da sporadik olgular halinde rastlanmaktadır. Akut coccidiosisın başlangıç devresinde ilk bulguların ani olarak ortaya çıkan pis kokulu, koyu yeşil renkli ve seröz tabiatlı ishal olduğu görülmüştür. Hayvanın arka kısmı gaita ile bulaşık olup, dışkıda kan izleri ve pıhtılaşmış kan görülmektedir. Kanlı ishal devam etmekle beraber hayvanın genel durumunun iyi olduğu

dikkati çekmektedir. Bazı olgularda kan izleri taşıyan normal kıvamlı dışkıda görülebilmektedir. Hastalığın bu başlangıç devresi 1-2 gün devam etmektedir. Akut coccidiosisin ikinci aşaması olan orta devrede ise diyare sümüksü, yapışkan kıvam halini almaktadır. Dışkı fena kokulu ve su gibi olup, ayrıca içerisinde müköz sıvı, fibröz zar ve kan bulunmaktadır. Tipik dizanteri tablosu şekillenmiş olup, kan akışı ve tenesmus görülmektedir.

Bağırsak hareketlerinin çok artması nedeni ile bağırsak invaginasyonu ve prolapsus rekti oluşabilmektedir. Hayvanın yem tüketimi azalmakta, süratle zayıflamaya başlamakta ve yattığı yerden kalkamaz duruma gelmektedir. Vücut ısısı 40-41°C'ye çıkabilmekte, iştahsızlık, su içme ihtiyacının artması, derinin kuruması, kılların dikleşmesi görülen diğer belirtiler olarak bildirilmektedir. Bu dönem ise 5-6 gün devam ederken, akut coccidiosisin son aşamasında dışkı mukuslu, difteroid membranlarla karışık, kahverengi, siyah ve genellikle kırmızımsı renkte görülmektedir. Bağırsakta aşırı derecede kanama olduğu için, kan dışkıya karışmış olup, rektal muayenede rektum mukozasının kalınlaşmış, ödematoz, ağrılı ve hiperemik olduğu görülmektedir. Anüs hiç kapanmadığı, hayvanın dört ayağını uzatmış bir şekilde yatar durumda olduğu, yem tüketemediği ve vücut ısısının 35-36 °C'ye düştüğü ve bu bulgulara titreme, gerginlik ve çarpınma gibi sinirsel belirtilerin eklendiği izlenmektedir. Bu aşamada tedavi edilmeyen olgular ölümle sonuçlanabilmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005; Levine, 1985).

Subklinik coccidiosis tipi, sığırlarda daha yaygın olup, genellikle yaşlı hayvanlarda görülmektedir. Oluşan immunité nedeniyle klinik olarak dikkati çekmeyen latent enfeksiyonlardır. Klinik olarak bazen hafif kanamalı olan ishaller enterit tablosu şekillenebilmektedir. Dışkı kokulu ve epitel artıkları görülebilir. Hasatın genel durumu çok kötü değildir ve 2-3 hafta içinde iyileşmektedir (Arslan and Sarı, 2013).

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

ookistlerden de izole edilmiştir. Klinik olarak diyare, tenesmus, kas titremeleri, konvülziyon, opistotonos, nistagmus, körlük, çırpınma krizleri ve ataksi gibi sinirsel belirtiler görülmektedir. Coccidiosisin bu nörolojik sendromuna enterik coccidiosis saptanan buzağuların %30-50'sinde rastlanmaktadır. Sindirim sistemi ile ilgili semptomlar görülmeye başlamadan, 24-48 saat içinde sinirsel semptomların eşliğinde hayvanlarda ölüm olgularına rastlanmakta ve mortalite %50'lere varmaktadır. Buzağularda sinirsel belirtilerin görüldüğü olgular akut klinikal coccidiosis olarak isimlendirilmektedir. Bu tip coccidiosis vakalarında ölüm oranı %80-90'lara kadar çıkmaktadır. Ayrıca perakut coccidiosis olguları 9-12 aylık olan danalarda da bildirilmiştir. Bu yaş grubu sığırlarda sinirsel belirtiler ile seyreden *E. zuernii* coccidiosis saptanmış olup bir gram dışkıda ookist sayısının 50 binin üzerinde olduğu belirtilmiştir (Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005).

Buzağularda klinik coccidiosis belirtilerinde dışkı kıvamı ve dışkının kanlı olup olmaması önemli olup, genellikle klinik olarak kanlı ishalli semptom gösteren buzağularda bu hastalık bildirilmiştir. Türkiye'de 25 gün ile 6 aylık arasındaki buzağularda klinik coccidiosis olguları görülmektedir. Bu olgularda *E. bovis* ve *E. zuernii* türleri saptanmış ve hastalarda bir gram dışkıdaki ookist sayılarının ise 8 400-237 500 arasında değiştiği belirtilmiştir (Arslan, 1997; Arslan and Tüzer, 1998). Buzağularda klinik coccidiosis olgularına süttten kesim sonrası dönemlerde, kış mevsimi bitişinde ve ilkbahar aylarında daha yaygın olarak rastlandığı ve bir gram dışkıda ookist sayılarının 10 000-54 000 arasında değiştiği vurgulanmıştır (Arslan and Sarı, 2013; Parker et al., 1984). Ayrıca klinik olguların bir yaş civarı olan danalarda da görüldüğü ve genellikle *E. zuernii* coccidiosisinin olduğu bildirilmiştir (Ernst et al., 1987). Bunlara ilaveten meraya bırakılmayı takiben buzağularda *E. alabamensis*'in neden olduğu ishal olguları yayınlanmıştır. Bu tip olgularda otlama sezonunda hayvanlarda kilo kaybının olduğu belirtilmiştir (Arslan and Sarı, 2013; Svensson et al., 1994).

Sığırlarda coccidiosis, sindirim sistemini etkileyen ve bu sistemde bağırsaklara yerleşen bir hastalıktır. Enfeksiyonda etkenler öncelikle ince barsak epitel hücrelerine yerleşerek gelişmeye başlamakta ve daha sonra ise cekum ve kolon kısmına geçerek gelişmelerine buralarda devam etmektedirler. Bu nedenle hastalık barsaklardaki patolojik olaylarla ilişkili olarak gelişmektedir. Bağırsak epitel hücrelerinin yıkımı, villus kaybı, emilimin bozulması, enterit ve diyare temel patolojik olayların başında gelmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).

Patogenezi; alınan sporlanmış ookist sayısı, merogonik nesil adedi, merogoni sonucu oluşan merozoit sayısı ve parazitin doku ve hücrede yerleşim yerine göre değişmektedir. *Eimeria bovis* ve *E. zuernii* en patojen türler olup, oldukça şiddetli (+++), *E. ellipsoidalis* orta derecede şiddetli (++), *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bukidnonensis* ve *E. cylindrica* ise daha az şiddetli (+) enfeksiyonlara neden olmaktadır (Arslan and Sarı, 2013).

Bağırsaklarda doku hasarları oluşması ve özellikle de kalın bağırsakta değişikliklerin başlaması ile birlikte epitel tabakası kaybından dolayı Na^+ ve Cl^- iyonlarının geri emilimi engellenmektedir. Kan serumunda K^+ yükselmekte ancak Na^+ azalmaktadır. Bunlara ilaveten kan plazmasında albumin ve total protein miktarında bir eksilme olmaktadır. Tüm bu olayların sonucunda da dehidrasyon tablosu ortaya çıkmaktadır. Dışkı ile su kaybı ve Na^+ , Cl^- iyonlarının plazma konsantrasyonunda azalması ile ortaya çıkan dehidrasyon tablosu, hastalığın başlangıç döneminde buzağılarda ölüm nedeni olabilmektedir. Ayrıca plazma proteinlerinin, mineral maddelerin ve daha sonrada eritrositlerin kaybı ile oluşan anemi sonucu eksitasyon tablosu ve ölüm şekillenmektedir. Nekropside bağırsak içeriği kanlı ve sulu dışkı ile dolu olup, bağırsak mukozasının kalınlaşmış, kırmızı ve havlu saçakları gibi tüylü bir hal aldığı görülmektedir. Yalancı membranlar altında sarımtırak-kırmızımsı ve hemorajik ülserler oluşmuştur. Bağırsakların akut, kataral, ülseröz ve difteroid yangısı şekillenmiştir. Ayrıca mesenterik lenf bezleri büyümüş, anüs mukozası ödemli ve hiperemik görünümündedir. Mukozalar soluk renkte olup, kaşeksi tablosu dikkati çekmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005).

Eimeria bovis ve *E. zuernii* enfeksiyonlarında kalın bağırsakların (sekum, kolon) derin dokularında, diğer türlerde ise; ince bağırsak epitelyumunda lezyonlar oluşmaktadır. *Eimeria bovis*'in 1. nesil merontları (makromerontlar=makroşizontlar) ince bağırsakların distal kısmındaki villusların lenf kanalları epitel hücrelerinde ve mezenterik lenf yumrularında meydana gelmektedir. Makromerontlar 300 (303x281) μm büyüklüğünde olup, bağırsak mukozası üzerinde mat beyaz renkte, darı tanesi şeklinde ve çıplak gözle görülebilmektedir. İkinci nesil merontlara ve gamontlara genellikle cekum olmak üzere, ince bağırsakların distal kısmında ve proksimal kolonda rastlanmaktadır. Enfeksiyonun 16-18. günlerinde ise bağırsak bezlerinin tüm epitel hücreleri 2. nesil meront ve gamontlarla dolu bir hal almıştır. Bunun sonucu bağırsak bezlerinin genişlediği ve subepitelyal hücresel infiltrasyonun olduğu belirtilmiştir. *Eimeria bovis* ve *E. zuernii*'nin sporlanmış ookistlerinin alınmasının 18.

gününden itibaren epitel tahribatı, mukozalarda ödem, epitel üzerinde fibrin birikimi, kapillar damarlarda parçalanma gözlenmektedir. Kanamayla birlikte eritrosit kaybı artmaktadır. Ayrıca bağırsak bezleri rejenere olmaya başlamakta, Lamina propria ile submukoza lenf ve kan damarlarının genişlemesiyle ödematoz bir hal almaktadır. Lamina propria üzerinde kan, fibrin, granülositler, bakteriler ve hücre kalıntılarından oluşan difteroid bir membran oluşmaktadır. *Eimeria ellipsoidalis* gibi daha az patojen türlerin neden olduğu olgularda bağırsaklarda epitel kaybı, mukus artışı ve kataral bir yangı görülmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).

Sığırlarda intestinal coccidiosisden başka *hepatik coccidiosis* de görülmektedir. Buzağılarda safra kanalı epitel hücrelerinde ve safra kanalı lumeninde coccidiaların merontlarına rastlanmıştır. Bu tip olgular nadir olarak görülmekte ve hastalık hepatik coccidiosis olarak değerlendirilmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Collins et al., 1988).

2.4 Sığır Coccidiosis'inde Tanı

2.4.1 Konvansiyonel Morfolojik Tanı

Coccidiosis teşhisinde hayvanın klinik durumu ve yaşı dikkate alınması gerekmektedir. Buzağılarda kanlı olmayan ishal olguları, klinik olarak non-spesifik kabul edilmektedir. Ayrıca kanlı, mukuslu ya da fibrinli diyare olguları ise diğer birçok hastalıkları akla getirebilmektedir. Bunun için hayvanın yaşı, bulunduğu ortam, hijyen durumları ve klinik bulgular değerlendirilmelidir. Buzağı ve danalarda klinik belirtiler ve dışkı kıvamı tanıda önemli olup, dışkı kıvamına göre; normal (0), yumuşak (1), diyareli (2), diyareli ve doku artıklı (3), diyareli, kanlı ve doku artıklı (4) olarak sınıflandırılmaktadır. Hastalığın tanısında çeşitli yoğun solüsyonlar (NaCl, ZnSO₄ ZnCl₂, NaNO₃ ve Şeker solüsyonu) kullanarak flotasyon yöntemi ile dışkı incelemesi yapılmaktadır. Dışkı muayenesinde içinde sporontları bulunan sporlanmamış ookistler görülerek tanı koyulmaktadır. Enfeksiyon şiddetini belirlemek için McMaster tekniği ile de bir gram dışkıdaki ookist sayıları belirlenmektedir. Hastalığa neden olan *Eimeria* türlerinin ayırıcı tanımı için ise dışkı örnekleri %2,5'luk potasyum dikromat solüsyonu (K₂Cr₂O₇) içinde 27°C'de tutularak ookistlerin sporlanmaları sağlandıktan sonra flotasyon yöntemleri kullanılarak *Eimeria* tür tanımı yapılabilmektedir (Arslan, 1995; Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).

Sığırlarda coccidiosisin tanısında dışkı muayenesinde sporlanmamış ookistlerin morfolojik yapılarına göre deneyimli kişilerce teşhis konulabilmektedir. Ancak bazı türlerin tanısında,

miks enfeksiyonlarda yâda tipik ookistlerin olmaması durumunda kesin etiyolojik tanı için sporlandırma işlemi yapılması gerekmektedir. Sporlanmış ookistlerin morfolojik özellikleri dikkate alınarak tür identifikasyonları yapılmaktadır. Ookistin şekli, rengi ve büyüklüğü tanıda önemli sayılmaktadır (Arslan, 1995; Arslan and Sarı, 2013; Dauschies and Najdrowski, 2005).

Coccidiosis tanısında bazı kriterlerin gözden kaçırılmaması gerekmektedir. Örneğin; dışkıda ookist görülmesi coccidiosis anlamına gelmemektedir. Patojen türlere ait ookistlerin yoğun olması ve klinik olarak da kanlı ishalin görülmesi coccidiosis olma ihtimalini arttırmaktadır. Dışkıda ookistlere rastlanmaması da coccidiosis olmadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü *E. zuernii* ve *E. bovis* enfeksiyonlarında ookistler atılmadan önce patolojik lezyonlar oluşmaktadır. Teşhisi desteklemek için nekropsi sonucu bağırsaklardaki makroskobik lezyonlar incelenmelidir. *Eimeria* türlerinin gelişme dönemleri olan meront ve gamontlar yönünden de histopatolojik preparatlar hazırlanıp mikroskobik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Sığırlarda coccidiosis kesin teşhisi için nekropsi yapılması ekonomik olmadığından önerilmemektedir. Ancak hastalığa bağlı ölüm olayları varsa, bu durumda nekropsi yapılabilmesi önerilmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Levine, 1985).

Klinik olarak kanlı ishal görülmesi, bir gram dışkıdaki ookist sayısı (OPG) 5.000-10.000 üzerinde olması ve patojen türlere ait ookistlerin belirlenmesi klinik coccidiosis olgularına işaret sayılabilmektedir (Soulsby, 1986). Ancak klinik belirtiler ve bir gram dışkıda yüksek sayıda (50.000-500.000) ookist olması klinik coccidiosis olarak değerlendirilmektedir (Kaufmann, 1996). *Coccidia* ookistleri iki haftalıktan itibaren buzağların dışkılarında görülmeye başlamaktadır. Genellikle bir aylık olduklarında ookist yoğunluğu artmaktadır. Klinik olarak yumuşak dışkı veya kanlı ishalleri olan hayvanlarda ookist sayısının normal dışkı olanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Arslan, 1997; Arslan and Tüzer, 1998).

2.4.2 Serolojik Tanı

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

bulundurulması gerekmektedir (Arslan and Sarı, 2013; Jolley and Bardsley, 2006; Lassen, 2009).

2.4.3 Ayırıcı Tanı

Sığırlarda coccidiosisin ayırıcı tanısı yapılırken özellikle diyare ile seyreden *Escherechia coli*, *Salmonella* spp., Clostridial enteritis, *Campylobacter* spp., Rota virus, Corona virus, Bovine Viral Diyare, giardiosis, cryptosporidiosis ve intestinal helminthosis gibi enfeksiyonların da dikkate alınması gerekmektedir (Arslan and Sarı, 2013).

2.5 Konak-Parazit İlişkilerinde Evrimleşme Süreci ve Popülasyon Yapısı

Parazitlerde popülasyon yapısı sıklıkla konak-parazit ilişkilerinde birlikte evrimleşme süreciyle beraber seyretmektedir. Kelebek veya sinekkuşu gibi tozlaştırıcılarla bitkiler arasındaki akrabalık ilişkisi karşılıklı evrimleşmenin tipik örnekleri arasındadır (Cotton, 1998). Yine benzer şekilde parazitlerle konakları arasındaki karşılıklı evrimleşme de en tipik ve en sık çalışılan evrimleşme konularından biridir (Stefka et al., 2009; Xiao et al., 2002). Bu akrabalık ilişkisindeki her bir canlı diğerinin üzerinde seçici bir baskı oluşturmakta olup bu durum her bir canlının evrimini dolaylı olarak etkilemektedir. Parazit ve konakları arasındaki uyumluluk veya uyuşmazlık durumunun arkasında dört tip karşılıklı evrimleşme olayı tanımlanmıştır: cospeciation (konak ve parazit arasındaki eş zamanlı evrimleşme), duplikasyon (parazitlerin atalarıyla bağlantılı olarak bağımsız evrimleşmesi), tasnif olayları (konak nesillerinde parazitlerin gözden kaybolması veya neslinin yok olması) ve konak aktarımı (yeni bir konağın kolonizasyonu) (Legendre et al., 2002; Page and Charleston, 1998). Bu olayların başarıyla gerçekleşmesi, Brook'un parsinomy analizi, komponent analizi veya ağaç haritası gibi çeşitli metotlarla yapılan çalışmalarla birlikte kompleks bir karşılıklı evrimleşme süreciyle mümkün olabilmektedir. Bu olaylar konak ve parazit filogenileri/genolojileri arasındaki uyumluluğun tüm derecelerini belirleyebiliyorken, her bir popülasyonun yapısı ve popülasyon genetikleri doğal seleksiyon (bazı türlerin hayatta kalışı), genetik eğilim (rastgele örnekleme sebebiyle oluşan değişiklikler), mutasyonlar (DNA dizilimlerindeki değişiklikler) ve gen akışı (popülasyonlar arasında genlerin değişimi) gibi önemli evrimleşme süreçlerinden etkilenmektedir. Gen akışı, reproduktif izolasyonla kısıtlanabilmekte olup buzul çağındaki olaylar buna örnek verilebilir (Webb and Bartlein, 1992).

Dördüncü çağa ait periyotta Orta Avrupa'dan farklı gruplardaki birçok organizm güney buzul bölgesine göç etmiştir. Bu türler birbirlerinden izole edilmiş ve farklı allopatric evrimleşme ve farklılaşmalara maruz kalmıştır. Buzul çağı bittikten sonra bu organizmler tekrar geri dönmüş, birbirleriyle karışmış ve gen akışı sonucu yeni türler olarak farklılaşmışlardır. Bu olaylar, mevcut Avrupa faunasının oluşumunu belirlemiştir.

2.6 Moleküler Çalışmalarda Coccidia Etkenlerinin Model Organizmler Olarak Kullanımı

Coccidia etkenleri (Apicomplexa: Conoidasida: Eucoccidiorida), Apicomplexa (Chromalveolata: Alveolata) anacındaki en çeşitli ve farklılaşmış organizmlerdir. Coccidia türleri tüm omurgalılarda bulunabilmekte olup ayrıca omurgasızlarda da tarif edilmişlerdir (Duszynski and Upton, 2001). Bu geniş filum, insan ve hayvanlarda görülen önemli patojenlerden bazılarını (*Babesia*, *Theileria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria*) kapsamaktadır. Bu filum içerisinde Sarcocystidae ve Eimeriidae ailelerindeki türler monofiletik organizmlerdir. Tüm coccidia türleri arasında *Eimeria* soyu, dünyanın farklı bölgelerinde farklı konaklardan tanımlanan 1700'ü aşkın türle en geniş grubu oluşturmaktadır. *Eimeria* soyu paraphletic bir soy olup *Cyclospora* ve çeşitli *Isospora* türleriyle aynı clade'te yer almaktadır. *Isospora* soyu ise poyphyletic olup Eimeriidae ailesinde kuşlardan bildirilen türlerle ve Sarcocystidae ailesinde memelilerden bildirilen türlerle aynı clade'te bulunmaktadır (Modry et al., 2001; Morrison et al., 2004).

2.6.1 Coccidian Parazitlerin Taksonomisi, Evrimi ve Filogenileri

Coccidian parazitler esasen sporlanmış ookistlerin morfolojik olarak değerlendirilmesiyle identifiye edilmektedirler (Lassen, 2009; Levine, 1985). Bununla birlikte morfolojik olarak yapılan böyle sınıflandırmalar, tür içinde ookist morfolojileri çok farklılık gösterebildiği için sıklıkla zor olabilmektedir (Duszynski and Upton, 2001). Sporlanmış ookistlerin iç yapısında bulunan ookist kalıntısı dikkat çekicidir. Sporulasyon süreci boyunca görülen bu yapının zigotun sitoplazmasından ayrılan lipid granülleri olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar bazı *Eimeria* türleri bu kalıntıya sahipken neden diğer türlerin bu kalıntıyı taşımadıkları anlaşılamamış olup bu yapının fonksiyonunun ne olduğu da bilinmemektedir. İlginç bir şekilde sığırları, koyunları, domuzları, tavuk ve hindileri enfekte eden tüm *Eimeria* türlerinde ve yılanları enfekte eden türlerin ise %75'inden fazlasında ookist kalıntısı bulunmamaktadır (Zhao and Duszynski, 2001). ORF 470, 23S rRNA ve nükleer 18S rRNA genlerinin sekanslanması

sonucu ookist kalıntısının filogenetik akrabalık çalışmalarında önemli olduğu kanıtlanmıştır (Kvicerova et al., 2008; Zhao and Duszynski, 2001). Bu durum, rodentlerdeki *Eimeria* türlerinin iki farklı neslinin olduğu hipotezini desteklemektedir (Zhao and Duszynski, 2001). Bu iki nesil sporlanmış ookistlerdeki morfolojik farklılıkları yansıtmaktadır. Reduker ve ark. (1987) ookist kalıntısına sahip olan ve olmayan her iki neslin konaklarının ortak atalarındaki kardeş taksonlardan köken aldığını hipotez etmişlerdir. Escalante ve Ayala'ya (1995) göre, coccidia türleri 800 milyon yıl önce farklılaşmıştır. Bu durum şu soruyu akla getirmektedir ki *Eimeria* türlerinin ortak ataları ya zaten ookist kalıntısına sahipti ya da bu yapı evrim sürecinde şekillendi. Eğer ikinci teori doğruysa bu kaç yıl önce gerçekleşti?

Moleküler teknikler ve sekanslamanın keşfi ve kullanımı coccidian parazitlerin sistematiklerini ve taksonomilerini etkilemiştir. Bu parazitlerin filogenik analizleri amacıyla çeşitli marker ve genler denenmiş ve çalışılmıştır. Örneğin apicoplast gen sekansları nükleer genlere göre çok daha değişken olup bu özellikleri filogenetik çalışmalarda daha sağlam bilgilerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Apicoplastlardan SSU rRNA gen bölgesinin analizleri sonucu coccidian parazitlerin haemosporidianlarla kardeş grupta yer aldıkları görülmüştür. Coccidian parazitleri Eimeriidae ve Sarcocystidae olmak üzere iki ana nesile ayrılmaktadır (Obornik et al., 2002).

Nükleer 18S rRNA (SSU) gen bölgesi sıklıkla Apicomplexa anacındaki türler arasındaki filogenetik akrabalıkların analizlerinde kullanılmaktadır (Morrison et al., 2004). SSU rRNA geni apicomplexan parazitlerin genomlarında çok miktarda bulunmaktadır. Bu gen bölgesi, ökaryotlardaki filogenetik akrabalıkların ortaya çıkarılmasında oldukça uygun bir bölgedir (Dahlgren et al., 2008). *Eimeria* soyundaki türlerin filogenetik benzerliklerinin ortaya koyulmasında gerek nükleer 18S rDNA gerekse plastid 23S rDNA gen bölgelerinin oldukça uygun markerlar oldukları kanıtlanmıştır. Bunun yanında bu gen bölgeleri yüksek düzeyde korunmuşluk özelliğine sahip olup *Eimeria* soyundaki türler içerisindeki intra spesifik değişikliklerin belirlenmesinde uygun marker değildirler. Benzer sonuçlar plastid ORF 470 gen bölgesinin sekans analizlerinde de elde edilmiştir (Barta et al., 1997; Zhao and Duszynski, 2001).

Mitokondriyal genlerin farklı organizmlerin evrimsel akrabalıklarının analizlerinde uygun markerlar olduğu ispatlanmış olup birçok evrimsel çalışma bu gen bölgesi üzerine dizayn edilmiştir. Mitokondriyal genler uzun bölgeler olmayıp intron taşımamakta ve kısa intergenik

bölgeler ihtiva etmektedir. Nükleer genlerin aksine mitokondriyal genler tür içi spesifik farklılıkların belirlenmesi için gerekli olan değişken bölgelere sahiptir. Bilinmesi gereken en önemli nokta şudur ki mitokondriyalar sadece maternal lineage içerisinde atadan aktarılmakta olup radikal kombinasyonlara maruz kalmamaktadırlar. Günümüze kadar, metazoonların complete mitokondriyal genomlarının birçok sekansı araştırmalarla ortaya konulmuştur, fakat bunlardan sadece birkaç tanesi parazitik protozoonların sekanslarına aittir (Hikosaka et al., 2011; Lin et al., 2011).

Çalışılmış diğer markerların (örn. internal transcribed spacer region – ITS, riboprinting, isoenzymes, microsatellites, random amplified polymorphic DNA) coccidian parazitler arasında veya içerisindeki filogenetik yakınlıkların belirlenmesindeki etkinlik düzeyleri henüz tam olarak kanıtlanamamıştır (Ogedengbe et al., 2011).

2.7 Sığır *Eimeria* Türleri Üzerine Moleküler ve Filogenetik Çalışmalar

Günümüze kadar ookist morfolojisine dayalı identifikasyon, sığırlarda coccidiosis'e yol açan türlerin ayrımında kullanılan yaygın tek yöntemdir (Dauguschies and Najdrowski, 2005). Sığır coccidial ookistlerinin detaylı morfolojisi Levine ve Ivens (1967, 1970) tarafından tarif edilmiş ve bu teşhis anahtarları tür teşhisine yönelik birçok çalışmada refere edilmiştir (Faber et al., 2002; Oda and Nishida, 1990; Sanchez et al., 2008). Ancak morfoloji tabanlı tür teşhislerinin, birçok türün karışık özellikler göstermesi ve tür içi varyasyonların varlığı dolayısıyla güvenilirliğinin yeterli olmadığı da belirtilmiştir (Kawahara et al., 2010). Morfolojik tabanlı teşhis ayrıca deneyimli kişilere gereksinim göstermekte, yoğun emek ve zaman alıcı olmaktadır (Long and Joyner, 1984). Moleküler tabanlı teşhis yöntemleri son yıllarda bir çok paraziter enfeksiyonun spesifik teşhisinde ve genotiplemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak sığır coccidia etkenlerinin teşhisi ve moleküler karakterizasyonu üzerine çalışmaların oldukça sınırlı olduğu dikkati çekmektedir. Li ve ark (2007), Çin'de sığırlarda *Cyclospora* ve patojenik *Eimeria* türlerinin (*E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii*) ayrımı amacıyla, elde ettikleri izolatların 18S rRNA gen sekanslarını filogenetik olarak analiz etmişler, *Cyclospora* ve ruminant *Eimeria* türlerinin bu gen bölgesine göre sekans ve RFLP analiz yöntemleri ile ayrılabilceğini kaydetmişlerdir. Aynı araştırmacılar (Li et al., 2007)(Li ve ark., 2007) GenBank'a kaydettikleri sınırlı sayıdaki sığır patojenik *Eimeria* türlerine ait izolatların sekans analizi sonucunda ise 18S rRNA gen bölgesine göre türler arası varyasyonun düşük olduğunu ve bu gen bölgesi hedef alınarak PCR tabanlı yöntemlerin sığır *Eimeria*

türlerinin ayrımında yeterli olmayacağını hipotez etmişlerdir. Bunun yanında Kaya (1998), Bristol/İngiltere’de koyunlardan izole edilmiş patojenik 6 *Eimeria* türünün (*E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. ahsata*, *E. weybridgensis*, *E. faurei* ve *E. bakuensis*) moleküler filogenisi üzerine araştırmalarda bulunmuş, 18S rRNA gen bölgesine göre türler arasında yüksek homoloji görülmesinden dolayı tür bazlı teşhiste bu gen bölgesinin yeterli olmayacağını ileri sürmüştür. Ayrıca aynı araştırmacı (Kaya, 1998) 18S rRNA sekans analizlerine göre koyunlardaki *Eimeria* türlerinin monofiletik grupta yer aldığını, bu türlerin diğer bir grupta yer alan kanatlı *Eimeria* türlerinden filogenetik farklılığının yüksek olduğunu, *E. bovis* ile ise daha yakın olduğunu göstermiştir. Kokuzawa ve ark. (2013), Japonya’da sığırlardan izole edilmiş farklı 10 *Eimeria* türüne ait izolatları 18S rRNA sekansları temelinde filogenetik olarak incelemişler, izolatların tür bazlı olarak 3 monofiletik grupta yer aldığını ve her grupta yer alan türlere ait izolatların da benzer ookist morfolojisi göstermediğini belirlemişlerdir.

Sığırlarda patojenik *Eimeria* türlerinin konvansiyonel PCR ile ayrımı üzerine günümüze kadar yalnızca Japonya’da sığırlardan izole edilmiş patojenik *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii* türleri üzerine yalnızca bir çalışmanın (Kawahara et al., 2010) varlığı görülmektedir. Bu çalışmada (Kawahara et al., 2010) söz konusu türlere ait toplam 21 izolatın ITS-1 gen bölgeleri filogenetik olarak analiz edilmiş, pairwise alignment sonuçlarına göre aynı türe ait izolatlar arasında %90’nın üzerinde yüksek homoloji görüldüğü, *E. bovis* ve *E. zuernii*’nin aynı küme (cluster) içinde birbirine çok yakın olduğu görülürken, bu clusterın *E. alabamensis* ile birlikte *E. auburnensis*, *E. cylindrica* ve *E. ellipsoidalis* bulunduran majör sığır coccidia clusterından genetik olarak daha uzak olduğu kaydedilmiştir. Aynı çalışmada (Kawahara et al., 2010) tür bazlı spesifik teşhis için primer setlerinin dizaynında, ITS-1 gen bölgesinin yeterli inter-spesifik sekans varyasyonu gösterdiği saptanmış ve PCR tabanlı bu gen bölgesini hedef alan teşhis yönteminin *Eimeria* türlerinin saptanması ve ayrımında konvansiyonel ookist morfolojisini belirlemeye yönelik identifikasyondan daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. *Eimeria* türlerinde mt-COI gen bölgesi üzerine çalışmaların (Ogedengbe et al., 2011; Schwarz et al., 2009) oldukça sınırlı olduğu, sığır *Eimeria* türleri üzerine ise filogenetik çalışmaların henüz bulunmadığı görülmektedir. Bununla beraber Ogedengbe ve ark.nın (2011) kanatlı *Eimeria* türleri üzerine yürüttükleri çalışmada *E. zuernii*’ye ait bir izolatın (GenBank aksesyon: HM771687) mt-COI gen bölgesi karakterize edilmiş ve kanatlı türleriyle birlikte filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Saha Çalışmaları

3.1.1 Araştırma Sahası ve Dışkı Örneklerinin Toplanması

Çalışma, 2013-2015 yılları arasında İç Anadolu Bölgesinin Kayseri, Nevşehir, Yozgat ve Kırşehir illerindeki halk elinde yetiştiriciliği yapılan çeşitli sığırcılık (süt ve besi) işletmelerindeki farklı yaş, cinsiyet ve ırklara ait sığırlar üzerinde yürütülmüştür. Dışkı örnekleme yapılan sığırların illere ve çeşitli faktörlere göre dağılımları Tablo 3.1’de verilmiştir.

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

Araştırma Yöresi	Sığır sayısı										
	Yaş			Cinsiyet		İrk					Toplam
	≤3 ay	4- 12 ay	>12 ay	Erkek	Dişi	Holstein	Simental	Montofon	Yerli	Melez	
Kayseri	50	132	172	135	219	97	91	85	48	33	354
Nevşehir	26	53	102	73	108	48	45	44	33	11	181
Yozgat	25	50	115	72	118	56	46	39	30	19	190
Kırşehir	22	58	115	85	110	47	50	48	38	12	195
Toplam	123	293	504	365	555	248	232	216	149	75	920

Hayvanların rektumundan tekniğine uygun şekilde alınan dışkı örnekleri, steril dışkı kaplarına aktarılarak, protokol kayıtları yapılmış ve soğuk zincirde laboratuvara intikalleri sağlanmıştır. Örneklenen her bir hayvana ait dışkı numunesi 180 ml steril dışkı kabı içerisine %2,5 w/v potassium dichromate ile 2/1 oranında (100 ml potassium dichromate 50gr dışkı örneği) karıştırılarak konulmuştur (Duszynski and Wilber, 1997). Ayrıca aynı hayvanlara ait örnekler sulandırılmadan direkt olarak ayrı steril bir dışkı kabı içerisine de alınmıştır. Toplanan dışkı örneklerinin karakterleri incelenmiş ve kıvamlarına göre a) normal, b) ishalleri c) kanlı ishalleri (Lassen and Jarvis, 2009) olarak kayıt altına alınmıştır.

3.2 Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi

Laboratuvara getirilen örnekler *Eimeria* ookistleri yönünden analize tabii tutulmuştur. Bu basamakta standardizasyon açısından hem potassium dichromatlı hem de direkt dışkı örneklerinden alınan numuneler çöktürme ve/veya yüzdürme basamaklarına tabii tutularak ookistler yönünden incelenmiştir. Dışkı örneklerinden 3 gr tartılmış doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution) (spesifik gravite: 1,27) (Duszynski and Wilber, 1997) ile homojen hale getirilerek steril gazlı bezler yardımıyla 50ml falcon tüplerine süzölmüştür. Tüpler üzerine lamel kapatılarak 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş sonrasında oda ısısında 5 dk beklenerek lameller lam üzerine alınıp ışık mikroskobunda ookistler yönünden incelenmiştir. İnceleme esnasında tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak 5-10 dk beklenmiş ve akabinde ikinci lamel de incelemeye tabii tutulmuştur.

Potassium dichromatlı örneklerin incelenmesinde Gajadhar (1994) tarafından bildirilen yöntemin modifiye edilmiş versiyonu kullanılmıştır. Eşit hacimde dışkı numunesi olmak üzere potassium dichromatlı örneklerden 9 ml alınarak steril gazlı bezler yardımıyla 50ml falcon tüplerine süzölmüş ve üzeri deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda tüpte 2 ml sediment bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmıştır. Yıkama işlemi aynen bir kez daha tekrar edilmiş ve falcon tüp içerisindeki 2 ml sediment homojen hale getirilip 15ml santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler yüzeyine kadar doymuş şekerli su ile doldurulmuş, bombe oluşturularak lamel kapatılmıştır. 1500 rpm'de 10 dk santrifüje tabii tutulan tüpler üzerinden, lamel altındaki damla düşürülmeden alınarak ışık mikroskobu altında incelemeye tabii tutulmuştur. İnceleme süresince tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak 5-10 dk beklenmiş ve akabinde ikinci lamel de incelemeye tabii tutulmuştur.

3.2.2 Gram Dışkıdaki Ookist Sayısının (OPG) Belirlenmesi

Eimeria ookistleri yönünden pozitif bulunan dışkı örneklerinde gram dışkıdaki ookist sayısının (OPG) belirlenmesinde Velkers ve ark. (2010) tarafından tarif edilen teknik modifiye edilerek kullanılmıştır. 6 ml potasyum dicromatlı dışkı örneği 50 ml falcon tüp içerisine alınmış, üzerine 20 ml doymuş tuzlu su (151 g/l, specific gravity 1,1) ilave edilerek homojen hale getirilmiştir. Bu tüpten 2 ml alınarak kapaklı plastik santrifüj tüplerine konulup üzerine 8 ml doymuş tuzlu su (311 g/l, specific gravity 1,2) ilave edilerek karıştırılmıştır. Buradan pipet ile McMaster

lamının iki gözü doldurularak en az 5 dk beklenmiş ve ookist sayımı her iki gözde yapılmıştır. Gram dışkıdaki ookist sayısı (OPG): $333.3ab/\text{örnek}$ miktarı formülüyle belirlenmiştir (a: Ookist sayısı; b: Sulandırma katsayısı; örnek miktarı 2gr; pozitif örneklerde sayım kamerasında ookist saptanmaması durumunda OPG değeri 50 alınmıştır).

3.2.3 *Eimeria* Ookistlerinin Sporlandırılması ve Tür Teşhisleri

Coccidiosis yönünden pozitif belirlenen sığırlarda *Eimeria* türlerinin teşhisi amacıyla potassium dichromatlı dışkı örnekleri, Rind ve Brohi (2001) tarafından tarif edilen yöntemin modifiye edilmesiyle sporlandırma prosedürüne tabii tutulmuştur. Buna göre potasyum dicromatlı dışkı örneğinden karıştırıldıktan sonra 10 ml alınarak steril gazlı bez yardımıyla 50 ml falcon tüpe süzölmüştür. Üzerine 50ml olacak şekilde deiyonize su eklenip 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda 2 ml bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmış ve 2 ml çöküntü üzerine 30ml’ye tamamlayacak şekilde %2,5 Potassium dichromat solüsyonu eklenmiştir. Tüpler 30°C etüve konulup günde en az 5 kez steril bagetler yardımı ile karıştırılarak oksijen akışı sağlanmıştır. 4. günün sonunda tüpler tekrar oda ısısında 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda 2ml bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmıştır. Buradan alınan örnekler mikroskop altında sporulasyon açısından kontrol edilmiştir. Sporulasyonun yetersiz olması durumunda tüp üzerine tekrar 30ml olacak şekilde %2,5 Potasyum dicromat solüsyonu eklenmiş ve sporulasyona bırakılarak 7. gün tekrar kontrol edilmiştir. Sporulasyon sonrası ookistler yoğunlaştırılarak digital görüntüleme sistemiyle mikroskopta incelenmiş ve protokol kayıtlarına göre görüntülenip ilgili teşhis anahtarlarına (Courtney et al., 1976; Levine, 1985; Levine and Ivens, 1970; Zhang et al., 2000) göre tür teşhisleri yapılmıştır.

3.2.4 Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Çoklu Ookist DNA İzolasyonu

Eimeria oocytleriyle pozitif belirlenen dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonunda Lalonde ve Gajadhar (2008) tarafından bildirilen teknik modifiye edilerek kullanılmıştır. Sporlandırılmış ve mikroskopik analizleri yapılmış örneklerden alınan yaklaşık 15 ml potasyum dichromatlı süspansiyon (~5gr dışkı örneği) steril gazlı bezler yardımıyla 50 ml steril falcon tüplere süzölmüş ve üzeri steril deiyonize su ile 50 ml’ye tamamlanmıştır. Tüpler 4500 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası dipteki tortu oynatılmadan süpernatant atılmış ve

tüpler tekrar 50 ml steril deiyonize su ile tamamlanarak santrifüj işlemi aynen tekrar edilmiştir. Son santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tortu üzerine 10 ml steril doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution; spesifik gravite: 1,27) ilave edilerek tortu çözündürülmüş ve homojen hale getirilmiştir. Süspansiyon daha sonra 15 ml santrifüj tüplerine aktarılmış ve doymuş şekerli su ile toplam hacim 15 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpler üzerinde doymuş şekerli su ile bombe oluşturularak lamel kapatılmış ve maksimum yoğunlaşma için 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda lamel kaldırılarak altındaki damla steril deiyonize su ile (toplam hacim 150 µl) 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yikanmıştır. Yıkama işlemleri sırasında tüplerin üzeri tekrar lamel ile kapatılmış ve 5 dk süre ile beklendikten sonra aynı hacimde aynı ependorf tüpler içerisine yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ependorf tüpler steril deiyonize su ile 2 ml'ye tamamlanarak ultra santrifüjde 15.300 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek ookistlerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında dikkatlice süpernatant uzaklaştırılarak ependorf tüp içerisinde 120 µl hacimde ookist süspansiyonu bırakılmıştır. Genomik DNA izolasyonuna geçmeden önce her bir örneğe ait ookist süspansiyonu spin-vortekslenerek homojenize hale getirildikten sonra 10'ar µl iki kez örnek alınarak lam lamel arasında ışık mikroskopunda ookistlerin varlığı yönünden konfirme edilmiş ve ookist sayımı yapılmıştır. Sonraki basamakta, elde edilen ookist süspansiyonları birer dakika olmak üzere 8 siklus sıvı azot ve kaynar suda tutularak ookistlerin parçalanması sağlanmıştır. Sonrasında tüpler 0,5 mm glass beads ile 5 dk homojenizatörde (Tissue Lyser LT; Qiagen) mekanik parçalanmaya tabii tutulmuştur. Daha sonra süspansiyon genomik DNA ekstraksiyon kitleri (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific; QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen) ile DNA ekstraksiyonuna basamaklar modifiye edilerek alınmıştır. Final basamakta elüsyon 30 µl'ye ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir. Örneklerle ait genomik DNA'lar kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tek Ookist DNA İzolasyonu

Eimeria oocystleri ile pozitif örneklerden tek ookist izolasyonu ve genomik DNA ekstraksiyonu için Wang ve ark.nın (Wang et al., 2014) tavşanlarda *Eimeria* türleri için geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla yukarıda da bahsedildiği gibi öncelikle *Eimeria*

ookistleri yönünden pozitif, sporlandırılmış ve mikroskopik analizleri yapılmış örneklerden yaklaşık 15 ml potasyum dichromatlı süspansiyon (~5gr dışkı örneği) alınarak steril gazlı bezler yardımıyla 50 ml steril falcon tüplere süzölmüş ve üzeri steril deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası dipteki tortu oynatılmadan süpernatant atılmış ve tüpler tekrar 50 ml steril deiyonize su ile tamamlanarak santrifüj işlemi aynen tekrar edilmiştir. Son santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tortu üzerine 10 ml steril doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution; spesifik gravite: 1,27) ilave edilerek tortu çözdürölmüş ve homojen hale getirilmiştir. Süspansiyon daha sonra 15 ml santrifüj tüplerine aktarılmış ve doymuş şekerli su ile toplam hacim 15 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpler üzerinde doymuş şekerli su ile bombe oluşturularak lamel kapatılmış ve maksimum yoğunlaşma için 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda lamel kaldırılarak altındaki damla steril deiyonize su ile (toplam hacim 150 µl) 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yıkanmıştır. Yıkama işlemleri sırasında tüplerin üzeri tekrar lamel ile kapatılmış ve 5 dk süre ile beklendikten sonra aynı hacimde aynı ependorf tüpler içerisine yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ependorf tüpler steril deiyonize su ile 2 ml'ye tamamlanarak ultra santrifüjde 15.300 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek ookistlerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant dikkatlice uzaklaştırılarak ependorf tüp içerisinde 120 µl hacimde ookist süspansiyonu bırakılmıştır. Bu basamaktan sonra süspansiyon içerisinden alınan yaklaşık 10-20µl örnek lam-lamel arasına konularak *Eimeria* ookistlerinin varlığı yönünden teyitleri sağlanmıştır. Daha sonraki basamakta oocytleri tek olarak elde etmek amacıyla oocyt süspansiyonundan her defasında homojenize edilerek alınan yaklaşık 1-2 µl süspansiyon 2-3 mm çapında küçük lameller üzerine bir damla halinde konulmuş ve invert mikroskop altında tek ookist varlığı yönünden araştırılmıştır. Yoğun ookist bulunan örnekler için çeşitli sulandırmalar hazırlanmıştır. İlgili yöntemle tek ookist varlığı yönünden konfirme edilen örnekler digital mikroskopik görüntöleme sistemi ile görüntölenmiş ve morfolojik tür teşhisleri sağlanmıştır. Bu basamaktan sonra seri bir şekilde üzerinde tek ookist belirlenen küçük lameller içerisinde 30 µl lysis buffer bulunan 2 ml mikrosantrifüj tüplerine dikkatlice aktararak mikrosantrifüjde 3000 rpm'de iki siklus santrifüje tabii tutulmuştur. Sonraki basamakta elde edilen tek ookist süspansiyonları yukarıda anlatıldığı gibi (sıvı azot/kaynar su + glass beads) mekanik parçalanmaya tabii tutulmuş ve genomik DNA ekstraksiyon kitleri (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific; QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen) ile DNA

izolasyonları yapılmıştır. Final basamakta elüsyon DNA miktarını artırmak amacıyla 20 µl'ye düşürülmüştür. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir. Örneklerle ait genomik DNA'lar kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu

Çoklu ve/veya tek oocistlerden izole edilmiş genomik DNA ekstraktları 18S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu için *Eimeria* soy spesifik primerlerle Nested PCR analizine tabii tutulmuştur. Nested PCR analizlerinin ilk basamağında ilgili gen bölgesinden 3312 bp kısmı amplifiye eden TK2 (5'-GGTTGATCCTGCCAGTAGTC-3') ve ETS2 (5'-AATCCCAATGAA CGCGACTCA-3') primerleri (Kokuzawa et al., 2013), ikinci basamağında ise 1057 bp kısmı çoğaltan Eim18SEIF3 (5'-TCTATGGCTAATACATGCGSA-3') (Yang et al., 2012) ve EMR2 (5'-TGAGTTTCCCCGTGTTGAGT-3') (Hill et al., 2012) primerleri modifiye edilerek kullanılmıştır. Eim18SEIF3 primeri tüm sığır *Eimeria* türlerine ait 18S rRNA dizilimleri ile blast ve alignment analizleri sonucu dejenere primer haline dönüştürülmüştür. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 3µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol birinci PCR basamağında initial denaturation: 95°C'de 4 dk; 40 siklus, denaturation: 95°C'de 30 s, annealing: 50,1°C'de 30 s, extension: 72°C'de 3 dk; final extension: 72°C'de 5 dk olarak ayarlanmıştır. İkinci PCR basamağında ise annealing 56,2°C çıkarılmış, extension basamağı ise aynı derecede 1dk olarak belirlenmiştir. Nested PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Dr. Fumiya Kawahara'dan (Nippon Institute for Biological Science, Japonya) temin edilen referans DNA izolatları ve çalışma süresince elde edilen plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

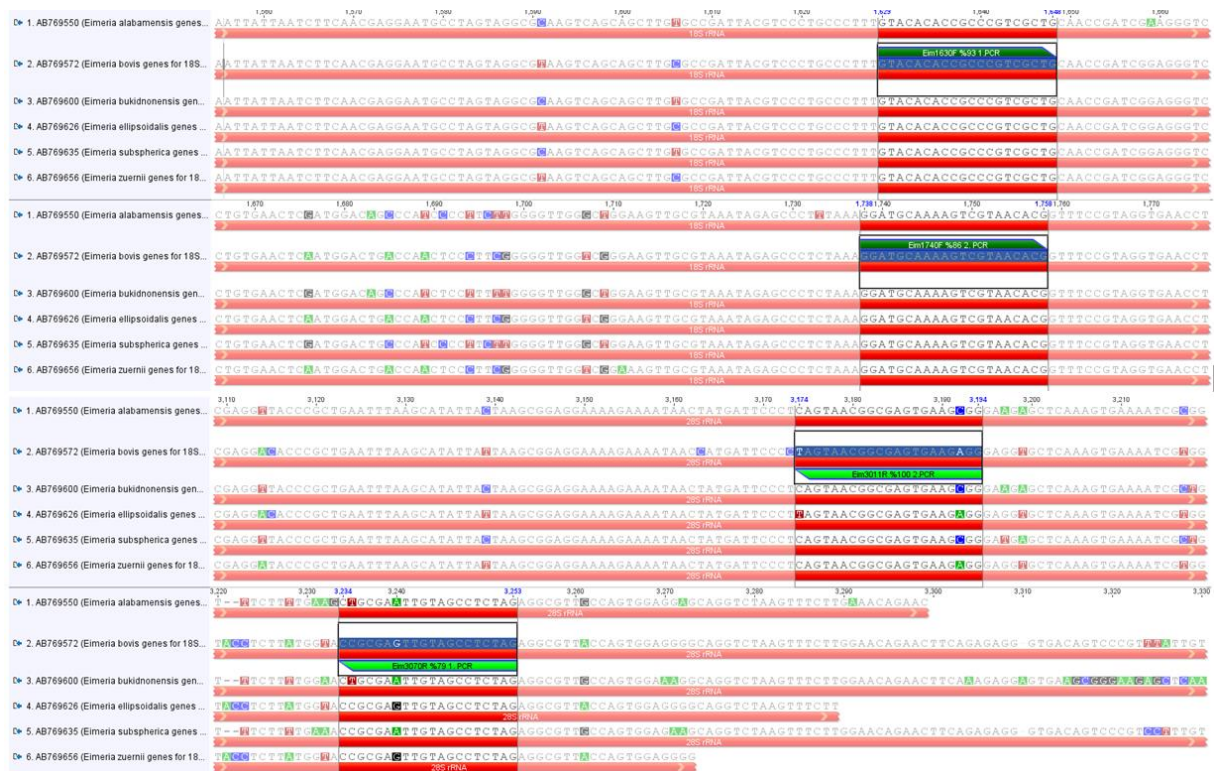
3.2.6 Ribozomal ITS-1 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Ribozomal ITS-1 gen bölgesinin amplifikasyonu için Nested PCR protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu amaçla 1. PCR basamağında Bhaskaran ve ark. (2010) tarafından bildirilen EimITS1CF (5'-AAGTTGCGTAAATAGAGCCCT-3') ve Kawahara ve ark. (2010) tarafından bildirilen ITS1R (5'-CTGCAATTCACAATGCGTATCGC-3') primerleri, 2. PCR basamağında ise aynı araştırmacılar (Bhaskaran et al., 2010; Kawahara et al., 2010) tarafından bildirilen sırasıyla ITS-1F (5'-GCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCG-3') ve EimITS1CR (5'-AGACATCCATTGCTGAAAG-3') primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 20 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 10 µM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 3µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol birinci PCR basamağında initial denaturation: 95°C'de 4 dk; 40 siklus, denaturation: 95°C'de 30 s, annealing: 55°C'de 30 s, extension: 72°C'de 1 dk; final extension: 72°C'de 5 dk olarak ayarlanmıştır. İkinci PCR basamağında ise initial denaturation: 94°C'de 3 dk; 44 siklus, denaturation: 94°C'de 30 s, annealing: 55°C'de 30 s, extension: 72°C'de 1,5 dk; final extension: 72°C'de 7 dk olarak uygulanmıştır. ITS-1 gen bölgesinin nested PCR analizlerinde kullandığımız iç primer çiftinin PCR analizleriyle *Eimeria* türlerine özgü çoğalttığı ampikon büyüklükleri GenBank'ta mevcut izolatlar üzerinde yapılan primer blast ve Genious R8 yazılımı ile analizler sonucu Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA gen bölgesini amplifiye eden nested iç primerlerinin tür bazlı oluşturdukları ampikon büyüklükleri

EIMERIA ITS-1 NESTED PRİMERİ	
E. auburnensis	~487bp
E. cylindrica	~484bp
E. wyomingensis	~463bp
E. canadensis	~435bp
E. bovis	~452bp
E. ellipsoidalis	~451bp
E. zuernii	~476bp
E. alabamensis	~328 bp
E. bukidnonensis	~393 bp
E. subspherica	~318 bp
E. illinoisensis	~446 bp
E. brasiliensis	~370 bp

Ribozomal ITS-1 gen bölgesi amplifikasyonu için yukarıda standart edilmiş primerlerin yanısıra 18S rRNA gen bölgesinden başlayıp 28S rRNA gen bölgesine kadar uzanan ve ITS-1, 5.8S rRNA ve ITS-2 gen bölgelerini complete olarak amplifiye eden Nested PCR primer dizaynı yapılmış ve PCR protokolü geliştirilmiştir. Bu amaçla Nested PCR analizinin ilk basamağında Eim1630F (5'-GTACACACCGCCCGTCGCTG-3') ve Eim3070R (5'-CTAGAGGCTACAAYTCGCRG-3'), ikinci basamağında ise Eim1740F (5'-GGATGCAAAA GTCGTAACACG-3') ve Eim 3011R (5'-CCKCTTCACTCGCCGTTACTA-3') primerleri standardize edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla dizayn edilen primer çiftlerinin GenBank'ta kayıtlı bazı sığır *Eimeria* türlerine ait 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS-2-28S rRNA gen bölgeleri için bağlanma spesifikite Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi reverse primer çiftleri dejenere primer haline getirilerek kullanılmıştır. PCR karışımı yukarıda anlatıldığı şekliyle kullanılmış olup termal profil birinci PCR basamağında initial denaturation: 95°C'de 4 dk; 40 siklus, denaturation: 95°C'de 30 s, annealing: 55°C'de 30 s, extension: 72°C'de 1 dk; final extension: 72°C'de 5 dk olarak ayarlanmıştır. İkinci PCR basamağında ise initial denaturation: 94°C'de 3 dk; 44 siklus, denaturation: 94°C'de 30 s, annealing: 55°C'de 30 s, extension: 72°C'de 1,5 dk; final extension: 72°C'de 7 dk olarak uygulanmıştır. İlgili nested iç primer çiftinin PCR sonucu *Eimeria* türlerine özgü çoğalttığı ampikon büyüklükleri GenBank'ta mevcut izolatlar ve proje kapsamında elde edilen izolatlar üzerinde yapılan primer blast ve Genious R8 yazılımı ile analizler sonucu ayrıca Tablo 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.1 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA amplifikasyonu için dizayn edilen primerlerin GenBank’ta kayıtlı çeşitli *Eimeria* türlerine ait nükleotid sekanslarıyla bağlanma spesifiteleri

Tablo 3.3 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA gen bölgesini amplifiye eden nested iç primerlerinin tür bazlı oluşturdukları ampikon büyüklükleri

1.	TÜR AMPLİFİKASYON	
2.	<i>E. auburnensis</i>	1340bp
3.	<i>E. cylindrica</i>	1398bp
4.	<i>E. wyomingensis</i>	1341bp
5.	<i>E. canadensis</i>	1342bp
6.	<i>E. bovis</i>	1285bp
7.	<i>E.ellipsoidalis</i>	1273bp
8.	<i>E. zuernii</i>	1365bp
9.	<i>E. alabamensis</i>	1003 bp
10.	<i>E. bukidnonensis</i>	1088 bp
11.	<i>E. subspherica</i>	1012 bp

Nested PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Dr. Fumiya Kawahara’dan (Nippon Institute for Biological Science, Japonya) temin edilen referens DNA izolatları ve çalışma süresince elde

edilen plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.7 Patojenik Türler için Ribozomal ITS-1 Gen Bölgesinin Tür Spesifik Amplifikasyonu

Referans genomik DNA izolatları ile birlikte proje çalışmalarında elde edilen plazmid ve genomik DNA izolatları, patojenik *Eimeria* türleri için spesifik olarak bildirilen (Kawahara et al., 2010), ITS-1 geninin *E. alabamensis* için 184 bp kısmını amplifiye eden 5'-CATTACACATTGTTCTTTTCAG-3' forward ve 5'-GCTTCCAAACTAA TGTTCTG-3' reverse; *E. auburnensis* için 295 bp kısmını amplifiye eden 5'-TAAATTGGTGCGATGA GGGA-3' forward ve 5'-GCAATGAGAGAAAGATTTAATA-3' reverse; *E. bovis* için 238 bp kısmını amplifiye eden 5'-TCATAAAACATCACCTCCAA-3' forward ve 5'-ATAATTGCGATAA GGGAGACA-3' reverse; *E. cylindrica* için 304 bp kısmını amplifiye eden 5'-GACATTTAAAAAACCGATTGGT-3' forward ve 5'-GGCTGCAATAAGA TAGACATA-3' reverse; *E. ellipsoidalis* için 148 bp kısmını amplifiye eden 5'-CAACGTTTTTTCCTTTTCCTATCA-3' forward ve 5'-ACTGCGATGAGAGAGAGCG-3' reverse; *E. zuernii* için 344 bp kısmını amplifiye eden 5'-AACATGTTTCTACCCACTAC-3' forward ve 5'-CGATAAGGAGG AGGACAAC-3' reverse primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı her primer çifti için 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, [6 mM MgCl₂ 1. PCR; 3mM MgCl₂ 2. PCR], 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 2 µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 °C'de 3 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 45 s, annealing: 55 °C'de 45 s, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak Nippon Institute for Biological Science, Japonya'dan Dr. Fumiya Kawahara'dan temin edilen bazı patojenik *Eimeria* türlerine (*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*) ait olduğunu belirledikleri genomik DNA örnekleri ile projemiz kapsamında izole edilen referans plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze

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

3.2.8 Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Elde edilen genomik DNA izolatlarında *Eimeria* mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mt-COI) geninin amplifikasyonu için standardize edilen Nested PCR kullanılmıştır. İlk PCR basamağında Ogedengbe ve ark. (2011) tarafından bildirilen ve ilgili geninin 812 bp parsiyel kısmını amplifiye eden Cocci_COI_For (5'-GGTTCAGGTGTTGGTTGGAC-3') ve Cocci_COI_Rev (5'-AATCCAATAACCGCACCAAG-3') primerleri, ikinci basamakta ise 484 bp iç bölgeyi amplifiye eden COIF2 (5'-TAAGTACATCCCTAATGTC-3') ve COIR2 (5'-GTCATCATATGRTGTGCCCA-3') primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları kurulmuş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 10 µM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 3µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen ampikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR basamağı için de initial denaturation: 95°C'de 4 dk; 40 siklus, denaturation: 94°C'de 20 s, annealing: 55°C'de 30 s, extension: 72°C'de 1,5 dk; final extension: 72°C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır. PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak Nippon Institute for Biological Science, Japonya'dan Dr. Fumiya Kawahara'dan temin edilen bazı patojenik *Eimeria* türlerine (*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*) ait olduğunu belirledikleri genomik DNA örnekleri ile projemiz kapsamında izole edilen referans plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.9 18S rRNA, ITS-1 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Klonlanması ve Plazmid DNA izolasyonu

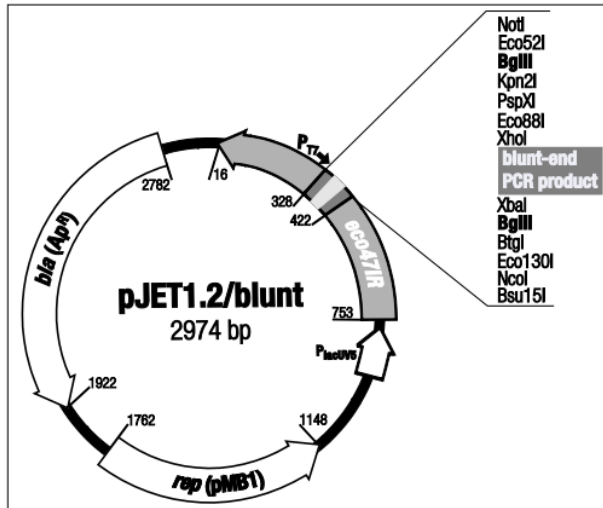
Eimeria türleri ile enfekte bulunan bazı pozitif örneklerle ait çoklu ve tek ookistlerden her üç gen bölgesi için PCR analizleri sonucu elde edilen ampikonlar jel pürifikasyon işlemleri

sonrası sekans ve filogenetik analizler amacıyla klonlama ve plazmid pürifikasyon işlemlerine tabii tutulmuştur.

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

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

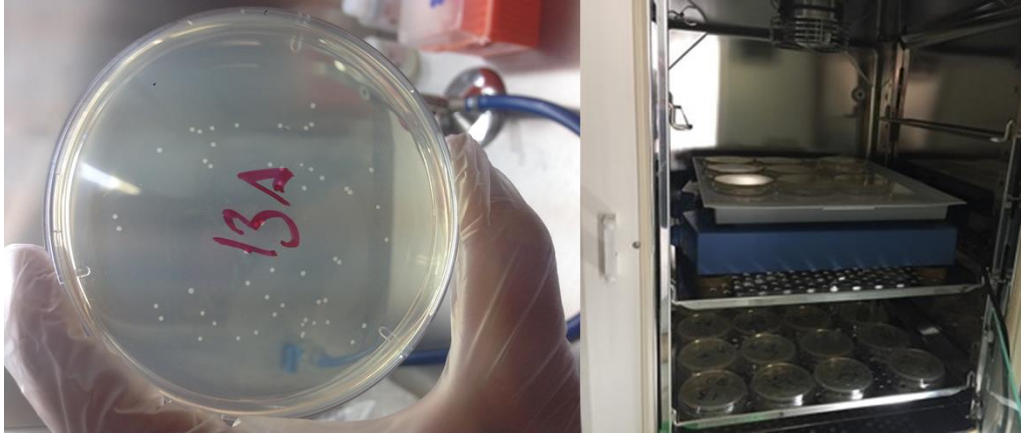
Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır. Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 25 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt Cloning Vector haritası Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 pJET1.2/blunt cloningvector haritası

Klonlama prosedürünün transformasyon basamağında 5 µL'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücreleri üzerine eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonra hücreler önce 42°C'de 2 dk daha sonra buz üzerinde 4 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe

edilen transformasyon karışımı uygun konsantrasyonda ampisilin ihtiva eden LB (Lurie-Bertani) katı besiyeri yerine ekilerek kolonilerin gelişimi için bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden (Şekil 3.3) çoklu oocyst süspansiyonlarından elde edilmiş olan amplikonlar için farklı *Eimeria* türlerine ait hedef DNA’ların insert olabileceği göz önüne alınarak en az 8 koloni seçilmiş ve steril pipet uçları ile bu koloniler alınarak işaretlenmiş LB katı besiyeri içeren pleytler üzerine (her pleyt dörde bölünerek her bölmeye bir koloni geçilmiştir) tekrar ekilerek 37°C’de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.3 LB katı besiyerinde üreyen koloniler

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

Vektör+insert varlığı yönünden konfirme edilen kolonilerden (İşaretlenmiş pleytlerde aynı bölmede bulunan koloniler) en az iki adedi seçilerek steril özeler ile alınmış ve uygun konsantrasyonda ampisilin ihtiva eden 5 ml hacimde LB sıvı besiyerlerine ekimleri yapılarak 37°C’de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Kolonilerin LB sıvı besiyerinde üretilmesi

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

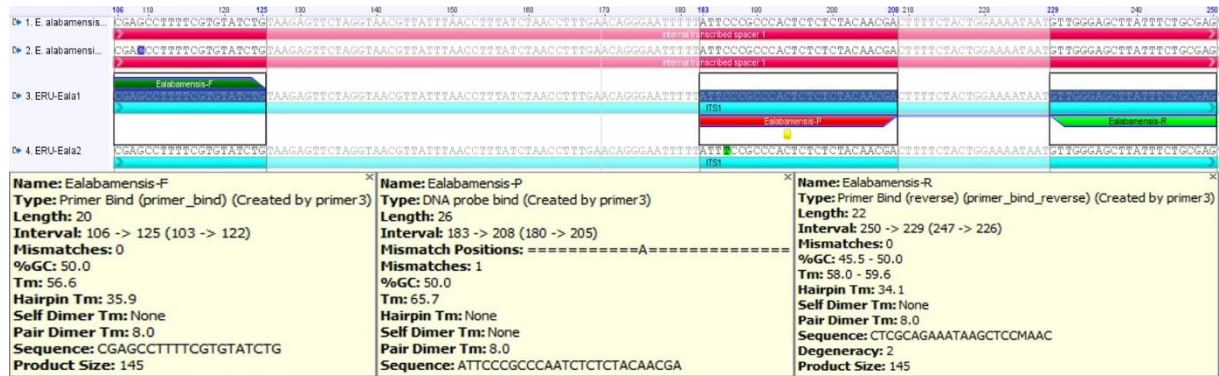
3.2.10 18S rRNA, ITS-1 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizi

Her üç gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA’lar vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious R8 (Kearse et al., 2012) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak, vektör nükleotid dizisi içerisinde, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious R8 yazılımı üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak GenBank’ta mevcut homologları ile çoklu hizalama analizleri yapıldıktan sonra GenBank kayıtları sağlanmıştır. En uygun nükleotid substitüsyon modelinin hesaplanmasında Maximum Likelihood metodundan yararlanılmıştır. Hesaplama sonucunda en düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) puanına sahip Kimura 2-parameter modeli filogenetik ağaçların oluşturulmasında en uygun model olarak belirlenmiştir. Oluşturulan ağacın güvenilirliğinin tespit edilmesinde

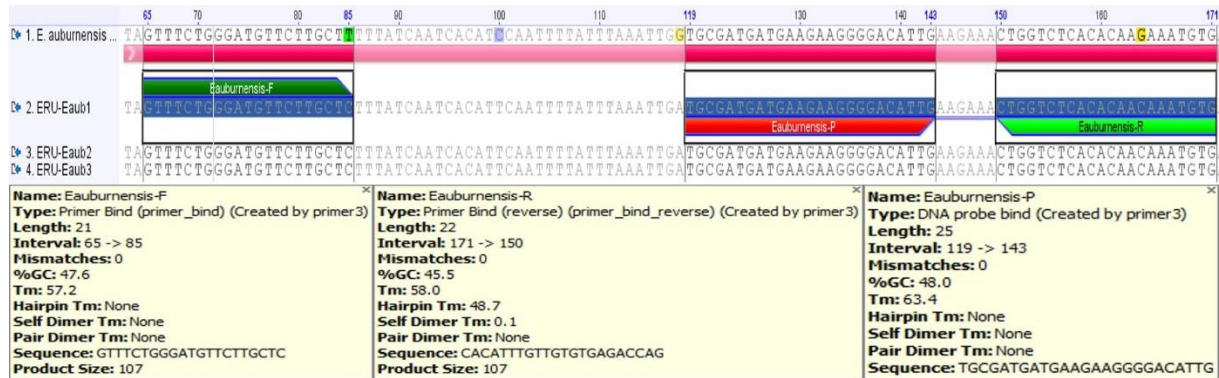
1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır. Filogenetik analizler, Geneious R8 (Kearse et al., 2012) ve Mega 6 (Tamura et al., 2007) yazılımlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.11 Patojenik *Eimeria* Türleri için TaqMan Real Time PCR Analizleri

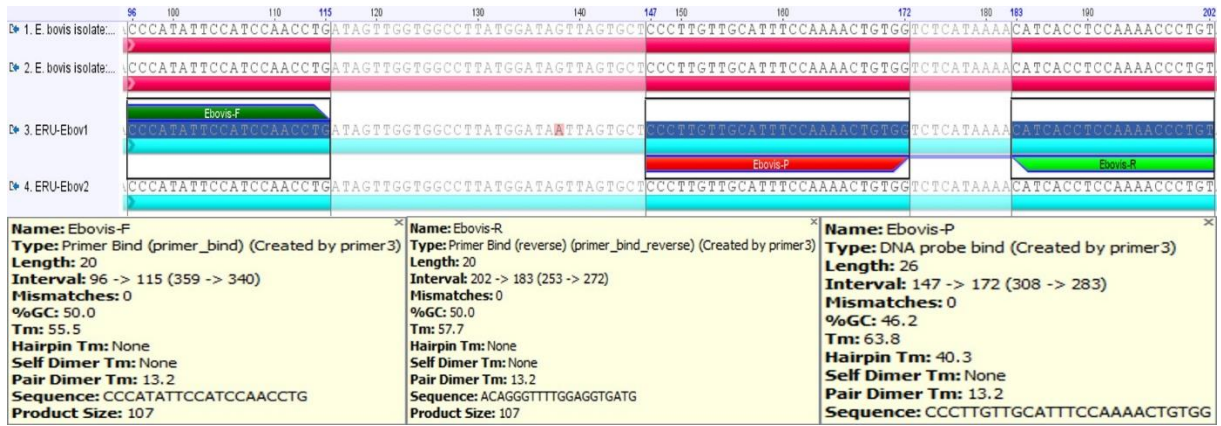
Eimeria oökistleri ile pozitif belirlenen dışkı örneklerinden elde edilmiş genomik DNA izolatlarında patojenik *Eimeria* türleri *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis* ve *E. ellipsoidalis*'in Real Time PCR'da kantitatif identifikasyonları için ribozomal ITS-1 gen bölgesi yüksek sekans heterojenitesi sebebiyle hedef bölge olarak belirlenmiştir. Primer ve prob dizaynında ITS-1 gen bölgesi yönünden karakterize ettiğimiz izolatlarla birlikte Japonya'dan bildirilen izolatlarla ait nükleotid dizilimleri üzerinde Geneious R8, Primer 3 plus ve Beacon Designer genetik yazılımları ile tür bazlı olarak korunmuş bölgeler araştırılmış ve optimum özelliklerde primer ve prob dizaynı gerçekleştirilmiştir. Patojenik türlere özgü belirlenen primer ve prob dizilerinin karakterleri ile bağlanma spesifiteleri Şekil 3.5-3.9'da, nükleotid dizilimleri de Tablo 3.4'de verilmiştir.



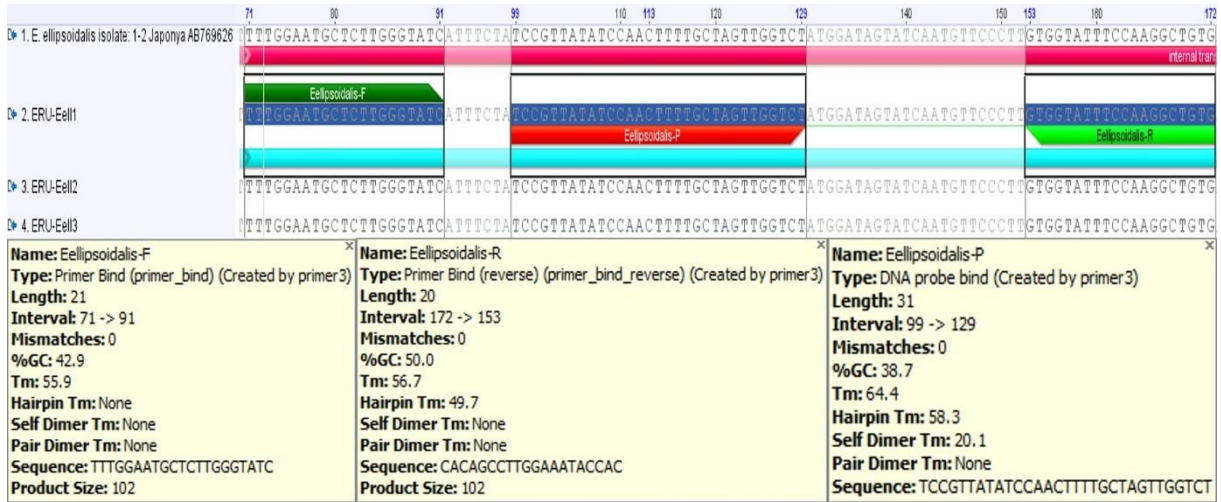
Şekil 3.5 *E. alabamensis* ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri



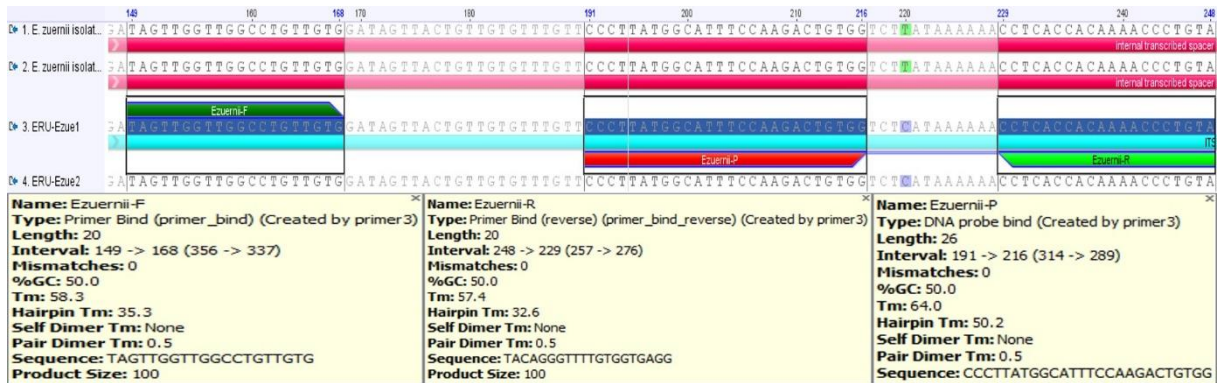
Şekil 3.6 *E. auburnensis* ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri



Şekil 3.7 *E. bovis* ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri



Şekil 3.8 *E. ellipsoidalis* ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri



Şekil 3.9 *E. zuernii* ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primer çifti ve probun bağlanma spesifiteleri ve özellikleri

Tablo 3.4 Patojenik *Eimeria* türleri için primer ve prob sekansları

<i>Eimeria</i> türü	Primer/Prob		Dizilimi (5'---3')	TM* (°C)
<i>E. alabamensis</i>	Primer	Ealabamensis-F	CGAGCCTTTTCGTGTATCTG	56,6
		Ealabamensis-R	CTCGCAGAAATAAGCTCCMAAC	59,6
	Prob	Ealabamensis-P	FAM-ATTCCCGCCCAATCTCTCTACAACGA-BHQ1	65,7
<i>E. zuernii</i>	Primer	Ezuernii-F	TAGTTGGTTGGCCTGTTGTG	58,3
		Ezuernii-R	TACAGGGTTTTGTGGTGAGG	57,4
	Prob	Ezuernii-P	FAM- CCCTTATGGCATTTCCTCAAGACTGTGG -BHQ1	64,0
<i>E. bovis</i>	Primer	E. bovisF	CCCATATTCCATCCAACCTG	55,5
		E. bovisR	ACAGGGTTTTGGAGGTGATG	57,7
	Prob	E. bovisP	FAM- CCCTTGTTGCATTTCCTCAAACTGTGG -BHQ1	63,8
<i>E. auburnensis</i>	Primer	Eauburnensis-F	GTTTCTGGGATGTTCTTGCTC	57,2
		Eauburnensis-R	CACATTTGTTGTGTGAGACCAG	58,0
	Prob	Eauburnensis-P	FAM- TGCGATGATGAAGAAGGGGACATTG -BHQ1	64,0
<i>E. ellipsoidalıs</i>	Primer	E.ellipsoidalısF	TTTGAATGCTCTTGGGTATC	55,9
		E.ellipsoidalısR	CACAGCCTTGGAATACCAC	56,7
	Prob	E.ellipsoidalısP	FAM- TCCGTTATATCCAACCTTTTGCTAGTTGGTCT -BHQ1	64,4

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; Nippon Institute for Biological Science, Japonya'dan Dr. Fumiya Kawahara'dan temin edilen bazı patojenik *Eimeria* türlerine (*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*) ait olduğunu belirledikleri genomik DNA örnekleri ile proje kapsamında izole edilen referans plazmid DNA izolatları pozitif kontrol, sterilize edilmiş deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (Luminaris Color Probe Low ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

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

Testin spesifitesi tek tür ve miks türlere ait örneklerden elde edilmiş genomik DNA izolatları ile sığır *Eimeria* türlerine ait elde edilmiş ITS-1 gen bölgesini ihtiva eden plazmid DNA'ların kullanılmasıyla test edilmiştir. Sensitivite hesaplanmasında XbaI ve Aval enzimleri ile hedef gen bölgesini ihtiva eden plazmid DNA'lar linearize edilerek agaroz jelden pürifiye edildikten sonra Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında µg/ml düzeyinde konsantrasyonları ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra molar konsantrasyon düzeyinde linearize edilmiş plazmidlerin mikrolitersindeki DNA kopya sayısı belirlenmiş ve 1 µl template için 10^7 - 10^1 hedef kopya olacak şekilde 10 tabanında dilüsyonları hazırlanmıştır. Dilüsyonlar iki tekrarlı çalışılmış ve Ct değerlerine göre standart eğriler oluşturulmuştur. Testin etkinliği (E) standart eğri slopuna göre $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ Stratagene Mx3005p Real Time PCR cihazında ilgili yazılım ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir (Vrba et al., 2010).

Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

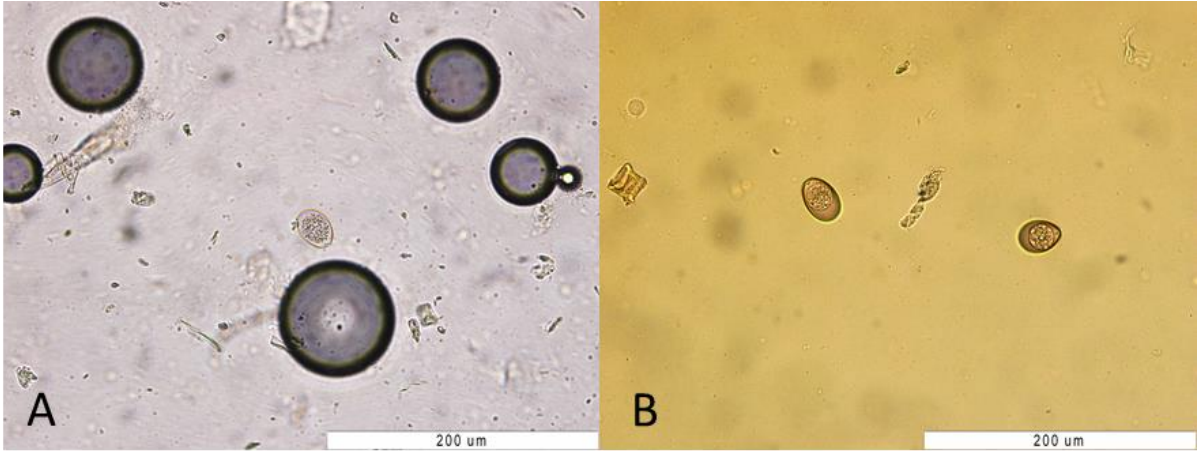
3.3 İstatistiksel Analiz

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

4. BULGULAR

4.1 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi Sonuçları

Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan toplam 920 sığırın 434'ü (%47,2) *Eimeria* ookistleri yönünden pozitif bulunmuştur. *Eimeria* ookistlerini saptama amacıyla direkt dışkı örnekleri ve potassium dichromatlı örnekler üzerinde kullanılan iki yöntem ile de örneklerde *Eimeria* oocystsleri belirlenirken (Şekil 4.1) birim sahadaki ookist yoğunluğu ve kaba partiküllerin eliminasyonu yönünden potassium dichromatlı örnekler üzerine uygulanan modifiye tekniğin daha etkin olduğu belirlenmiştir. *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerin sığırların yaş, cinsiyet ve ırkı ile dışkı karakterine göre dağılımları Tablo 4.1-4.2'de verilmiştir.



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

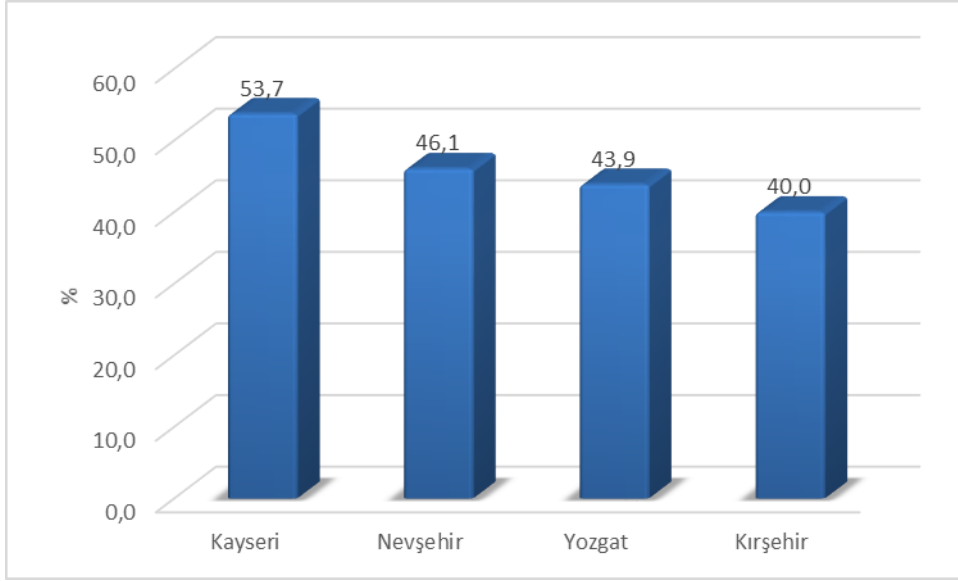
Tablo 4.1'de görüleceği üzere yaş gruplarına göre *Eimeria* ookistleri ile pozitiflik en yüksek %53,7 ile Kayseri yöresinden örneklenen sığırlarda belirlenmiş bunu sırasıyla %45,9, %43,7 ve %40,0 ile Nevşehir, Yozgat ve Kırşehir yörelerinden örneklenen sığırlar izlemiştir. Örnekleme merkezlerine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılım grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Araştırma illerinde *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırların yaş ve cinsiyet özelliklerine göre dağılımları

İller	Yaş									Cinsiyet						Toplam		
	≤3 ay			4-12 ay			>12 ay			Erkek			Dişi					
	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%
Kayseri	50	15	30,0	132	83	62,9	172	92	53,5	135	60	44,4	219	130	59,4	354	190	53,7
Nevşehir	26	7	26,9	53	17	32,1	102	59	57,8	73	33	45,2	108	50	46,3	181	83	45,9
Yozgat	25	8	32,0	50	13	26,0	115	62	53,9	72	30	41,7	118	53	44,9	190	83	43,7
Kırşehir	22	3	13,6	58	17	29,3	115	58	50,4	85	25	29,4	110	53	48,2	195	78	40,0
Toplam	123	33	26,9	293	130	44,5	504	271	53,9	365	148	40,6	555	286	51,5	920	434	47,2

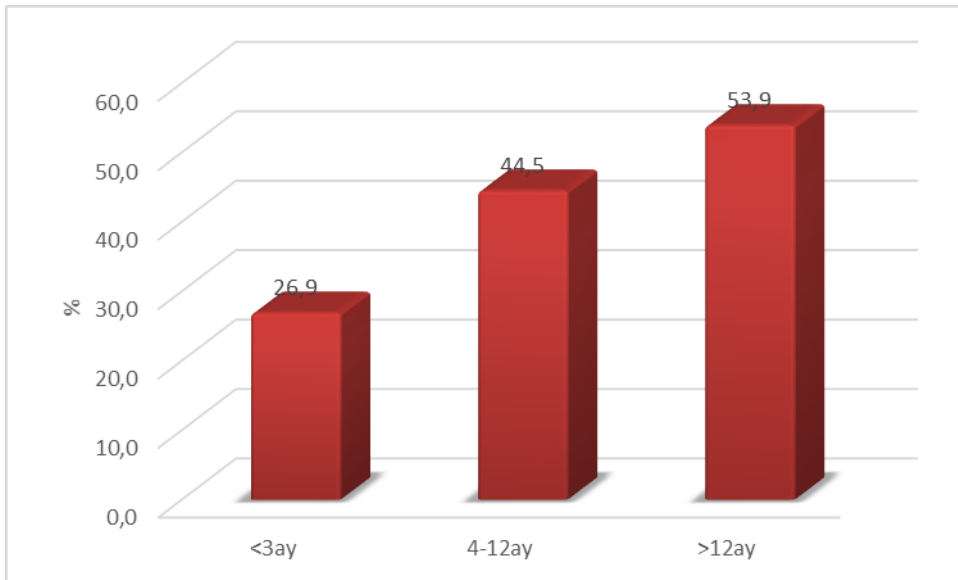
Tablo 4.2 Araştırma illerinde *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırların ırk ve dışkı karakterlerine göre dağılımları

İller	İrk															Dışkı Karakteri									Toplam		
	Holstein			Simental			Montofon			Yerli			Melez			Normal			İshalli			Kanlı ishalli					
	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%
Kayseri	97	50	51,5	91	46	50,5	85	56	65,9	48	28	58,3	33	10	30,3	313	162	51,8	31	19	61,3	10	9	90,0	354	190	53,7
Nevşehir	48	21	43,8	45	18	40,0	44	24	54,5	33	16	48,5	11	4	36,4	164	72	43,9	13	8	61,5	4	3	75,0	181	83	45,9
Yozgat	56	26	46,4	46	18	39,1	39	17	43,6	30	14	46,7	19	8	42,1	176	73	41,5	11	7	63,6	3	3	100,0	190	83	43,7
Kırşehir	47	19	40,4	50	21	42,0	48	18	37,5	38	16	42,1	12	4	33,3	177	67	37,9	14	8	57,1	4	3	75,0	195	78	40,0
Toplam	248	116	46,8	232	103	44,4	216	115	53,2	149	74	49,7	75	26	34,7	830	374	45,1	69	42	60,9	21	18	85,7	920	434	47,2



Şekil 4.2 Örnekleme merkezlerine göre sığırlarda *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

Yaş gruplarına göre sığırlarda *Eimeria* pozitifliği en yüksek %53,9 ile >12 ay grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %44,5 ve %26,9 ile 4-12 ay ve ≤3 ay grupları izlemiştir (Tablo 4.1). Sığırların yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.3’de verilmiştir. Yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.3) önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

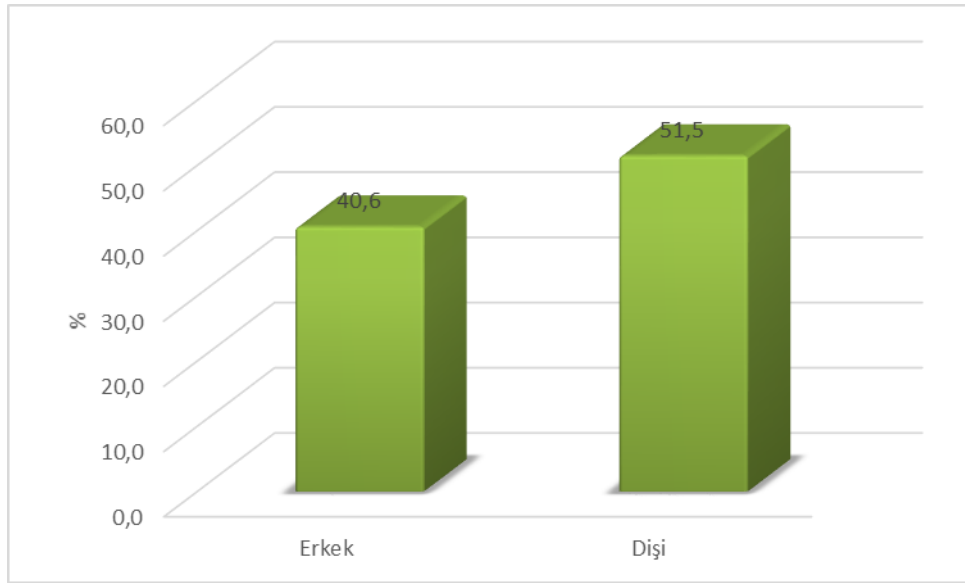


Şekil 4.3 Sığırların yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.3 Yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Ki-Kare Testi			
	Değer	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	0,069	2	0,966
Likelihood Oranı	0,069	2	0,966
Linear-Linear İlişki	0,005	1	0,941
Geçerli olgu sayısı	920		

Sığırların cinsiyetine göre erkeklerde %40,6 dişilerde ise %51,5 oranında *Eimeria* pozitifliği belirlenmiştir (Tablo 4.1). Sığırların cinsiyetine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.4’de verilmiştir. Cinsiyete göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımındaki farklılık istatistiksel açıdan (Tablo 4.4) önemli bulunmuştur ($p<0,05$).



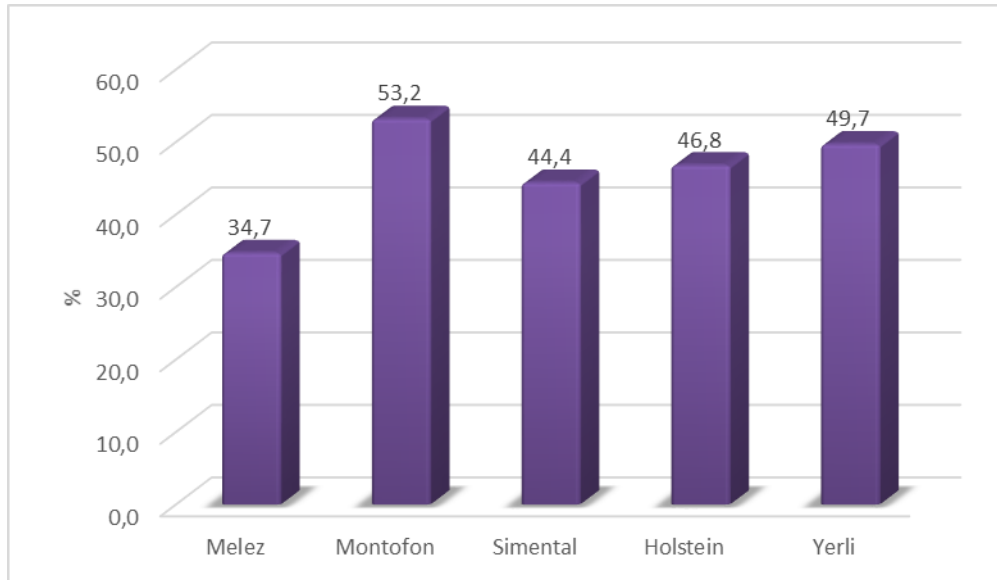
Şekil 4.4 Sığırların cinsiyetine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

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

Ki-Kare Testi					
	Değer	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)	Exact Sig. (2-yönlü)	Exact Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	10,659	1	0,001		
Continuity Correction ^b	10,223	1	0,001		

Likelihood Oranı	10,703	1	0,001		
Fisher's Exact Test				0,001	0,001
Linear-Linear İlişki	10,648	1	0,001		
Geçerli olgu sayısı	920				

Holstein, Simental, Montofon, Yerli ve Melez ırklara ait örneklerde *Eimeria* pozitifliği sırasıyla %46,8, %44,4, %53,2, %49,7 ve %34,7 oranında saptanmıştır (Tablo 4.2). Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.5’de verilmiştir. Irka göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.5) önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

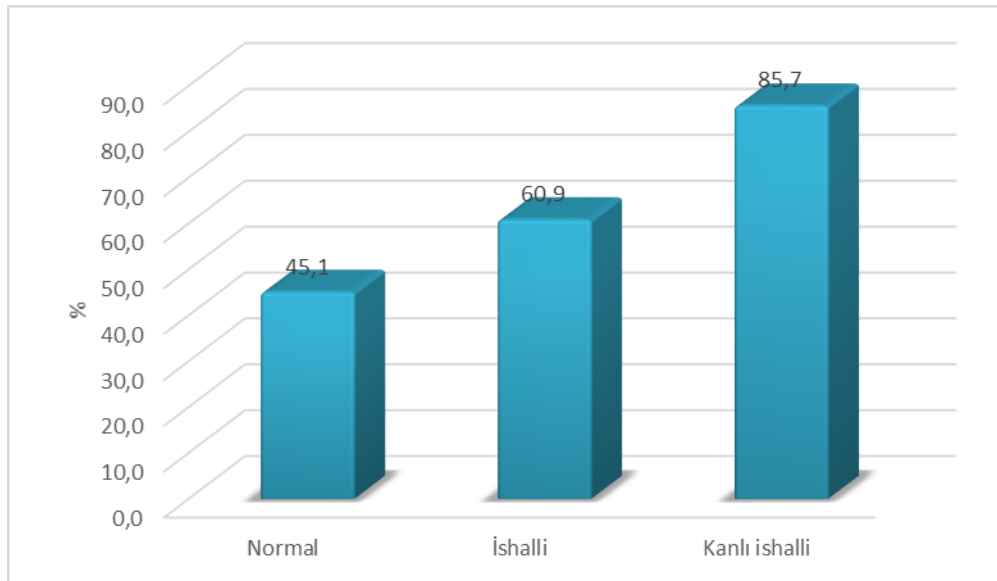


Şekil 4.5 Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.5 Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Ki-Kare Testi			
	Değer	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	9,003	4	0,061
Likelihood Oranı	9,095	4	0,059
Linear-Linear İlişki	0,119	1	0,730
Geçerli olgu sayısı	920		

Dışkı karakterine göre normal, ishalli ve kanlı ishalli dışkı örneklerinde *Eimeria* pozitifliği sırasıyla %45,1, %60,9 ve %85,7 oranında bulunmuştur (Tablo 4.2). Sığırların dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.6’de verilmiştir. Dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı istatistiksel açıdan (Tablo 4.6) önemli bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.6 Sığırlarda dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.6 Dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Ki-Kare Testi			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	19,199	2	0,000
Likelihood Oranı	20,348	2	0,000
Linear-Linear İlişki	18,871	1	0,000
Geçerli olgu sayısı	920		

4.2 Gram Dışkıdaki Ookist Sayısı (OPG) ve İstatistiksel Analizi

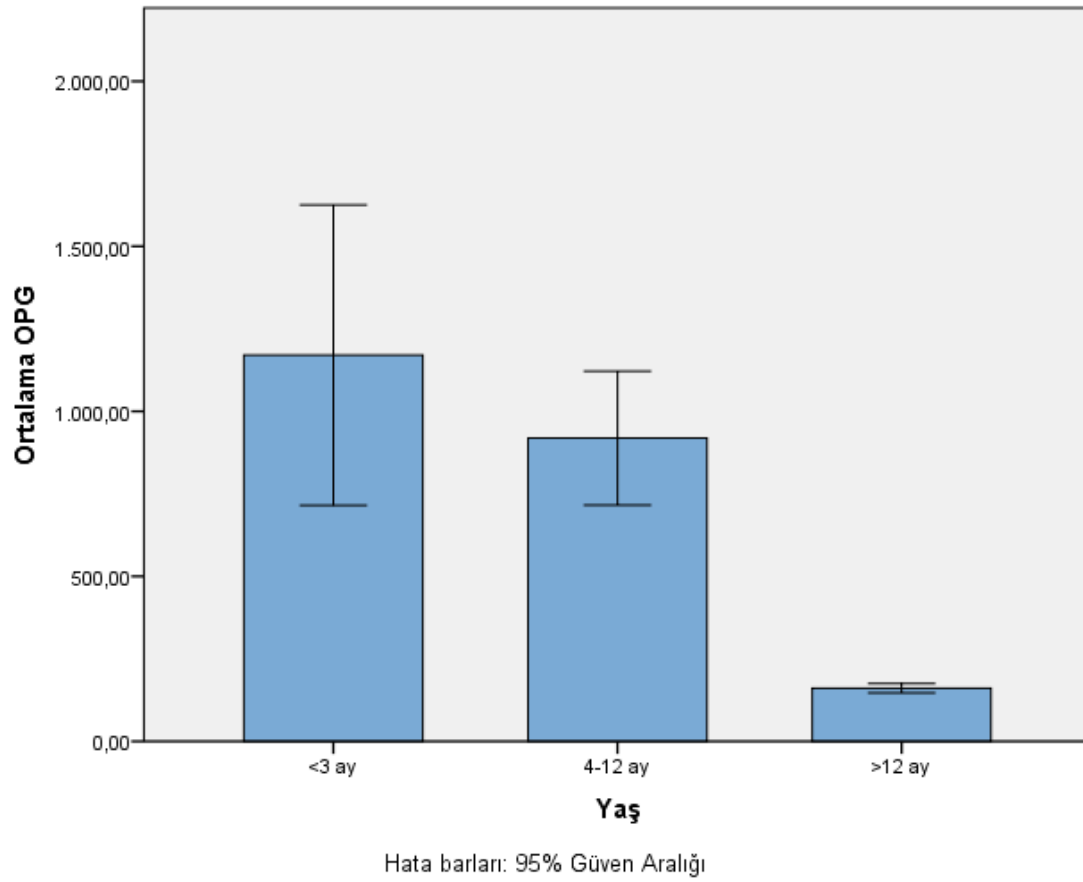
Eimeria ookistleri ile pozitif belirlenen 434 sığırdaki ortalama OPG değeri $464,8 \pm 40,0$ (min:50,00, max:3833,00) belirlenmiştir. OPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 4.7’de verilmiştir. Ortalama OPG değeri en yüksek <3 ay grubunda belirlenmiş, bunu 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.7). >12 ay yaş grubu ile <3

ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz ($p>0,05$) belirlenmiştir (Tablo 4.8)

Tablo 4.7 *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven aralığı	
				Alt	Üst
<3 ay	N	33	6	22	44
	Ortalama	1170,1	220,7	756,5	1627,3
	Std. Sapma	1283,8	121,3	1001,1	1478,3
	Std. Hata	223,5			
	Minimum	50,0			
	Maksimum	3833,0			
4-12 ay	N	130	9	112	148
	Ortalama	918,8	103,0	728,4	1133,9
	Std. Sapma	1167,8	73,3	1016,8	1300,9
	Std. Hata	102,43			
	Minimum	50,0			
	Maksimum	3833,0			
>12 ay	N	271	10	253	291
	Ortalama	161,2	7,4	146,8	177,1
	Std. Sapma	120,1	5,6	107,6	130,0
	Std. Hata	7,3			
	Minimum	50,0			
	Maksimum	500,0			
Toplam	N	434	0	434	434
	Ortalama	464,8	39,4	389,3	544,6
	Std. Sapma	833,4	54,8	720,0	938,3
	Std. Hata	40,0			
	Minimum	50,0			
	Maksimum	3833,0			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.7 OPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.8 Sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi

	(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven aralığı	
						Alt sınır	Üst sınır
Tamhane	<3 ay	4-12 ay	251,32983	245,83273	,674	-357,6217	860,2813
		>12 ay	1008,90740*	223,59702	,000	445,6816	1572,1331
	4-12 ay	<3 ay	-251,32983	245,83273	,674	-860,2813	357,6217
		>12 ay	757,57757*	102,68632	,000	509,1983	1005,9568
	>12 ay	<3 ay	-1008,90740*	223,59702	,000	-1572,1331	-445,6816
		4-12 ay	-757,57757*	102,68632	,000	-1005,9568	-509,1983

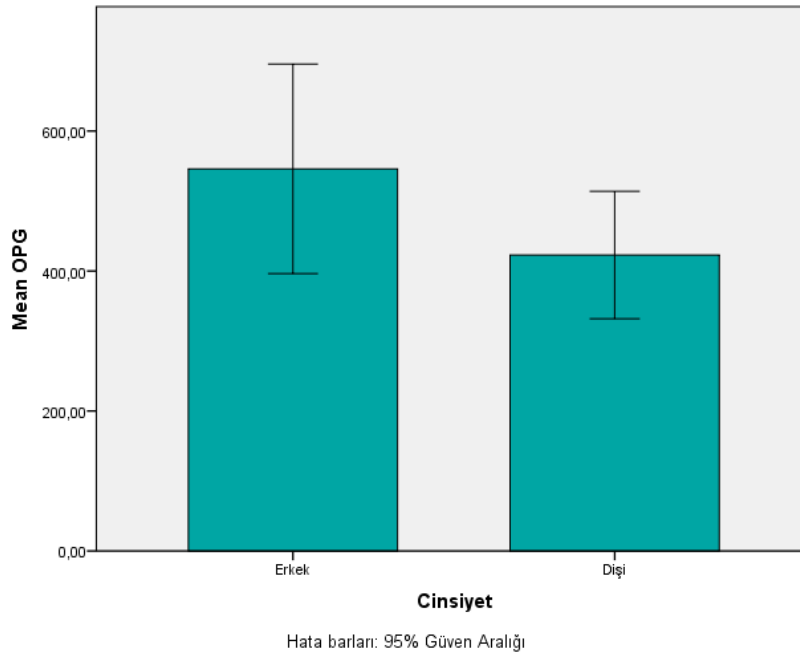
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların cinsiyetine göre OPG değerleri dişilerde 422,8, erkeklerde ise 546,0 saptanmıştır (Tablo 4.9). OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımında (Şekil 4.8) istatistiksel bir farklılık ($p>0,05$) görülmemiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.9 *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven aralığı	
				Alt	Üst
Erkek	N	148			
	Ortalama	546,0061	-3,4248	76,1083	399,4271
	Std. Sapma	921,52977	-12,2833	91,87234	721,21805
	Std. Hata	75,74928			
Dişi	N	286			
	Ortalama	422,8035	-2,4556	46,1324	337,0670
	Std. Sapma	782,35387	-7,50950	71,20707	635,45463
	Std. Hata	46,26155			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.8 OPG değerlerinin sığırların cinsiyetine göre dağılım grafiği

Tablo 4.10 Sığırlarda OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımının istatistiksel analizi

	Ortalamaların eşitliği için t-testi					
	t	df	Sig. (2-uçlu)	Ortalama farklılık	Std. Hata farklılık	Farklılık için 95% Güven aralığı
						Alt Üst
OPG	1,462	432	,145	123,20258	84,28025	-42,447 288,85293

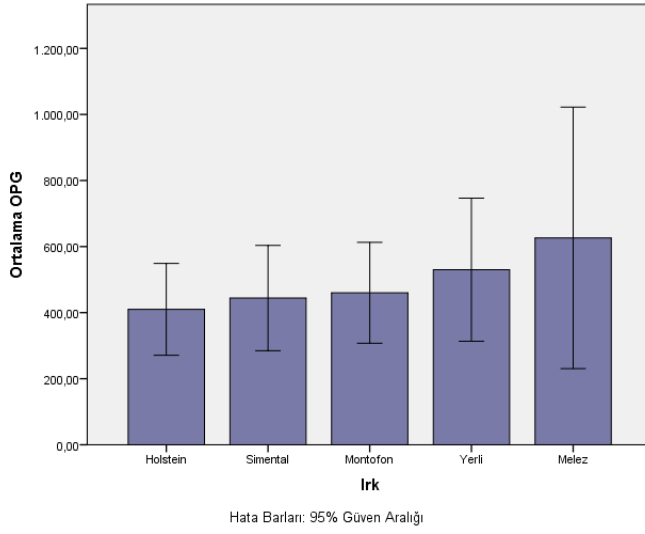
OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımları Tablo 4.11’de verilmiştir. Ortalama OPG değeri Holstein, Simental, Montofon, Yerli ve Melez ırkı sığırlarda sırasıyla 410,0, 444,3,

460,1, 529,9 ve 626,2 belirlenmiştir. OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımında (Şekil 4.9) istatistiksel bir farklılık ($p>0,05$) görülmemiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.11 *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımı

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven aralığı	
				Alt	Üst
Holstein	N	116	9	98	135
	Ortalama	410,0185	71,3256	273,3197	557,3960
	Std. Sapma	755,76022	114,26325	511,68300	958,03192
	Std. Hata	70,17058			
	Minimum	50,00			
	Maksimum	3832,95			
Simental	N	103	9	86	122
	Ortalama	444,2942	81,2535	299,2281	609,3778
	Std. Sapma	815,69510	122,65664	544,17859	1030,67457
	Std. Hata	80,37283			
	Minimum	50,00			
	Maksimum	3832,95			
Montofon	N	115	9	98	134
	Ortalama	460,1009	76,8312	316,0379	624,8193
	Std. Sapma	827,00901	108,43100	590,29714	1016,01785
	Std. Hata	77,11899			
	Minimum	50,00			
	Maksimum	3832,95			
Yerli	N	74	8	58	89
	Ortalama	529,9041	110,5585	336,6964	764,3854
	Std. Sapma	935,13658	137,13365	641,17461	1180,44065
	Std. Hata	108,70742			
	Minimum	50,00			
	Maksimum	3666,30			
Melez	N	26	5	17	36
	Ortalama	626,2212	189,8414	264,3897	1003,3270
	Std. Sapma	980,08427	215,69429	431,42345	1289,06977
	Std. Hata	192,21034			
	Minimum	50,00			
	Maksimum	3333,00			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.9 OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılım grafiği

Tablo 4.12 Sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımının istatistiksel analizi

Çoklu Kıyaslama							
Bağımlı değişken: OPG							
	(I) Irk	(J) Irk	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven aralığı	
						Alt sınır	Üst sınır
Tamhane	Holstein	Simental	-34,27564	106,69443	1,000	-336,1685	267,6173
		Montofon	-50,08234	104,26528	1,000	-344,8557	244,6910
		Yerli	-119,88552	129,38784	,988	-488,2834	248,5124
		Melez	-216,20262	204,61849	,971	-831,3001	398,8948
	Simental	Holstein	34,27564	106,69443	1,000	-267,6173	336,1685
		Montofon	-15,80669	111,38730	1,000	-330,9004	299,2870
		Yerli	-85,60988	135,19280	,999	-469,9961	298,7763
		Melez	-181,92698	208,33772	,993	-805,1837	441,3298
	Montofon	Holstein	50,08234	104,26528	1,000	-244,6910	344,8557
		Simental	15,80669	111,38730	1,000	-299,2870	330,9004
		Yerli	-69,80318	133,28406	1,000	-448,8418	309,2355
		Melez	-166,12028	207,10421	,996	-786,6252	454,3846
	Yerli	Holstein	119,88552	129,38784	,988	-248,5124	488,2834
		Simental	85,60988	135,19280	,999	-298,7763	469,9961
		Montofon	69,80318	133,28406	1,000	-309,2355	448,8418
		Melez	-96,31710	220,82146	1,000	-748,6424	556,0082
	Melez	Holstein	216,20262	204,61849	,971	-398,8948	831,3001
		Simental	181,92698	208,33772	,993	-441,3298	805,1837
		Montofon	166,12028	207,10421	,996	-454,3846	786,6252
		Yerli	96,31710	220,82146	1,000	-556,0082	748,6424

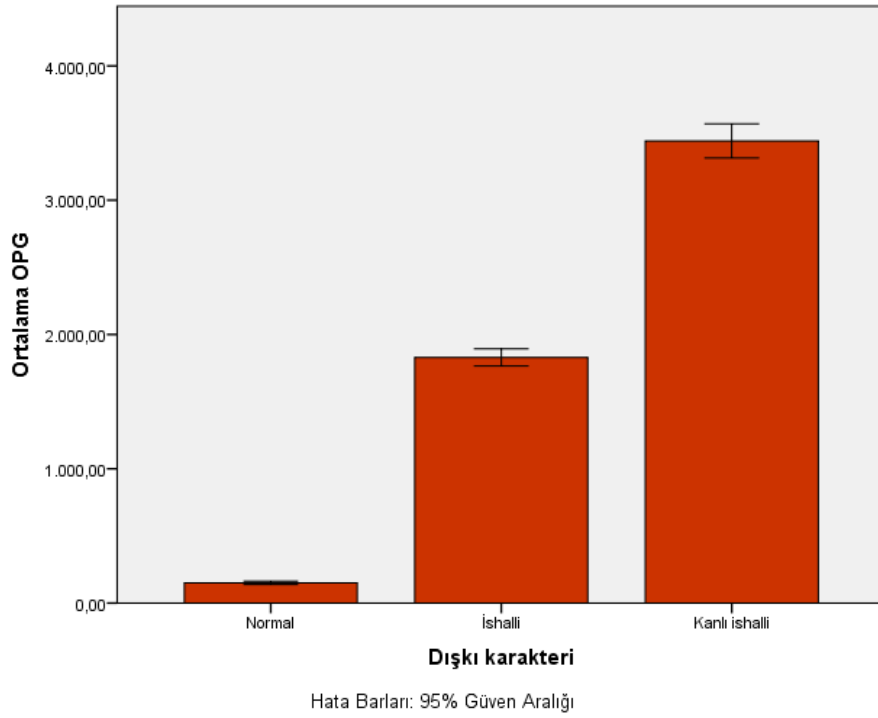
*. Ortalama farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımları Tablo 4.13’de verilmiştir. Ortalama OPG değeri en yüksek kanlı ishalleri dışkılarıda belirlenmiş bunu ishalleri ve normal dışkı örnekleri izlemiştir. OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımında (Şekil 4.10) her üç kategori için de istatistiksel farklılık önemli ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.14).

Tablo 4.13 *Eimeria* oocistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımı

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven aralığı	
				Alt	Üst
Normal	N	374	7	360	387
	Ortalama	150,7489	6,4778	138,2339	163,2124
	Std. Sapma	122,16109	5,04050	111,73680	131,41384
	Std. Hata	6,33376			
	Minimum	50,00			
	Maksimum	499,95			
İshalleri	N	42	6	31	55
	Ortalama	1829,1821	31,6184	1767,5112	1892,1667
	Std. Sapma	206,53877	16,05469	170,23827	233,03847
	Std. Hata	31,86962			
	Minimum	1499,85			
	Maksimum	2166,45			
Kanlı ishalleri	N	18	4	11	27
	Ortalama	3441,3225	61,5410	3324,2401	3568,2593
	Std. Sapma	271,82481	32,71770	194,40213	322,77704
	Std. Hata	60,78188			
	Minimum	2999,70			
	Maksimum	3832,95			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.10 OPG değerlerinin sığırların dışkı karakterlerine göre dağılım grafiği

Tablo 4.14 Sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımının istatistiksel analizi

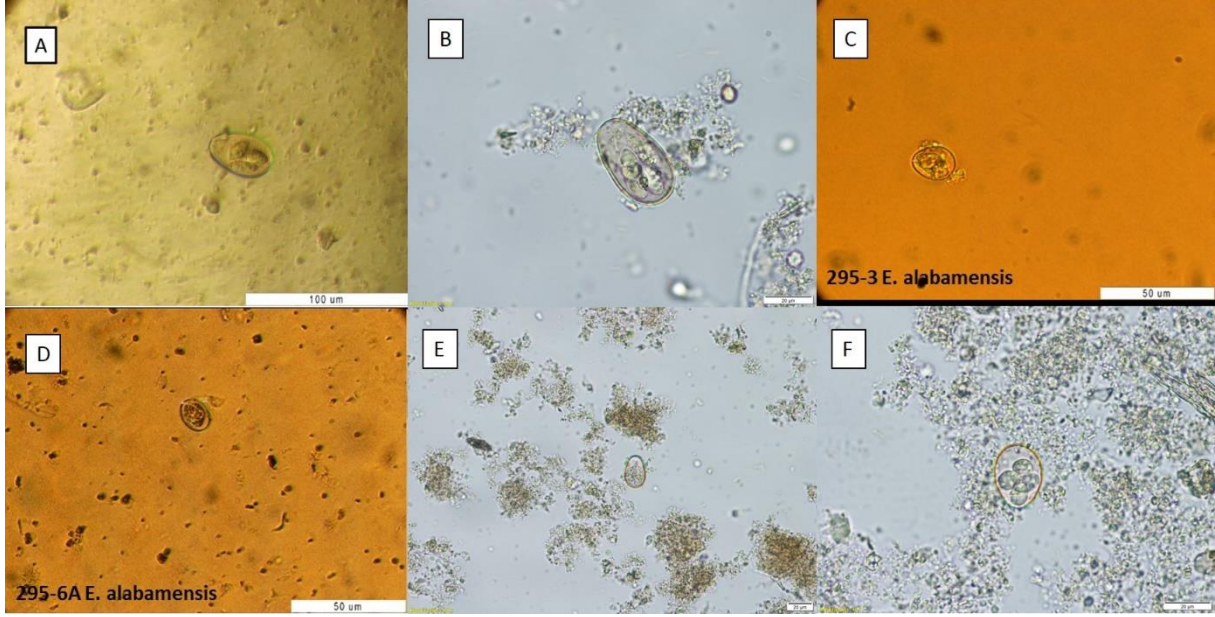
(I) Dışkı karakteri	(J) Dışkı karakteri	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Normal	İshalli	- 1678,43322*	32,49291	,000	- 1759,0609	- 1597,8055
	Kanlı ishalli	- 3290,57358*	61,11099	,000	- 3450,1855	- 3130,9617
İshalli	Normal	1678,43322*	32,49291	,000	1597,8055	1759,0609
	Kanlı ishalli	- 1612,14036*	68,63024	,000	- 1785,7254	- 1438,5554
Kanlı ishalli	Normal	3290,57358*	61,11099	,000	3130,9617	3450,1855
	İshalli	1612,14036*	68,63024	,000	1438,5554	1785,7254

*. Ortalama farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

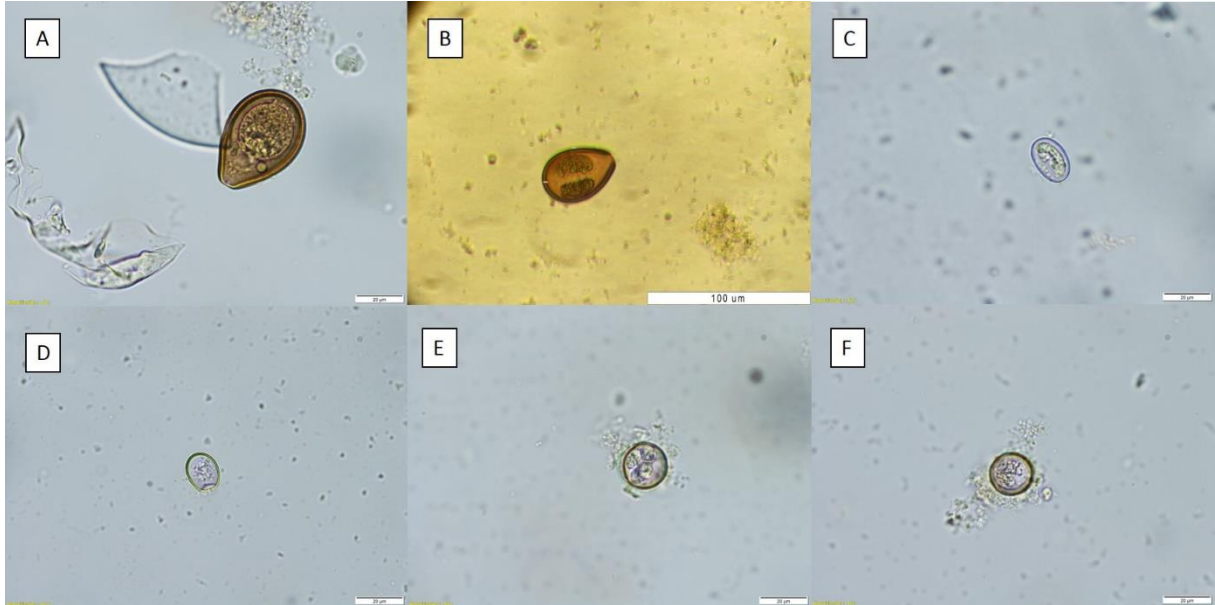
4.3 Morfolojik İdentifikasyon Sonuçları

Eimeria ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda sporlandırma öncesi ve sonrası identifiye edilen türlere ait ookistler Şekil 4.11-4.14’de gösterilmiştir. Saptanan *Eimeria* türleri ve prevalansları Tablo 4.15’de verilmiş olup en yaygın tür %30,0 ile *E. auburnensis* bulunmuş

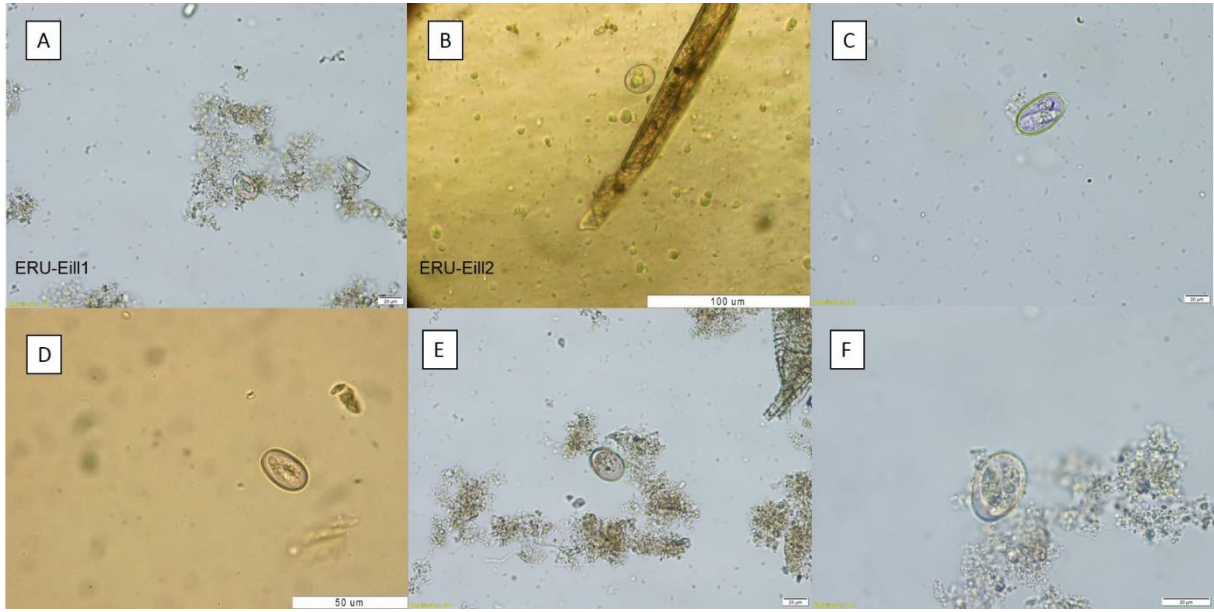
bunu sırasıyla %28,8 ile *E. bovis*, %26,6 ile *E. zuernii*, %25,1 ile *E. canadensis*, %14,1 ile *E. ellipsoidalis*, %8,9 ile *E. cylindrica*, %8,2 ile *E. alabamensis*, %5,7 ile *E. brasiliensis*, %5,0 ile *E. bukidnonensis*, %4,8 ile *E. subspherica*, %1,6 ile *E. wyomingensis* ve %0,5 ile *E. pellita* izlemiştir (Şekil 4.15).



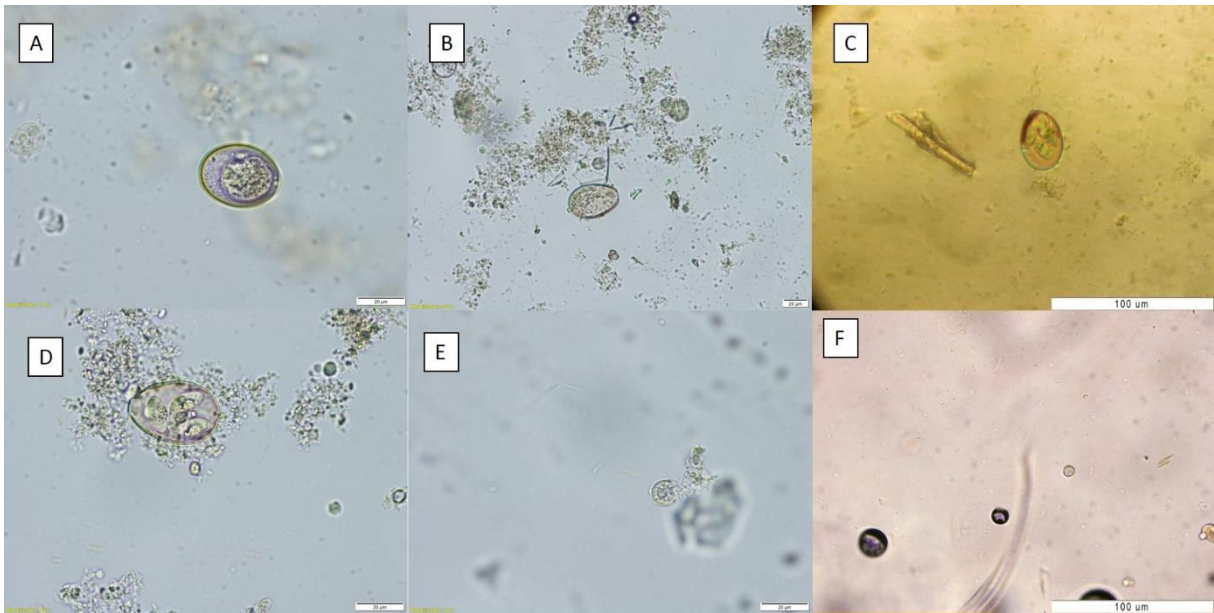
Şekil 4.11 Pozitif örneklerde *Eimeria* ookistleri 1. A-B: *E. auburnensis*, C-D: *E. alabamensis*, E-F: *E. bovis*



Şekil 4.12 Pozitif örneklerde *Eimeria* ookistleri 2. A-B: *E. bukidnonensis*, C-D: *E. ellipsoidalis*, E-F: *E. zuernii*



Şekil 4.13 Pozitif örneklerde *Eimeria* ookistleri 3. A: *E. illinoisensis*, B: *E. cylindrica*, C: *E. canadensis*

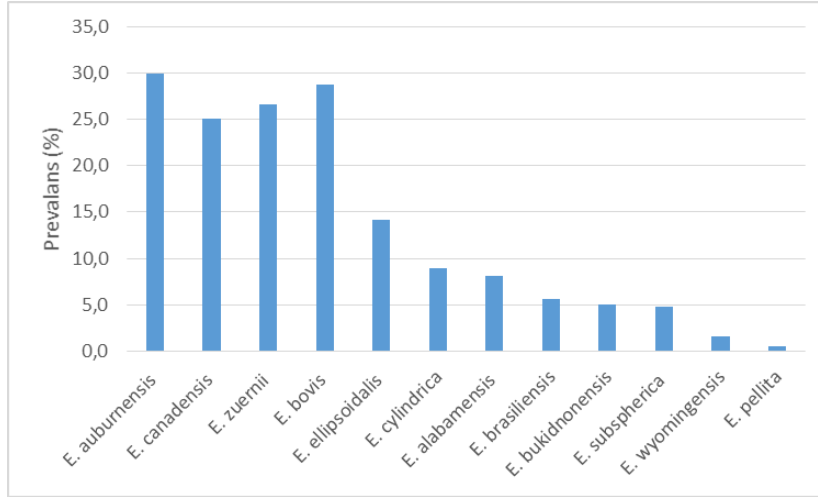


Şekil 4.14 Pozitif örneklerde *Eimeria* ookistleri4. A: *E. pellita*, B: *E. wyomingensis*, C-D: *E. brasiliensis*, E-F: *E. subspherica*

Tablo 4.15 Pozitif örneklerde saptanan *Eimeria* türleri ve prevalansları

İncelenen Örnek Sayısı	<i>Eimeria</i> türü	Prevalans	
		Sayı	%
920	<i>E. auburnensis</i>	276	30,0
	<i>E. canadensis</i>	231	25,1
	<i>E. zuernii</i>	245	26,6
	<i>E. bovis</i>	265	28,8

	<i>E. ellipsoidalis</i>	130	14,1
	<i>E. cylindrica</i>	82	8,9
	<i>E. alabamensis</i>	75	8,2
	<i>E. brasiliensis</i>	52	5,7
	<i>E. bukidnonensis</i>	46	5,0
	<i>E. subspherica</i>	44	4,8
	<i>E. wyomingensis</i>	15	1,6
	<i>E. pellita</i>	5	0,5



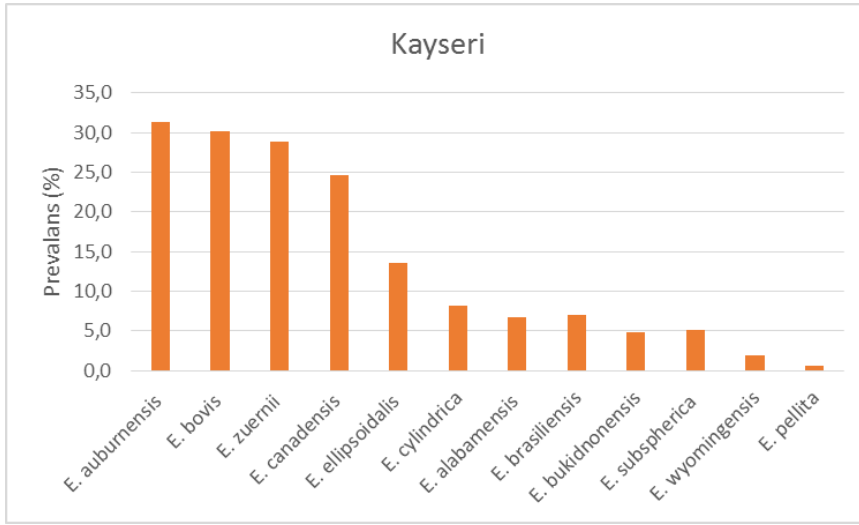
Şekil 4.15 Pozitif örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

Araştırma merkezlerine göre *Eimeria* türlerinin prevalansı Tablo 4.16’da verilmiştir. Her dört araştırma yöresi için de patojenik *Eimeria* türlerinden *E. auburnensis*, *E. bovis* ve *E. zuernii* primer yaygın türler olarak görülürken non-patojenik türlerden ise *E. canadensis*’in en yaygın tür olduğu belirlenmiştir. Araştırma merkezlerine göre *Eimeria* türlerinin dağılım oranları ayrıca Şekil 4.16-4.19’da verilmiştir.

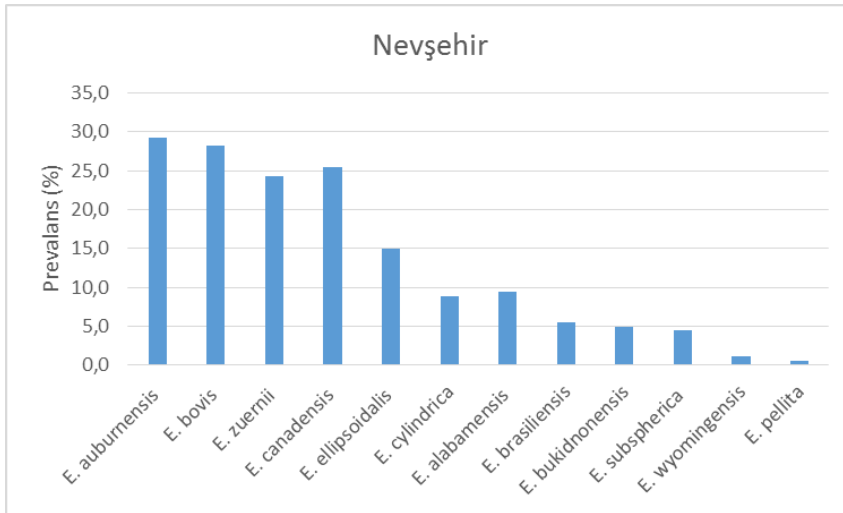
Tablo 4.16 Araştırma merkezlerine göre *Eimeria* türlerinin prevalansı

Araştırma Merkezi	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Eimeria</i> türü	Prevalans	
			Sayı	%
Kayseri	354	<i>E. auburnensis</i>	111	31,4
		<i>E. bovis</i>	107	30,2
		<i>E. zuernii</i>	102	28,8
		<i>E. canadensis</i>	87	24,6
		<i>E. ellipsoidalis</i>	48	13,6
		<i>E. cylindrica</i>	29	8,2
		<i>E. alabamensis</i>	24	6,8
		<i>E. brasiliensis</i>	25	7,1
		<i>E. bukidnonensis</i>	17	4,8

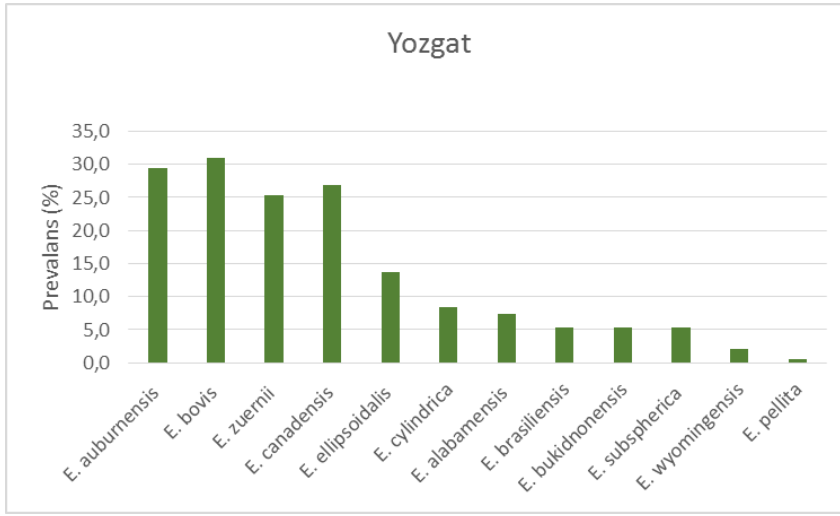
		<i>E. subspherica</i>	18	5,1
		<i>E. wyomingensis</i>	7	2,0
		<i>E. pellita</i>	2	0,6
Nevşehir	181	<i>E. auburnensis</i>	53	29,3
		<i>E. bovis</i>	51	28,2
		<i>E. zuernii</i>	44	24,3
		<i>E. canadensis</i>	46	25,4
		<i>E. ellipsoidalıs</i>	27	14,9
		<i>E. cylindrica</i>	16	8,8
		<i>E. alabamensis</i>	17	9,4
		<i>E. brasiliensis</i>	10	5,5
		<i>E. bukidnonensis</i>	9	5,0
		<i>E. subspherica</i>	8	4,4
		<i>E. wyomingensis</i>	2	1,1
		<i>E. pellita</i>	1	0,6
Yozgat	190	<i>E. auburnensis</i>	56	29,5
		<i>E. bovis</i>	59	31,1
		<i>E. zuernii</i>	48	25,3
		<i>E. canadensis</i>	51	26,8
		<i>E. ellipsoidalıs</i>	26	13,7
		<i>E. cylindrica</i>	16	8,4
		<i>E. alabamensis</i>	14	7,4
		<i>E. brasiliensis</i>	10	5,3
		<i>E. bukidnonensis</i>	10	5,3
		<i>E. subspherica</i>	10	5,3
		<i>E. wyomingensis</i>	4	2,1
Kırşehir	195	<i>E. pellita</i>	1	0,5
		<i>E. auburnensis</i>	56	28,7
		<i>E. bovis</i>	48	24,6
		<i>E. zuernii</i>	51	26,2
		<i>E. canadensis</i>	47	24,1
		<i>E. ellipsoidalıs</i>	29	14,9
		<i>E. cylindrica</i>	21	10,8
		<i>E. alabamensis</i>	20	10,3
		<i>E. brasiliensis</i>	7	3,6
		<i>E. bukidnonensis</i>	10	5,1
		<i>E. subspherica</i>	8	4,1
		<i>E. wyomingensis</i>	2	1,0
		<i>E. pellita</i>	1	0,5



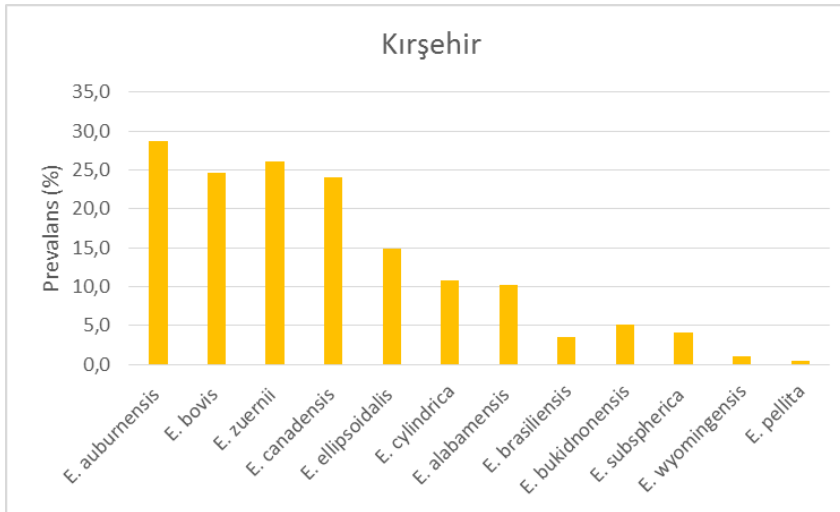
Şekil 4.16 Kayseri yöresinde incelenen örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği



Şekil 4.17 Nevşehir yöresinde incelenen örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği



Şekil 4.18 Yozgat yöresinde incelenen örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

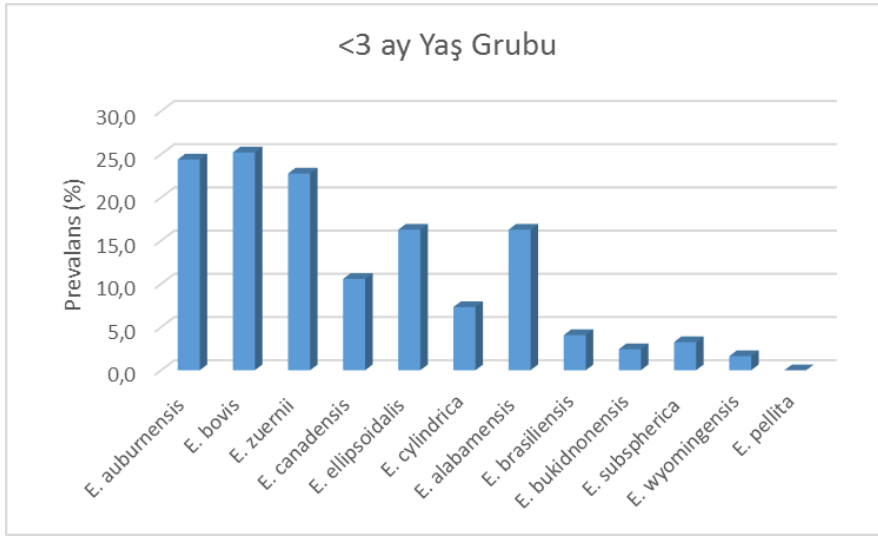


Şekil 4.19 Kırşehir yöresinde incelenen örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

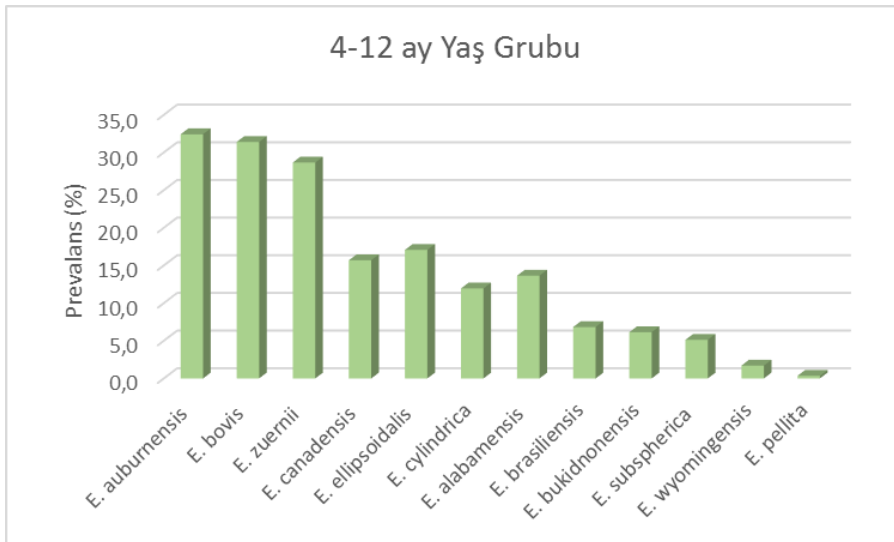
İncelenen sığırların yaş gruplarına göre *Eimeria* türlerinin prevalansları Tablo 4.17’de verilmiştir. <3 ay ve 4-12 ay yaş grubu sığırlarda patojenik *Eimeria* türlerinden *E. bovis*, *E. auburnensis* ve *E. zuernii* türlerinin primer yaygın türler olduğu görülürken >12 ay yaş grubu sığırlarda non-patojenik türlerden *E. canadensis*’in en yaygın tür olduğu saptanmıştır. Yaş gruplarına göre *Eimeria* türlerinin dağılım oranları ayrıca Şekil 4.20-4.22’de verilmiştir.

Tablo 4.17 Yaş gruplarına göre *Eimeria* türlerinin prevalansı

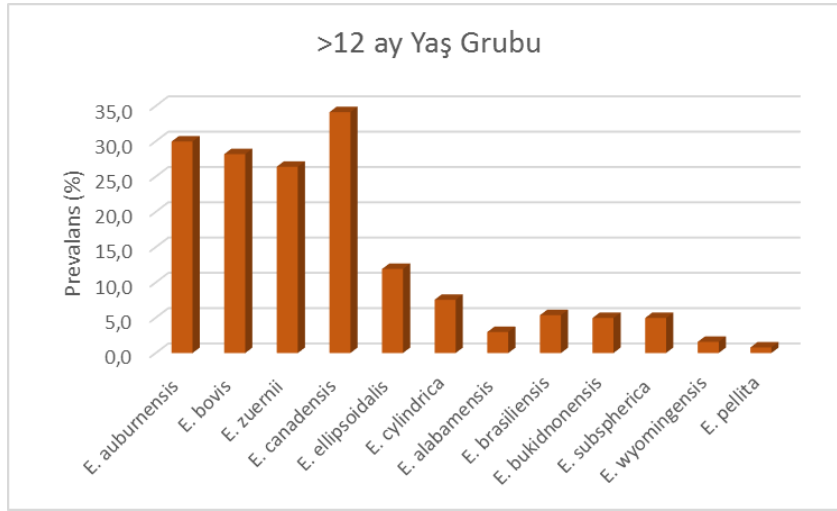
Yaş Grubu	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Eimeria</i> türü	Prevalans	
			Sayı	%
<3 ay	123	<i>E. auburnensis</i>	30	24,4
		<i>E. bovis</i>	31	25,2
		<i>E. zuernii</i>	28	22,8
		<i>E. canadensis</i>	13	10,6
		<i>E. ellipsoidalis</i>	20	16,3
		<i>E. cylindrica</i>	9	7,3
		<i>E. alabamensis</i>	20	16,3
		<i>E. brasiliensis</i>	5	4,1
		<i>E. bukidnonensis</i>	3	2,4
		<i>E. subspherica</i>	4	3,3
		<i>E. wyomingensis</i>	2	1,6
		<i>E. pellita</i>	0	0,0
4-12 ay	293	<i>E. auburnensis</i>	95	32,4
		<i>E. bovis</i>	92	31,4
		<i>E. zuernii</i>	84	28,7
		<i>E. canadensis</i>	46	15,7
		<i>E. ellipsoidalis</i>	50	17,1
		<i>E. cylindrica</i>	35	11,9
		<i>E. alabamensis</i>	40	13,7
		<i>E. brasiliensis</i>	20	6,8
		<i>E. bukidnonensis</i>	18	6,1
		<i>E. subspherica</i>	15	5,1
		<i>E. wyomingensis</i>	5	1,7
		<i>E. pellita</i>	1	0,3
>12 ay	504	<i>E. auburnensis</i>	151	30,0
		<i>E. bovis</i>	142	28,2
		<i>E. zuernii</i>	133	26,4
		<i>E. canadensis</i>	172	34,1
		<i>E. ellipsoidalis</i>	60	11,9
		<i>E. cylindrica</i>	38	7,5
		<i>E. alabamensis</i>	15	3,0
		<i>E. brasiliensis</i>	27	5,4
		<i>E. bukidnonensis</i>	25	5,0
		<i>E. subspherica</i>	25	5,0
		<i>E. wyomingensis</i>	8	1,6
		<i>E. pellita</i>	4	0,8



Şekil 4.20 <3 ay yaş grubu örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği



Şekil 4.21 4-12 ay yaş grubu örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği



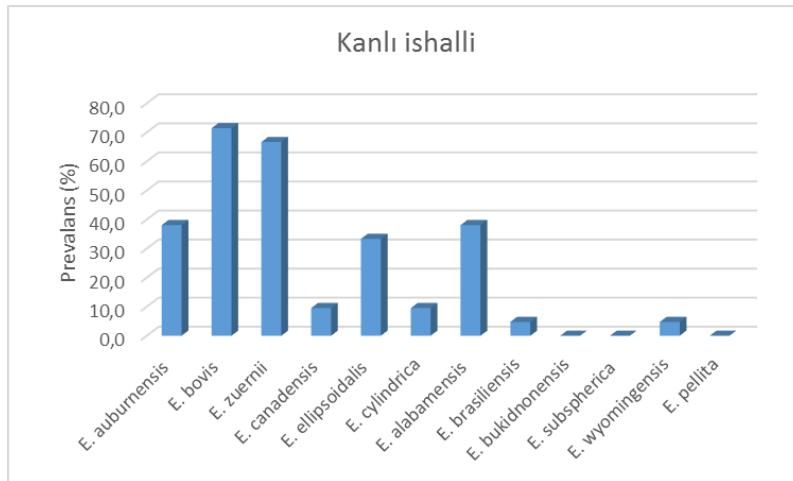
Şekil 4.22 >12 ay yaş grubu örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

İncelenen sığırların dışkı karakterlerine göre *Eimeria* türlerinin prevalansları Tablo 4.18’de verilmiştir. Kanlı ishalleri ve ishalleri dışkı gruplarında patojenik *Eimeria* türlerinden *E. bovis* en yaygın tür belirlenmiş bunu *E. zuernii* ve *E. auburnensis* türleri izlemiştir. Normal dışkı grubunda ise yine patojenik türlerin yaygın olduğu, non-patojenik *Eimeria* türlerinden ise *E. canadensis*’in en yaygın tür olduğu görülmüş, diğer türlerin ise daha sınırlı bir prevalansa sahip olduğu saptanmıştır. Dışkı karakterine göre *Eimeria* türlerinin dağılım oranları ayrıca Şekil 4.23-4.25’de verilmiştir.

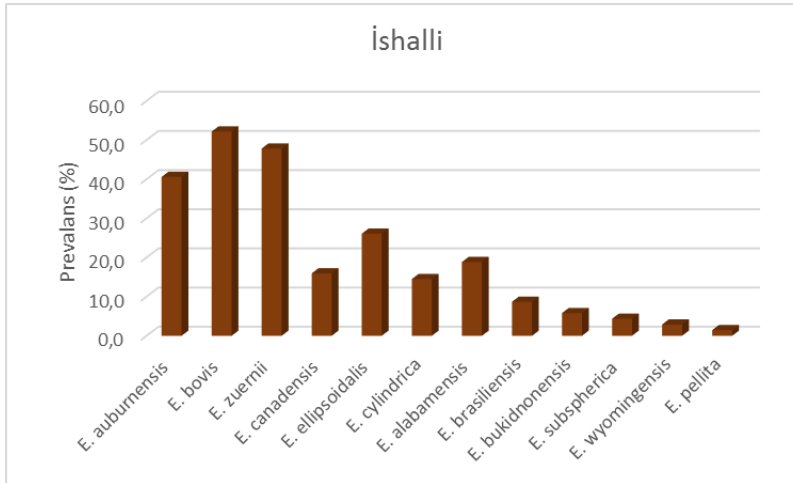
Tablo 4.18 Dışkı karakterine göre *Eimeria* türlerinin prevalansı

Dışkı Karakteri	İncelenen Hayvan Sayısı	<i>Eimeria</i> türü	Prevalans	
			Sayı	%
Kanlı ishalleri	21	<i>E. auburnensis</i>	8	38,1
		<i>E. bovis</i>	15	71,4
		<i>E. zuernii</i>	14	66,7
		<i>E. canadensis</i>	2	9,5
		<i>E. ellipsoidalis</i>	7	33,3
		<i>E. cylindrica</i>	2	9,5
		<i>E. alabamensis</i>	8	38,1
		<i>E. brasiliensis</i>	1	4,8
		<i>E. bukidnonensis</i>	0	0,0
		<i>E. subspherica</i>	0	0,0
		<i>E. wyomingensis</i>	1	4,8
		<i>E. pellita</i>	0	0,0
İshalleri	69	<i>E. auburnensis</i>	28	40,6

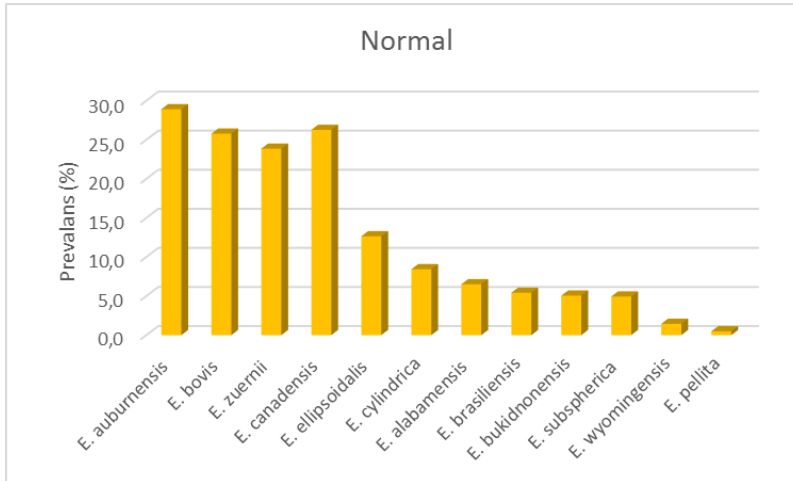
		<i>E. bovis</i>	36	52,2
		<i>E. zuernii</i>	33	47,8
		<i>E. canadensis</i>	11	15,9
		<i>E. ellipsoidalis</i>	18	26,1
		<i>E. cylindrica</i>	10	14,5
		<i>E. alabamensis</i>	13	18,8
		<i>E. brasiliensis</i>	6	8,7
		<i>E. bukidnonensis</i>	4	5,8
		<i>E. subspherica</i>	3	4,3
		<i>E. wyomingensis</i>	2	2,9
		<i>E. pellita</i>	1	1,4
Normal	504	<i>E. auburnensis</i>	240	28,9
		<i>E. bovis</i>	214	25,8
		<i>E. zuernii</i>	198	23,9
		<i>E. canadensis</i>	218	26,3
		<i>E. ellipsoidalis</i>	105	12,7
		<i>E. cylindrica</i>	70	8,4
		<i>E. alabamensis</i>	54	6,5
		<i>E. brasiliensis</i>	45	5,4
		<i>E. bukidnonensis</i>	42	5,1
		<i>E. subspherica</i>	41	4,9
		<i>E. wyomingensis</i>	12	1,4
		<i>E. pellita</i>	4	0,5



Şekil 4.23 Kanlı ishalli dışkı grubundaki örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği



Şekil 4.24 İshalli dışkı grubundaki örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

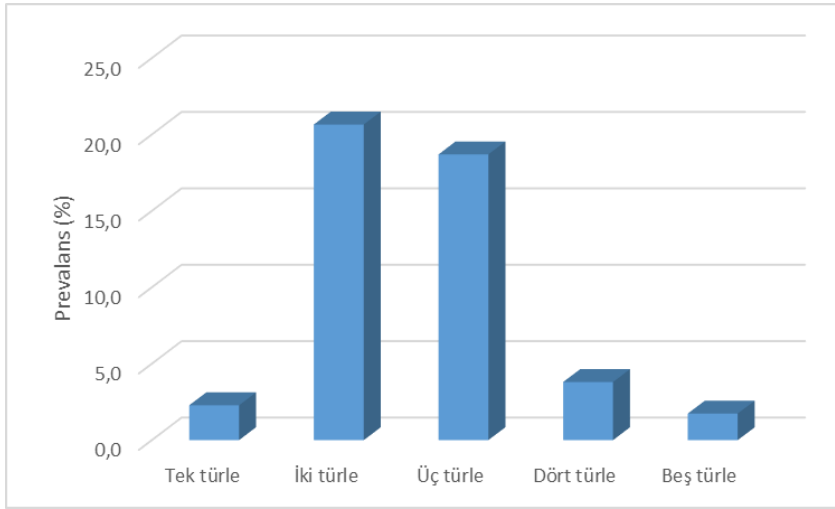


Şekil 4.25 Normal dışkı grubundaki örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

Eimeria ookistleri ile pozitif belirlenen hayvanlarda tek ve miks enfeksiyon durumları Tablo 4.19’da verilmiştir. En yüksek prevalans iki türle miks enfeksiyonlarda saptanmış bunu sırasıyla üç, dört, tek ve beş türle enfeksiyonlar izlemiştir (Şekil 4.26).

Tablo 4.19 *Eimeria* türleri ile tek ve miks enfeksiyonların prevalansı

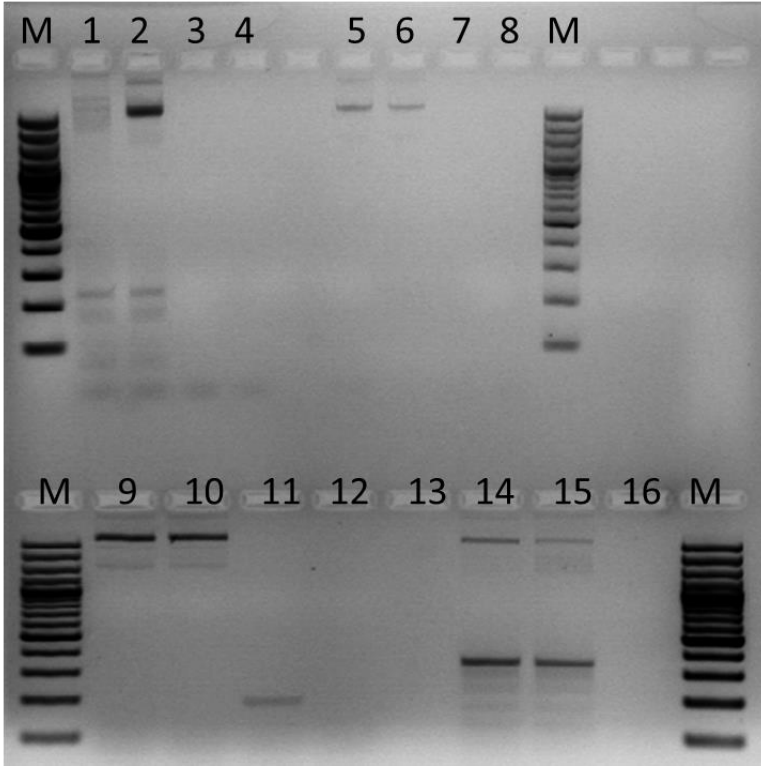
İncelenen Hayvan Sayısı	Enfeksiyon türü	Prevalans	
		Sayı	%
920	Tek türle	21	2,3
	İki türle	190	20,7
	Üç türle	172	18,7
	Dört türle	35	3,8
	Beş türle	16	1,7



Şekil 4.26 İncelenen örneklerde tek ve miks enfeksiyonların dağılım grafiği

4.4 Patojenik *Eimeria* Türleri için Ribosomal ITS-1 Geninin Amplifikasyonu

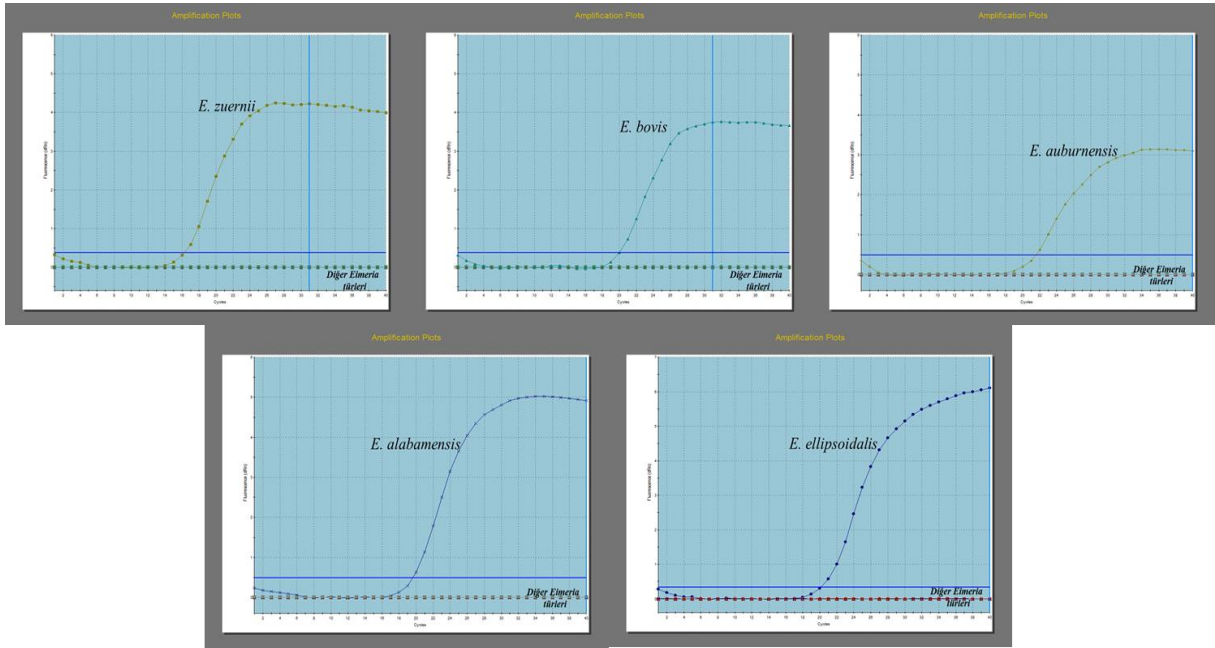
Patojenik *Eimeria* türleri *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii*'nin PCR'da tür spesifik teşhisi için Japon araştırmacılar (Kawahara et al., 2010) tarafından bildirilmiş olan ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primer çiftlerinin, araştırma sahasından izole edilen örnekler için genomik DNA'lar, Japonya referans DNA örnekleri ve yine ilgili türlere ait hedef gen bölgesini ihtiva eden plazmid DNA'lar ile analizleri sonucu *B. bovis* için plazmid DNA izolatlarında hedef büyüklükte (238 bp) bantların yanında non-spesifik bazı amplikonların da şekillendiği görülürken araştırma sahası ve Japonya genomik DNA'ları için reaksiyon şekillenmediği saptanmıştır (Şekil 4.27). *E. auburnensis* ve *E. ellipsoidalis* tür spesifik PCR reaksiyonları sonucu ise plazmid ve genomik DNA'larda amplifikasyonun şekillenmediği belirlenmiştir (Şekil 4.27). *E. alabamensis* için araştırma yöresinde örneklerden izole edilen plazmid ve genomik DNA izolatlarının reaksiyon vermediği buna karşın Japonya *E. alabamensis* referans genomik DNA izolatının hedef büyüklükte (184bp) amplifiye olduğu görülmüştür (Şekil 4.27). *E. zuernii* tür spesifik PCR reaksiyonu sonucu plazmid DNA'da hedef büyüklükte (344bp) amplikonlar görülürken araştırma yöresinden izole edilmiş bazı genomik DNA'larda reaksiyon şekillenmemiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Patojenik *Eimeria* türleri için ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR analizi sonucu amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü. M: Marker (100bp), 1,2: *E. bovis* plazmid DNA; 3: *E. bovis* genomik DNA; 4: *E. bovis* Japonya genomik DNA; 5,6: *E. auburnensis* plazmid DNA; 7: *E. auburnensis* genomik DNA; 8: *E. auburnensis* Japonya genomik DNA; 9,10: *E. alabamensis* plazmid DNA; 11: *E. alabamensis* Japonya genomik DNA; 12: *E. alabamensis* genomik DNA; 13,16: *E. zuernii* genomik DNA; 14,15: *E. zuernii* plazmid DNA

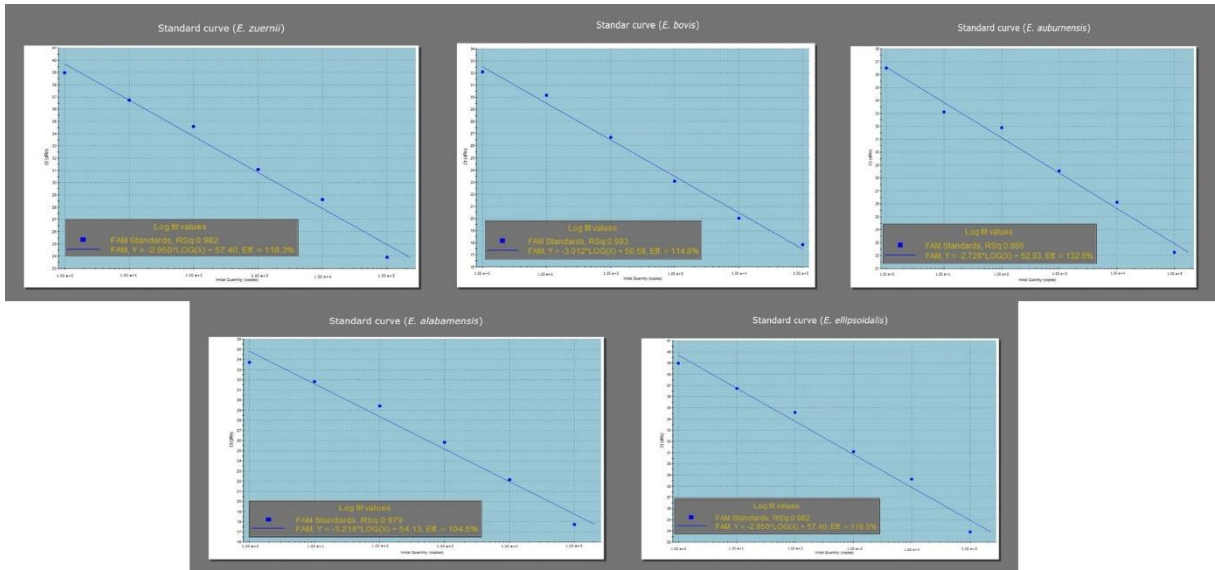
4.5 Patojen Türler İçin Real Time PCR Sonuçları

Dizayn edilen tüm final Real Time PCR markerlarının genetik analizlerle paralel şekilde spesifik olarak hedef türlerini amplifiye ettiği belirlenmiş, hedef dışı sığır *Eimeria* türlerine ait ITS-1 plazmidleri ile reaksiyon vermedikleri saptanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Patojenik *Eimeria* türlerine ait hedef ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primer ve problarla Real Time PCR’da belirlenen amplifikasyon eğrileri.

Her patojenik *Eimeria* türü için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğri analiz sonuçlarına göre TaqMan prob tabanlı Real Time PCR etkinlik oranları yüksek belirlenmiştir (Şekil 4.29). Elde edilen verilerle her bir replikasyonda tüm türler için 10 hedef kopyanın saptanabileceği belirlenmiştir. DNA kopya sayısındaki bu miktar sekiz haploid genom içeren tek bir ookiste karşılık gelmektedir (Vrba et al., 2010).



Şekil 4.29 Patojenik *Eimeria* türleri için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğriler ve etkinlik oranları.

Eimeria ookistleri ile pozitif saptanan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının patojenik *Eimeria* türleri yönünden TaqMan Real Time PCR ile analiz sonuçları, morfolojik identifikasyon sonuçları ile birlikte Tablo 4.20’de verilmiştir. Real Time PCR ile her patojenik *Eimeria* türü için belirlenen pozitiflik morfolojik identifikasyon oranlarına göre daha yüksek saptanmıştır.

Tablo 4.20 *Eimeria* ookistleri ile pozitif saptanan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının patojenik *Eimeria* türleri yönünden TaqMan Real Time PCR sonuçları

Eimeria ookisti pozitif örnek sayısı	Eimeria türü	Pozitiflik			
		Morfolojik identifikasyon		Real Time PCR	
		Sayı	%	Sayı	%
434	<i>E. bovis</i>	265	61,1	270	62,2
	<i>E. zuernii</i>	245	56,5	248	57,1
	<i>E. auburnensis</i>	276	63,6	278	64,1
	<i>E. alabamensis</i>	75	17,3	79	18,2
	<i>E. ellipsoidalis</i>	130	30,0	134	30,9

DNA koya sayısı bazında patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen Ct (dR) değerleri, enfeksiyon yükleri açısından enfekte sığırların yaş grupları ve dışkı karakteri gruplarına göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Ayrıca her kategori için patojenik *Eimeria* türlerinde belirlenen Ct (dR) oranları da istatistiksel anlamda analiz edilmiştir.

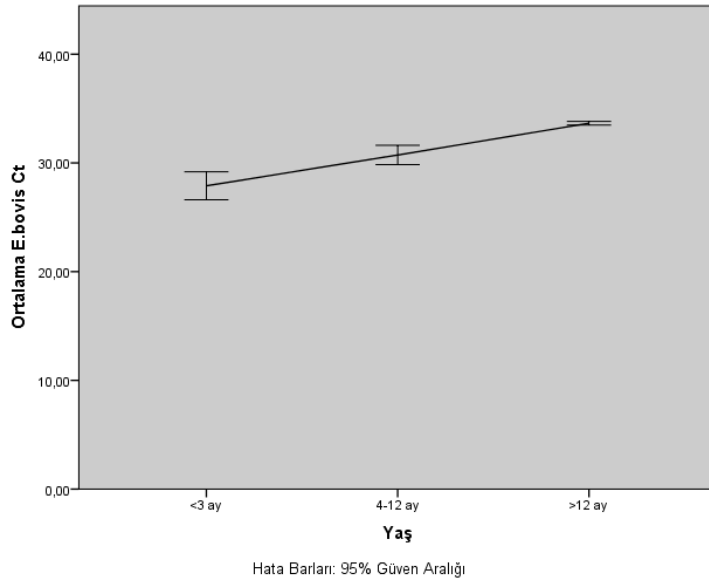
Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.21’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.30). Yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. bovis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.22).

Tablo 4.21 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
<3 ay	N	32	5	23	43
	Ortalama	27,8938	,6457	26,4877	29,1351
	Std. Sapma	3,57130	,43824	2,45014	4,24837
	Std. Hata	,63132			
	Minimum	20,00			
	Maksimum	31,50			
4-12 ay	N	96	8	79	112

	Ortalama	30,7281	,4495	29,8262	31,5787
	Std. Sapma	4,38422	,28544	3,73694	4,91366
	Std. Hata	,44746			
	Minimum	20,00			
	Maksimum	35,00			
>12 ay	N	142	8	127	160
	Ortalama	33,6479	,0852	33,4838	33,8156
	Std. Sapma	,99429	,04936	,89613	1,08909
	Std. Hata	,08344			
	Minimum	31,00			
	Maksimum	35,00			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.30 *E. bovis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.22 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
<3 ay	4-12 ay	-2,83437*	,77382	,002	-4,7311	-,9376
	>12 ay	-5,75414*	,63681	,000	-7,3582	-4,1501
4-12 ay	<3 ay	2,83437*	,77382	,002	,9376	4,7311
	>12 ay	-2,91976*	,45518	,000	-4,0248	-1,8147
>12 ay	<3 ay	5,75414*	,63681	,000	4,1501	7,3582
	4-12 ay	2,91976*	,45518	,000	1,8147	4,0248

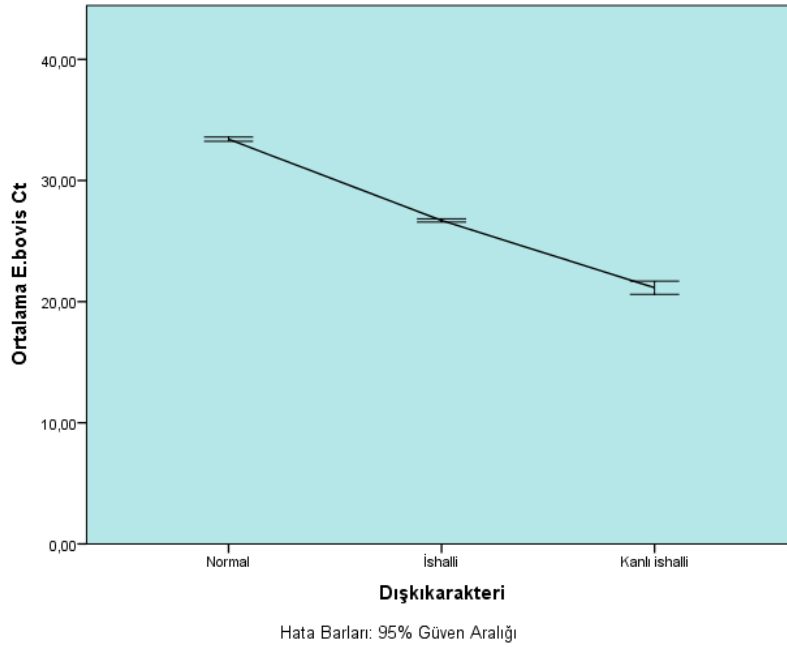
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.23’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishalleri dışkılarında belirlenmiş bunu ishalleri ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.31). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde kanlı ishalleri, ishalleri ve normal dışkı grupları arasında *E. bovis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.24).

Tablo 4.23 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
Normal	N	222	6	209	234
	Ortalama	33,4081	,0870	33,2210	33,5674
	Std. Sapma	1,31339	,06588	1,18230	1,44086
	Std. Hata	,08815			
	Minimum	29,50			
	Maksimum	35,00			
İshalleri	N	34	5	24	46
	Ortalama	26,7000	,0639	26,5724	26,8310
	Std. Sapma	,39080	,07025	,25540	,51747
	Std. Hata	,06702			
	Minimum	26,00			
	Maksimum	28,00			
Kanlı ishalleri	N	14	4	7	21
	Ortalama	21,1500	,2466	20,6667	21,6538
	Std. Sapma	,94686	,17723	,50687	1,18487
	Std. Hata	,25306			
	Minimum	20,00			
	Maksimum	23,20			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.31 *E. bovis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

Tablo 4.24 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Dışkı karakteri	(J) Dışkı karakteri	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Normal	İshalli	6,70811*	,11074	,000	6,4411	6,9751
	Kanlı ishalleri	12,25811*	,26797	,000	11,5457	12,9705
İshalli	Normal	-6,70811*	,11074	,000	-6,9751	-6,4411
	Kanlı ishalleri	5,55000*	,26178	,000	4,8462	6,2538
Kanlı ishalleri	Normal	-12,25811*	,26797	,000	-12,9705	-11,5457
	İshalli	-5,55000*	,26178	,000	-6,2538	-4,8462

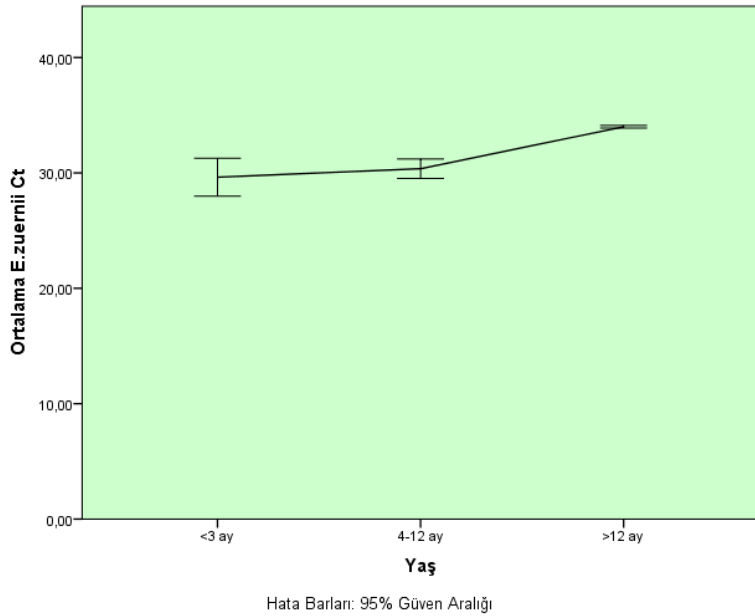
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri Tablo 4.25’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.32). <3 ay ve 4-12 ay ile >12 ay yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. zuernii* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0,05$) saptanmıştır (Tablo 4.26).

Tablo 4.25 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
<3 ay	N	28	5	19	38
	Ortalama	29,6286	,7862	27,9771	31,0516
	Std. Sapma	4,24350	,40216	3,27918	4,86789
	Std. Hata	,80195			
	Minimum	22,00			
	Maksimum	35,00			
4-12 ay	N	84	7	70	99
	Ortalama	30,3643	,4264	29,4691	31,1720
	Std. Sapma	3,88279	,20852	3,43222	4,24079
	Std. Hata	,42365			
	Minimum	22,30			
	Maksimum	35,50			
>12 ay	N	136	8	121	151
	Ortalama	33,9985	,0596	33,8789	34,1080
	Std. Sapma	,70847	,02730	,64479	,75448
	Std. Hata	,06075			
	Minimum	33,00			
	Maksimum	35,00			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.32 *E. zuernii* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.26 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
<3 ay	4-12 ay	-,73571	,90697	,807	-2,9887	1,5173
	>12 ay	-4,36996*	,80424	,000	-6,4153	-2,3246
4-12 ay	<3 ay	,73571	,90697	,807	-1,5173	2,9887
	>12 ay	-3,63424*	,42798	,000	-4,6763	-2,5922
>12 ay	<3 ay	4,36996*	,80424	,000	2,3246	6,4153
	4-12 ay	3,63424*	,42798	,000	2,5922	4,6763

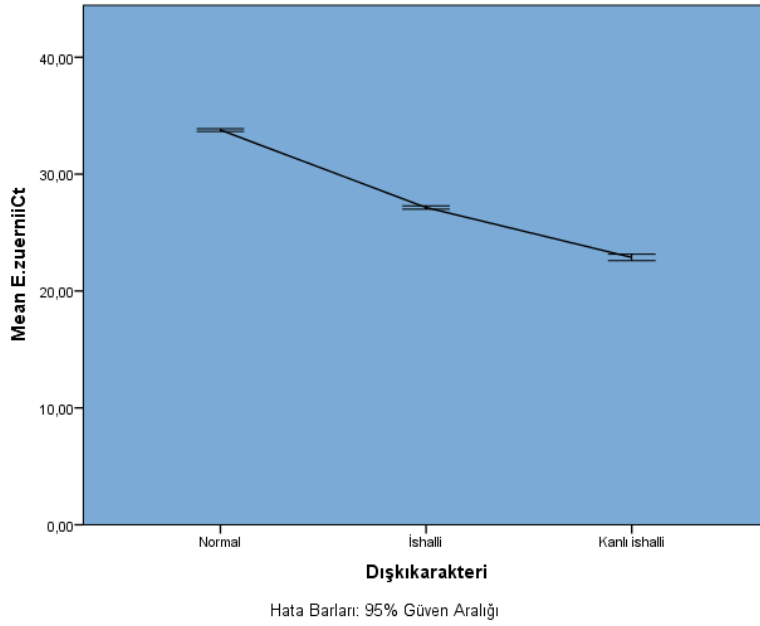
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri Tablo 4.27’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishallerde belirlenmiş bunu ishaller ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.33). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. zuernii* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.28).

Tablo 4.27 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
Normal	N	201	6	188	213
	Ortalama	33,7716	,0602	33,6529	33,8887
	Std. Sapma	,85530	,04731	,75724	,94852
	Std. Hata	,06033			
	Minimum	31,00			
	Maksimum	35,50			
İshaller	N	33	6	23	44
	Ortalama	27,1424	,0701	27,0039	27,2839
	Std. Sapma	,40002	,04238	,30501	,47246
	Std. Hata	,06964			
	Minimum	26,30			
	Maksimum	28,00			
Kanlı ishaller	N	14	4	7	21
	Ortalama	22,8714	,1322	22,6201	23,1375
	Std. Sapma	,48584	,07313	,31403	,59636
	Std. Hata	,12985			
	Minimum	22,00			
	Maksimum	23,50			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.33 *E. zuernii* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

Tablo 4.28 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Dışkı karakteri	(J) Dışkı karakteri	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Normal	İshalli	6,62922*	,09213	,000	6,4051	6,8534
	Kanlı ishalli	10,90021*	,14318	,000	10,5258	11,2746
İshalli	Normal	-6,62922*	,09213	,000	-6,8534	-6,4051
	Kanlı ishalli	4,27100*	,14734	,000	3,8886	4,6534
Kanlı ishalli	Normal	-10,90021*	,14318	,000	-11,2746	-10,5258
	İshalli	-4,27100*	,14734	,000	-4,6534	-3,8886

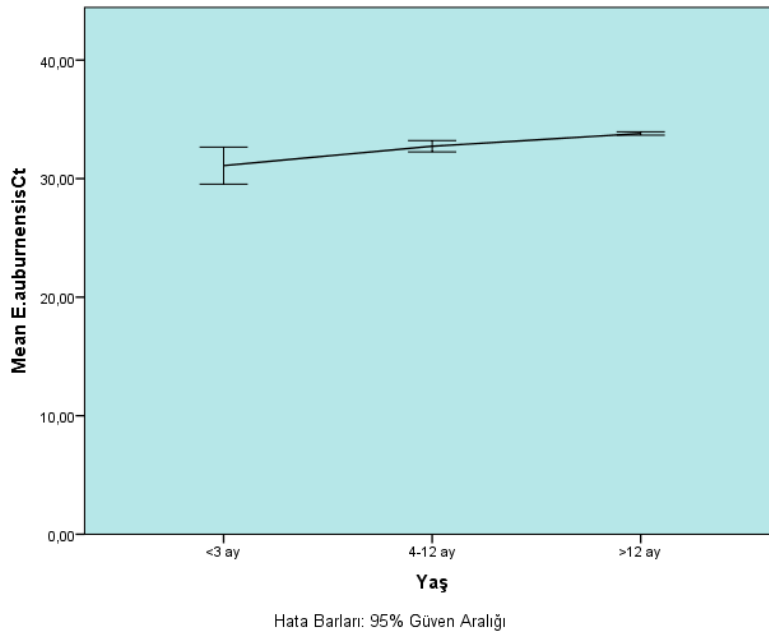
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.29'da verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.34). <3 ay ve 4-12 ay ile >12 ay yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0,05$) saptanmıştır (Tablo 4.30).

Tablo 4.29 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
<3 ay	N	30	5	20	40
	Ortalama	31,0967	,7699	29,5097	32,4964
	Std. Sapma	4,19355	,55948	2,94621	5,04288
	Std. Hata	,76563			
	Minimum	22,20			
	Maksimum	35,50			
4-12 ay	N	95	8	80	110
	Ortalama	32,7326	,2376	32,2201	33,1922
	Std. Sapma	2,33978	,29948	1,69222	2,86465
	Std. Hata	,24006			
	Minimum	32,40			
	Maksimum	35,50			
>12 ay	N	153	8	80	110
	Ortalama	33,8065	,2376	32,2201	33,1922
	Std. Sapma	,90129	,29948	1,69222	2,86465
	Std. Hata	,07287			
	Minimum	32,40			
	Maksimum	35,50			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.34 *E. auburnensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.30 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

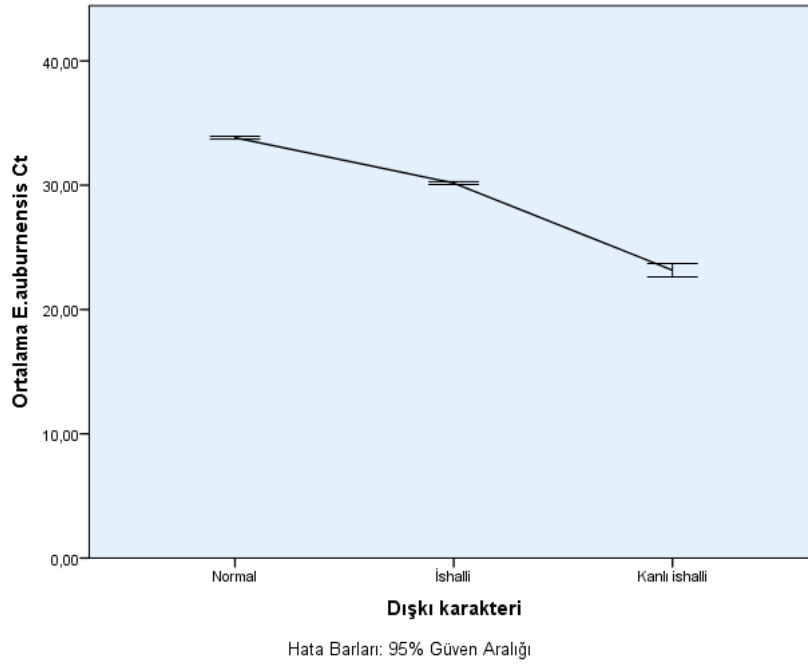
(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
<3 ay	4-12 ay	-1,63596	,80239	,140	-3,6482	,3763
	>12 ay	-2,70987*	,76909	,004	-4,6563	-,7634
4-12 ay	<3 ay	1,63596	,80239	,140	-,3763	3,6482
	>12 ay	-1,07390*	,25087	,000	-1,6820	-,4658
>12 ay	<3 ay	2,70987*	,76909	,004	,7634	4,6563
	4-12 ay	1,07390*	,25087	,000	,4658	1,6820

*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.31’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishalleri dışkılarında belirlenmiş bunu ishalleri ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.35). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.32).

Tablo 4.31 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
Normal	N	242	6	230	253
	Ortalama	33,8215	,0580	33,7063	33,9362
	Std. Sapma	,90262	,03665	,82711	,96757
	Std. Hata	,05802			
	Minimum	32,40			
	Maksimum	35,50			
İshalleri	N	28	5	18	38
	Ortalama	30,1714	,0551	30,0625	30,2727
	Std. Sapma	,28913	,02503	,22897	,32822
	Std. Hata	,05464			
	Minimum	29,70			
	Maksimum	30,50			
Kanlı ishalleri	N	8	3	3	14
	Ortalama	23,1625	,2354	22,6669	23,6250
	Std. Sapma	,64573	,15035	,23625	,83071
	Std. Hata	,22830			
	Minimum	22,20			
	Maksimum	24,00			



Şekil 4.35 *E. auburnensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

Tablo 4.32 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Dışkı karakteri	(J) Dışkı karakteri	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Normal	İshalli	3,65006*	,07970	,000	3,4567	3,8434
	Kanlı ishali	10,65899*	,23556	,000	9,9497	11,3683
İshalli	Normal	-3,65006*	,07970	,000	-3,8434	-3,4567
	Kanlı ishali	7,00893*	,23475	,000	6,2995	7,7184
Kanlı ishali	Normal	-10,65899*	,23556	,000	-11,3683	-9,9497
	İshalli	-7,00893*	,23475	,000	-7,7184	-6,2995

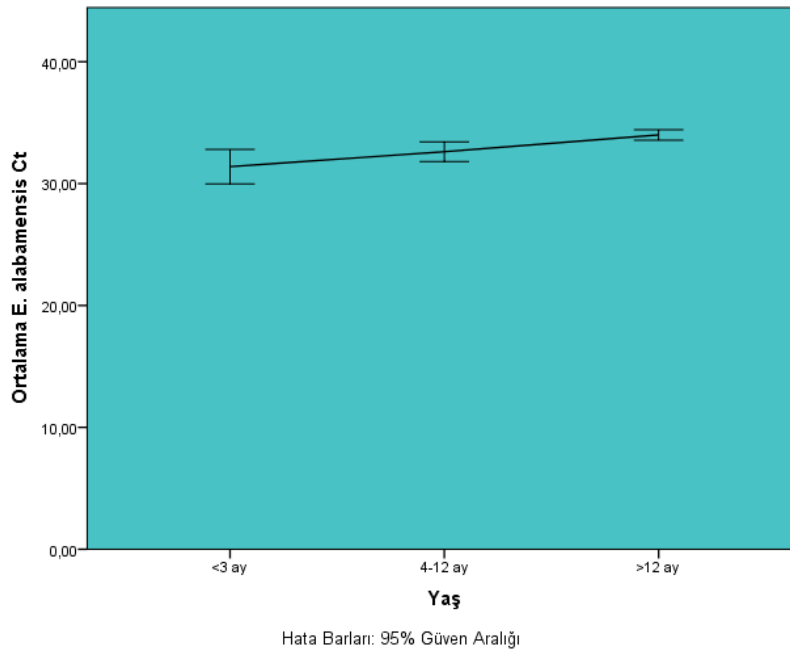
^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.33’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.36). <3 ay ve 4-12 ay ile >12 ay yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. alabamensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0,05$) saptanmıştır (Tablo 4.34).

Tablo 4.33 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
<3 ay	N	20	4	13	28
	Ortalama	31,3900	,6702	30,0048	32,6998
	Std. Sapma	3,02531	,25847	2,40849	3,43166
	Std. Hata	,67648			
	Minimum	26,20			
	Maksimum	35,50			
4-12 ay	N	40	4	32	49
	Ortalama	32,6175	,3871	31,8770	33,3795
	Std. Sapma	2,54134	,24489	1,96936	2,93883
	Std. Hata	,40182			
	Minimum	26,80			
	Maksimum	35,50			
>12 ay	N	19	4	12	27
	Ortalama	33,9947	,1966	33,6060	34,3727
	Std. Sapma	,89036	,10419	,65742	1,05254
	Std. Hata	,20426			
	Minimum	32,60			
	Maksimum	35,50			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.36 *E. alabamensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.34 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

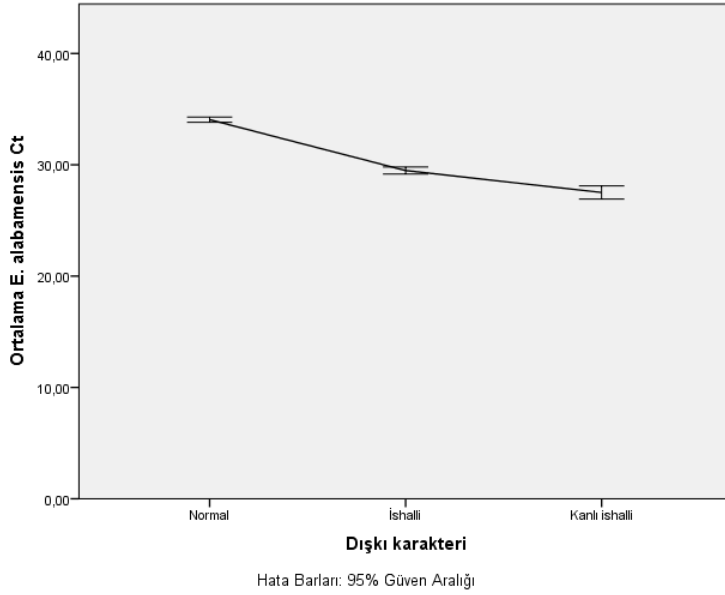
(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst Sınır
<3 ay	4-12 ay	-1,22750	,78682	,338	-3,2071	,7521
	>12 ay	-2,60474*	,70665	,004	-4,4276	-,7819
4-12 ay	<3 ay	1,22750	,78682	,338	-,7521	3,2071
	>12 ay	-1,37724*	,45076	,010	-2,4880	-,2665
>12 ay	<3 ay	2,60474*	,70665	,004	,7819	4,4276
	4-12 ay	1,37724*	,45076	,010	,2665	2,4880

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.35’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishelli dışkılarda belirlenmiş bunu ishelli ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.37). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. alabamensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.36).

Tablo 4.35 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
Normal	N	58	4	49	66
	Ortalama	34,0517	,1137	33,8241	34,2629
	Std. Sapma	,87924	,05634	,75189	,97840
	Std. Hata	,11545			
	Minimum	32,60			
	Maksimum	35,50			
İshelli	N	13	3	7	21
	Ortalama	29,4846	,1370	29,2000	29,7500
	Std. Sapma	,52416	,08883	,29216	,64419
	Std. Hata	,14538			
	Minimum	28,50			
	Maksimum	30,10			
Kanlı ishelli	N	8	3	3	13
	Ortalama	27,5125	,2468	27,0000	27,9599
	Std. Sapma	,70394	,19028	,20656	,94529
	Std. Hata	,24888			
	Minimum	26,20			
	Maksimum	28,20			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.37 *E. alabamensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

Tablo 4.36 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Dışkı karakteri	(J) Dışkı karakteri	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Normal	İshalli	4,56711*	,18564	,000	4,0972	5,0370
	Kanlı ishalli	6,53922*	,27436	,000	5,7586	7,3198
İshalli	Normal	-4,56711*	,18564	,000	-5,0370	-4,0972
	Kanlı ishalli	1,97212*	,28823	,000	1,1714	2,7728
Kanlı ishalli	Normal	-6,53922*	,27436	,000	-7,3198	-5,7586
	İshalli	-1,97212*	,28823	,000	-2,7728	-1,1714

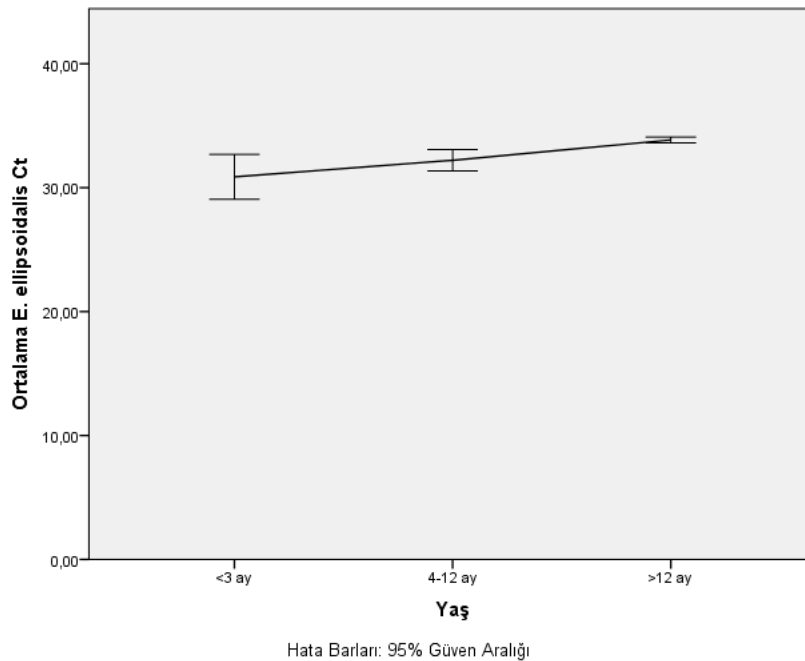
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. ellipsoidal*s Ct (dR) değerleri Tablo 4.37'de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.38). <3 ay ve 4-12 ay ile >12 ay yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. ellipsoidal*s pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz ($p > 0,05$) saptanmıştır (Tablo 4.38).

Tablo 4.37 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. ellipsoidalıs* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
<3 ay	N	20	4	12	28
	Ortalama	30,8750	,8500	28,9609	32,3562
	Std. Sapma	3,86249	,69182	2,04222	4,92199
	Std. Hata	,86368			
	Minimum	22,30			
	Maksimum	35,50			
4-12 ay	N	50	6	39	61
	Ortalama	32,2100	,4164	31,4001	32,9819
	Std. Sapma	3,02684	,45987	2,05241	3,79971
	Std. Hata	,42806			
	Minimum	23,50			
	Maksimum	35,50			
>12 ay	N	64	6	52	76
	Ortalama	33,8531	,1152	33,6382	34,0836
	Std. Sapma	,93384	,07129	,78054	1,06140
	Std. Hata	,11673			
	Minimum	32,40			
	Maksimum	35,50			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.38 *E. ellipsoidalis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.38 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. ellipsoidalis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst Sınır
<3 ay	4-12 ay	-1,33500	,96394	,442	-3,7782	1,1082
	>12 ay	-2,97813*	,87153	,008	-5,2514	-,7049
4-12 ay	<3 ay	1,33500	,96394	,442	-1,1082	3,7782
	>12 ay	-1,64313*	,44369	,001	-2,7350	-,5513
>12 ay	<3 ay	2,97813*	,87153	,008	,7049	5,2514
	4-12 ay	1,64313*	,44369	,001	,5513	2,7350

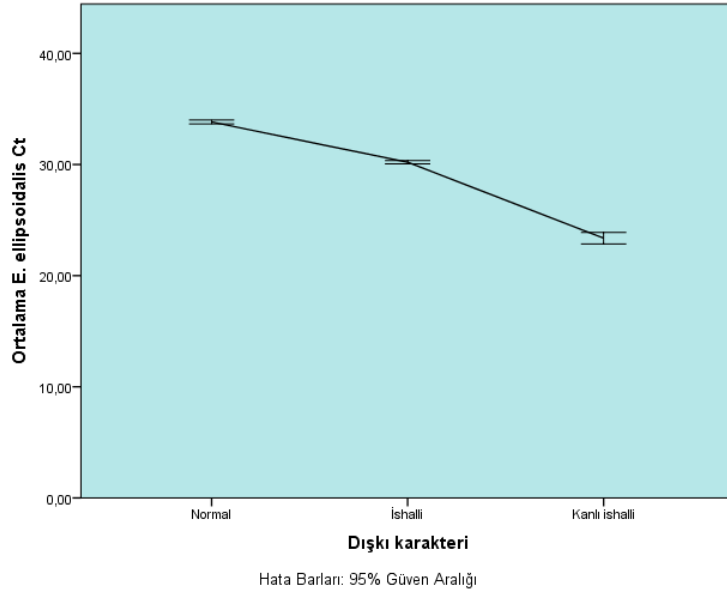
Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. ellipsoidalis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.39’da verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishalleri dışkılarında belirlenmiş bunu ishalleri ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.39). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. ellipsoidalis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.40).

Tablo 4.39 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. ellipsoidalis* Ct (dR) değerleri

		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven Aralığı	
				Alt	Üst
Normal	N	109	4	100	117
	Ortalama	33,8284	,0855	33,6670	34,0019
	Std. Sapma	,90145	,05227	,78739	,99041
	Std. Hata	,08634			
	Minimum	32,40			
	Maksimum	35,50			
İshalleri	N	18	4	11	26
	Ortalama	30,2056	,0647	30,0786	30,3294
	Std. Sapma	,29200	,03753	,19353	,34517
	Std. Hata	,06882			
	Minimum	29,70			
	Maksimum	30,50			
Kanlı ishalleri	N	7	3	3	12
	Ortalama	23,3714	,2119	22,9333	23,7571
	Std. Sapma	,55891	,19037	,08888	,81240
	Std. Hata	,21125			

Minimum	22,30			
Maksimum	24,00			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



Şekil 4.39 *E. ellipsoidalis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

Tablo 4.40 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. ellipsoidalis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

(I) Dışkı karakteri	(J) Dışkı karakteri	Ortalama Farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Normal	İshalli	3,62288*	,11042	,000	3,3537	3,8921
	Kanlı ishalli	10,45701*	,22821	,000	9,7747	11,1394
İshalli	Normal	-3,62288*	,11042	,000	-3,8921	-3,3537
	Kanlı ishalli	6,83413*	,22218	,000	6,1505	7,5177
Kanlı ishalli	Normal	-10,45701*	,22821	,000	-11,1394	-9,7747
	İshalli	-6,83413*	,22218	,000	-7,5177	-6,1505

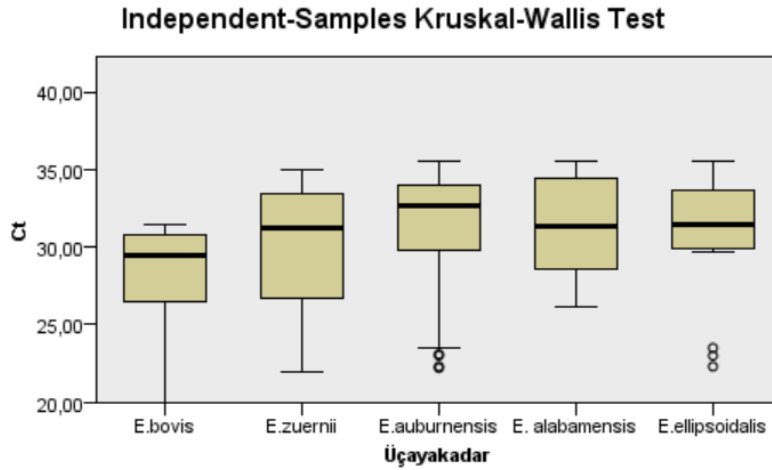
*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen <3 ay yaş grubu örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.41’de verilmiştir. Bu yaş grubu içerisinde DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik *E. bovis* için saptanmış bunu *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* türleri izlemiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.40’da, türler arasındaki istatistiksel farklılıklar ise Şekil 4.41’de verilmiştir. Şekil 4.41’de

görüldüğü üzere *E. bovis* ve diğer patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.41 <3 ay yaş grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

<3 ay	Ortalama	N	Std. Sapma	Std. Hata	Minimum	Maximum
E.bovis	27,8938	32	3,57130	,63132	20,00	31,50
E.zuernii	29,6286	28	4,24350	,80195	22,00	35,00
E.auburnensis	31,0967	30	4,19355	,76563	22,20	35,50
E. alabamensis	31,3900	20	3,02531	,67648	26,20	35,50
E.ellipsoidalis	30,8750	20	3,86249	,86368	22,30	35,50
Toplam	30,0031	130	4,02008	,35258	20,00	35,50



Total N	130
Test Statistic	17,765
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,001

Şekil 4.40 Patojenik *Eimeria* türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

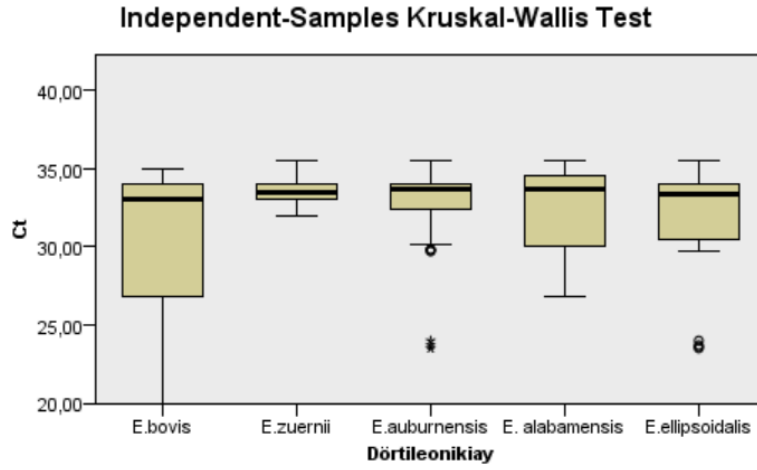
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
E.bovis-E.zuernii	-20,154	9,743	-2,068	,039	,386
E.bovis-E.ellipsoidalis	-31,422	10,733	-2,928	,003	,034
E.bovis-E. alabamensis	-32,622	10,733	-3,040	,002	,024
E.bovis-E.auburnensis	-35,655	9,569	-3,726	,000	,002
E.zuernii-E.ellipsoidalis	-11,268	11,023	-1,022	,307	1,000
E.zuernii-E. alabamensis	-12,468	11,023	-1,131	,258	1,000
E.zuernii-E.auburnensis	-15,501	9,894	-1,567	,117	1,000
E.ellipsoidalis-E. alabamensis	1,200	11,907	,101	,920	1,000
E.ellipsoidalis-E.auburnensis	4,233	10,869	,389	,697	1,000
E. alabamensis-E.auburnensis	3,033	10,869	,279	,780	1,000

Şekil 4.41 Patojenik *Eimeria* türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen 4-12 ay yaş grubu örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.42’de verilmiştir. Bu yaş grubundaki türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.42’de verilmiştir. Şekil 4.42’de görüldüğü üzere bu yaş gurubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.42 4-12 ay yaş grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

4-12 ay	Ortalama	N	Std. Sapma	Std. Hata	Minimum	Maximum
E.bovis	30,7281	96	4,38422	,44746	20,00	35,00
E.zuernii	33,4204	49	,81802	,11686	32,00	35,50
E.auburnensis	32,7326	95	2,33978	,24006	23,50	35,50
E. alabamensis	32,6175	40	2,54134	,40182	26,80	35,50
E.ellipsoidalis	32,2100	50	3,02684	,42806	23,50	35,50
Toplam	32,1585	330	3,20897	,17665	20,00	35,50



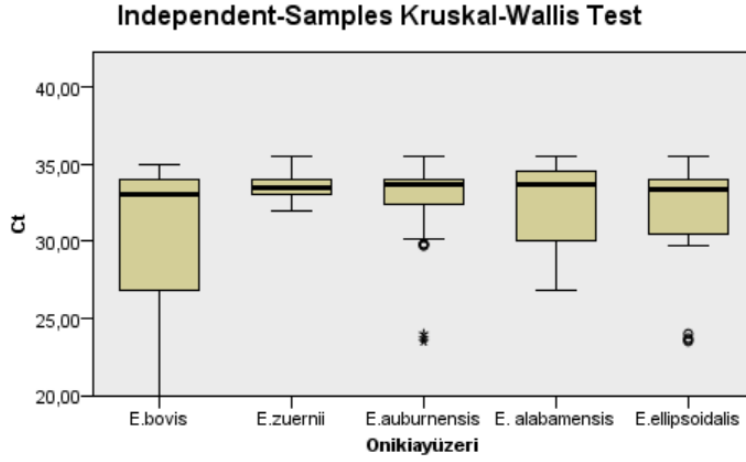
Total N	330
Test Statistic	7,689
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,104

Şekil 4.42 Patojenik *Eimeria* türleri için 4-12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen >12 ay yaş grubu örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.43’de verilmiştir. Bu yaş grubunda türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.43’de verilmiştir. Şekil 4.43’de görüldüğü üzere bu yaş gurubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.43 >12 ay yaş grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

>12 ay	Ortalama	N	Std. Sapma	Std. Hata	Minimum	Maximum
<i>E.bovis</i>	30,7281	96	4,38422	,44746	35,00	,44746
<i>E.zuernii</i>	33,4204	49	,81802	,11686	35,50	,11686
<i>E.auburnensis</i>	32,7326	95	2,33978	,24006	35,50	,24006
<i>E. alabamensis</i>	32,6175	40	2,54134	,40182	35,50	,40182
<i>E.ellipsoidalis</i>	32,2100	50	3,02684	,42806	35,50	,42806
Toplam	32,1585	330	3,20897	,17665	35,50	,17665



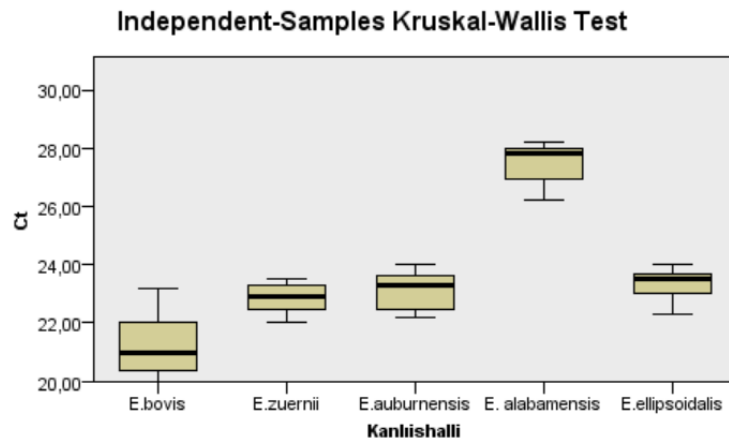
Total N	330
Test Statistic	7,689
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,104

Şekil 4.43 Patojenik *Eimeria* türleri için >12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen dışkı karakterine göre kanlı ishalli gruptaki örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.44’de verilmiştir. Bu grup içerisinde DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik *E. bovis* için saptanmış bunu *E. zuernii*, *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. alabamensis* türleri izlemiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.44’de verilmiştir. Şekil 4.45’de görüldüğü üzere kanlı ishalli gurubunda *E. bovis* ile diğer patojenik türlerin Ct değerleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Bunun yanında *E. zuernii* ve *E. alabamensis* türlerinin arasındaki farklılık da önemli saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.44 Kanlı ishalli dışkı grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

Kanlıishalli	Ortalama	N	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	Std. Hata
<i>E.bovis</i>	21,1500	14	,94686	20,00	23,20	,25306
<i>E.zuernii</i>	22,8714	14	,48584	22,00	23,50	,12985
<i>E.auburnensis</i>	23,1625	8	,64573	22,20	24,00	,22830
<i>E.alabamensis</i>	27,5125	8	,70394	26,20	28,20	,24888
<i>E.ellipsoidalis</i>	23,3714	7	,55891	22,30	24,00	,21125
Toplam	23,2412	51	2,15520	20,00	28,20	,30179



Total N	51
Test Statistic	37,899
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,000

Şekil 4.44 Patojenik *Eimeria* türleri için kanlı ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

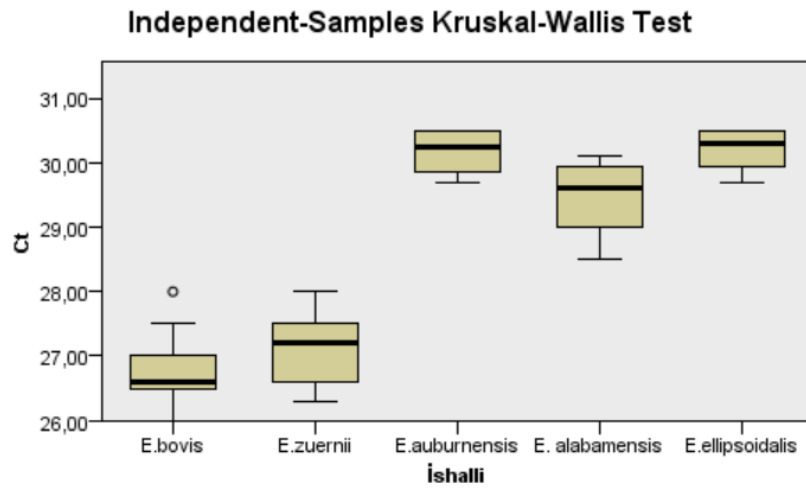
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
E.bovis-E.zuernii	-16,000	5,602	-2,856	,004	,043
E.bovis-E.auburnensis	-20,857	6,569	-3,175	,001	,015
E.bovis-E.ellipsoidalis	-24,679	6,861	-3,597	,000	,003
E.bovis-E. alabamensis	-38,607	6,569	-5,877	,000	,000
E.zuernii-E.auburnensis	-4,857	6,569	-,739	,460	1,000
E.zuernii-E.ellipsoidalis	-8,679	6,861	-1,265	,206	1,000
E.zuernii-E. alabamensis	-22,607	6,569	-3,441	,001	,006
E.auburnensis-E.ellipsoidalis	-3,821	7,671	-,498	,618	1,000
E.auburnensis-E. alabamensis	-17,750	7,411	-2,395	,017	,166
E.ellipsoidalis-E. alabamensis	13,929	7,671	1,816	,069	,694

Şekil 4.45 Patojenik *Eimeria* türleri için kanlı ishalleri dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları

Dışkı karakterine göre ishalleri gruptaki örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.45’de verilmiştir. Bu grup içerisinde DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik *E. bovis* için saptanmış bunu *E. zuernii*, *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. alabamensis* türleri izlemiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.46’da verilmiştir. Şekil 4.46’da görüldüğü üzere ishalleri dışkı grubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Patojenik türlerin ikili kıyaslama sonuçları Şekil 4.47’de gösterilmiştir. İshalleri dışkı grubunda *E. bovis* ve *E. zuernii* ortalama Ct değerleri ile diğer türlerin ortalama Ct değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.45 İshalli dışkı grubu örneklerinde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

İshalli	Ortalama	N	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	Std. Hata
E.bovis	21,1500	14	,94686	20,00	23,20	,25306
E.zuernii	22,8714	14	,48584	22,00	23,50	,12985
E.auburnensis	23,1625	8	,64573	22,20	24,00	,22830
E. alabamensis	27,5125	8	,70394	26,20	28,20	,24888
E. ellipsoidalis	23,3714	7	,55891	22,30	24,00	,21125
Toplam	23,2412	51	2,15520	20,00	28,20	,30179



Total N	126
Test Statistic	103,382
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,000

Şekil 4.46 Patojenik *Eimeria* türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

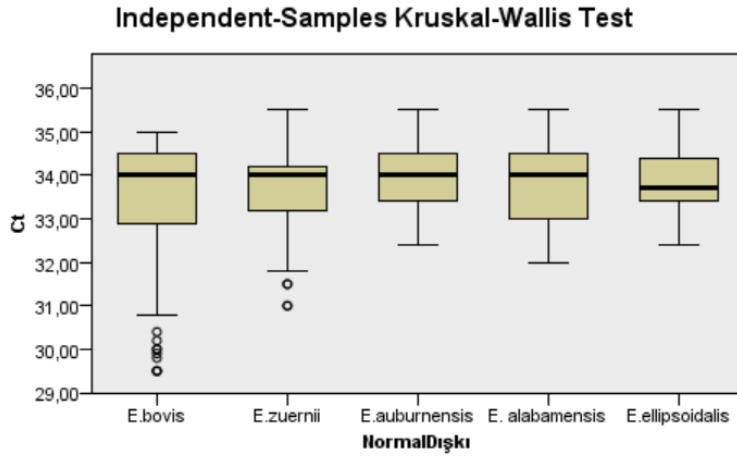
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
E.bovis-E.zuernii	-20,452	8,898	-2,298	,022	,215
E.bovis-E. alabamensis	-54,881	11,874	-4,622	,000	,000
E.bovis-E.auburnensis	-77,520	9,293	-8,342	,000	,000
E.bovis-E.ellipsoidalis	-79,296	10,614	-7,471	,000	,000
E.zuernii-E. alabamensis	-34,429	11,924	-2,887	,004	,039
E.zuernii-E.auburnensis	-57,068	9,356	-6,100	,000	,000
E.zuernii-E.ellipsoidalis	-58,843	10,670	-5,515	,000	,000
E. alabamensis-E.auburnensis	22,639	12,221	1,852	,064	,640
E. alabamensis-E.ellipsoidalis	-24,415	13,254	-1,842	,065	,655
E.auburnensis-E.ellipsoidalis	-1,776	11,001	-,161	,872	1,000

Şekil 4.47 Patojenik *Eimeria* türleri için ishalleri dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları

Dışkı karakterine göre normal dışkı grubundaki örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.46’da verilmiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.48’de gösterilmiştir. Şekil 4.48’de görüldüğü üzere normal dışkı grubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.46 Normal dışkı grubu örneklerinde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

Normal dışkı	Ortalama	N	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	Std. Hata
E.bovis	33,4081	222	1,31339	29,50	35,00	,08815
E.zuernii	33,7716	201	,85530	31,00	35,50	,06033
E.auburnensis	33,8215	242	,90262	32,40	35,50	,05802
E. alabamensis	33,9345	58	,88804	32,00	35,50	,11661
E.ellipsoidalis	33,8284	109	,90145	32,40	35,50	,08634
Toplam	33,7079	832	1,03201	29,50	35,50	,03578

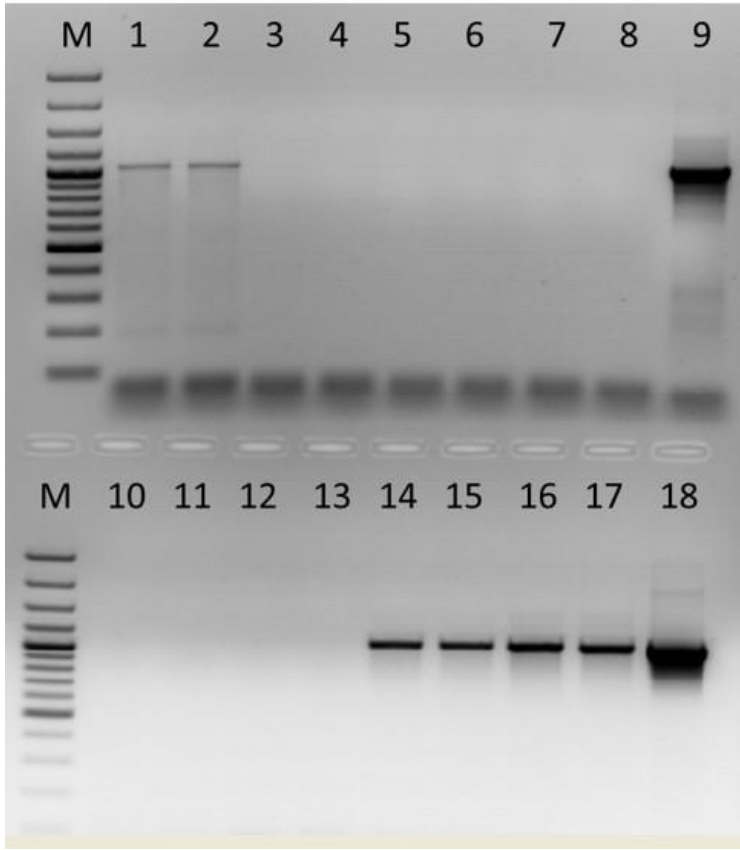


Total N	832
Test Statistic	7,981
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,092

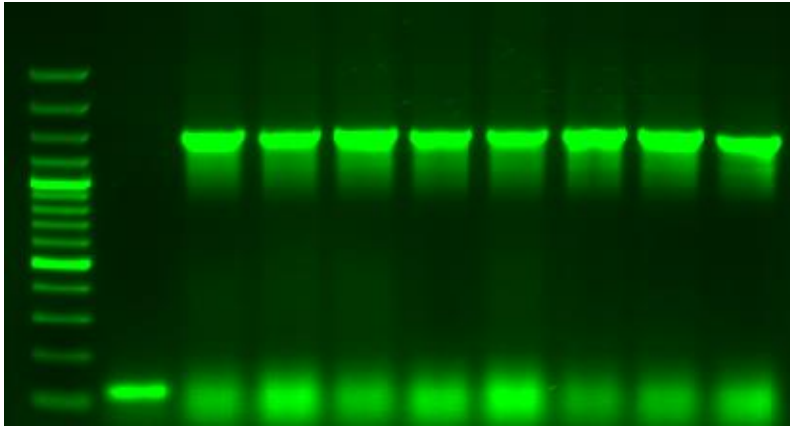
Şekil 4.48 Patojenik *Eimeria* türleri için normal dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

4.6 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

Morfolojik identifikasyon ve Real Time PCR sonuçları temelinde çeşitli *Eimeria* türleri ile enfekte bulunan örnekler için ve tek ookistlerden elde edilmiş genomik DNA izolatlarının 18S rRNA gen bölgesinin dizayn edilen primerlerle amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte (~1057 bp) ampliconlar saptanmıştır (Şekil 4.49). Elde edilen bu ampliconların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu belirlenmiş (Şekil 4.50) ve sonrasında kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Miks enfekte örnekler için klonlama sonrası agar üzerinde belirlenen kolonilerden farklı *Eimeria* türlerine ait insertlerin yakalanabileceği göz önüne alınarak her izolat için en az üç ayrı koloni seçilmiş ve plazmid pürifikasyonları yapılmıştır.



Şekil 4.49 Bazı *Eimeria* pozitif örneklerle ait izolatların parsiyel 18S subunit (SSU) rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1,2,14-17: Pozitif örnekler; 9: *E. zuernii* pozitif kontrol (Japonya); 18: *E. bovis* pozitif kontrol (Japonya); 3-8,10-13: Negatif örnekler



Şekil 4.50 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle 18S rRNA gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları.

18S rRNA gen bölgesine göre sekans analizlerine dahil edilen izolatlara ait morfolojik ve Real Time PCR analiz sonuçları Tablo 4.47'de verilmiştir.

Tablo 4.47 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları

Genomik DNA İzolatı	Morfolojik İdentifikasyon	Real Time PCR (Patojenik türler)	DNA izolasyon kaynağı
İzolat 1	<i>E. zuernii</i>	<i>E. zuernii</i>	Tek ookist
İzolat 2	<i>E. zuernii</i>	<i>E. zuernii</i>	Tek ookist
İzolat 3	<i>E. zuernii</i>	<i>E. zuernii</i>	Tek ookist
İzolat 4	<i>E. bovis</i> , <i>E. wyomingensis</i> , <i>E. zuernii</i> , <i>E. pellita</i>	<i>E. bovis</i> , <i>E. zuernii</i>	Miks enfekte
İzolat 5	<i>E. bovis</i>	<i>E. bovis</i>	Tek ookist
İzolat 6	<i>E. bovis</i>	<i>E. bovis</i>	Tek ookist
İzolat 7	<i>E. bovis</i>	<i>E. bovis</i>	Tek ookist
İzolat 8	<i>E. bovis</i>	<i>E. bovis</i>	Tek ookist
İzolat 9	<i>E. bovis</i> , <i>E. wyomingensis</i> , <i>E. cylindrica</i>	<i>E. bovis</i>	Miks enfekte
İzolat 10	<i>E. bovis</i> , <i>E. wyomingensis</i> , <i>E. canadensis</i>	<i>E. bovis</i>	Miks enfekte
İzolat 11	<i>E. bovis</i> , <i>E. subspherica</i> , <i>E. pellita</i>	<i>E. bovis</i>	Miks enfekte
İzolat 12	<i>E. bovis</i> , <i>E. brasiliensis</i> , <i>E. bukidnonensis</i>	<i>E. bovis</i>	Miks enfekte
İzolat 13	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. auburnensis</i>	Tek ookist
İzolat 14	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. auburnensis</i>	Tek ookist
İzolat 15	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. auburnensis</i>	Tek ookist
İzolat 16	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. auburnensis</i>	Tek ookist
İzolat 17	<i>E. auburnensis</i> , <i>E. zuernii</i> , <i>E. bovis</i> , <i>E. alabamensis</i>	<i>E. auburnensis</i> , <i>E. zuernii</i> , <i>E. bovis</i>	Miks enfekte
İzolat 18	<i>E. alabamensis</i>	<i>E. alabamensis</i>	Tek ookist
İzolat 19	<i>E. alabamensis</i>	<i>E. alabamensis</i>	Tek ookist
İzolat 20	<i>E. alabamensis</i>	<i>E. alabamensis</i>	Tek ookist
İzolat 21	<i>E. alabamensis</i>	<i>E. alabamensis</i>	Tek ookist
İzolat 22	<i>E. ellipsoidalıs</i>	<i>E. ellipsoidalıs</i>	Tek ookist
İzolat 23	<i>E. ellipsoidalıs</i>	<i>E. ellipsoidalıs</i>	Tek ookist
İzolat 24	<i>E. ellipsoidalıs</i>	<i>E. ellipsoidalıs</i>	Tek ookist
İzolat 25	<i>E. ellipsoidalıs</i> , <i>E. bovis</i>	<i>E. ellipsoidalıs</i> , <i>E. bovis</i>	Miks enfekte
İzolat 26	<i>E. wyomingensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 27	<i>E. wyomingensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 28	<i>E. brasiliensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 29	<i>E. brasiliensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 30	<i>E. brasiliensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 31	<i>E. subspherica</i>	-	Tek ookist
İzolat 32	<i>E. subspherica</i>	-	Tek ookist

İzolat 33	<i>E. bukidnonensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 34	<i>E. bukidnonensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 35	<i>E. illinoisensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 36	<i>E. illinoisensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 37	<i>E. pellita</i>	-	Tek ookist
İzolat 38	<i>E. pellita</i>	-	Tek ookist
İzolat 39	<i>E.canadensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 40	<i>E.canadensis</i>	-	Tek ookist
İzolat 41	<i>E. cylindrica</i>	-	Tek ookist
İzolat 42	<i>E. cylindrica</i>	-	Tek ookist

Elde edilen toplam 51 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekans analizi sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür konfirmasyonları sağlanmış olup (Tablo 4.48) ilgili izolatlar tür bazlı olarak KU351687-708 aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

Tablo 4.48 18S rRNA Sekansları sağlanan *Eimeria* izolatlarının tür, izolasyon bölgesi ve nükleotid kompozisyonları

İzolat (Plazmid)	Ait olduğu genomik DNA izolatı	Tür	İzolasyon bölgesi	Nükleotid kompozisyonu (%)				
				T	C	A	G	Toplam baz sayısı
ERU-Ezue1	İzolat 1	<i>E. zuernii</i>	Kayseri	27,4	20,1	25,3	27,2	1381
ERU-Ezue2	İzolat 2	<i>E. zuernii</i>	Nevşehir	27,7	19,9	25,1	27,4	1381
ERU-Ezue3	İzolat 3	<i>E. zuernii</i>	Kırşehir	27,0	20,0	25,9	27,0	1028
ERU-Ezue4	İzolat 4	<i>E. zuernii</i>	Yozgat	27,6	19,8	25,3	27,2	1381
ERU-Ebov1	İzolat 5	<i>E. bovis</i>	Kayseri	26,5	20,1	26,1	27,3	987
ERU-Ebov2	İzolat 6	<i>E. bovis</i>	Kayseri	26,5	20,5	26,3	26,7	1055
ERU-Ebov3	İzolat 7	<i>E. bovis</i>	Kırşehir	26,7	20,3	26,4	26,6	1055
ERU-Ebov4	İzolat 8	<i>E. bovis</i>	Kırşehir	27,4	20,1	25,1	27,4	1381
ERU-Ebov5	İzolat 9	<i>E. bovis</i>	Nevşehir	26,8	20,2	26,3	26,8	1061
ERU-Ebov6	İzolat 10	<i>E. bovis</i>	Nevşehir	27,4	20,1	25,4	27,1	1381
ERU-Ebov7	İzolat 11	<i>E. bovis</i>	Yozgat	27,4	20,1	25,5	27,0	1381
ERU-Ebov8	İzolat 12	<i>E. bovis</i>	Yozgat	27,3	20,1	25,6	27,0	1381
ERU-Eaub1	İzolat 13	<i>E. auburnensis</i>	Kayseri	27,0	20,0	26,1	26,9	1055
ERU-Eaub2	İzolat 14	<i>E. auburnensis</i>	Nevşehir	26,9	20,1	26,2	26,8	1055
ERU-Eaub3	İzolat 15	<i>E. auburnensis</i>	Kırşehir	26,9	20,1	26,3	26,7	1055
ERU-Eaub4	İzolat 16	<i>E. auburnensis</i>	Kayseri	27,0	20,0	26,1	26,9	1055
ERU-Eaub5	İzolat 17	<i>E. auburnensis</i>	Yozgat	26,9	20,1	26,3	26,7	1055
ERU-Eala1	İzolat 17	<i>E. alabamensis</i>	Kayseri	26,5	20,1	26,3	27,2	967
ERU-Eala2	İzolat 18	<i>E. alabamensis</i>	Nevşehir	26,7	20,3	26,0	27,0	1057
ERU-Eala3	İzolat 19	<i>E. alabamensis</i>	Kırşehir	26,9	20,2	26,0	27,0	1057

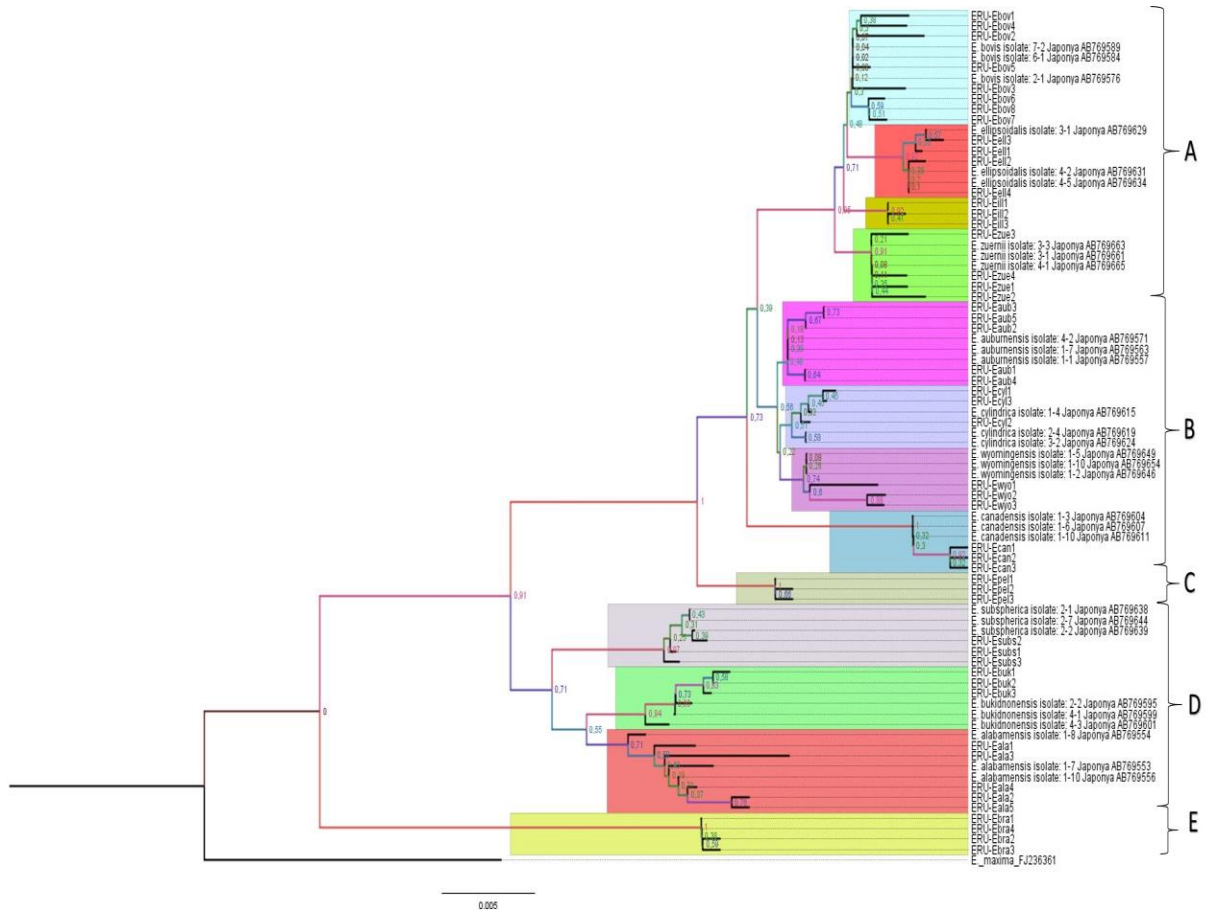
ERU-Eala4	İzolat 20	<i>E. alabamensis</i>	Kayseri	27,0	20,2	26,0	26,8	1057
ERU-Eala5	İzolat 21	<i>E. alabamensis</i>	Yozgat	26,8	20,2	26,1	26,9	1057
ERU-Eell1	İzolat 22	<i>E. ellipsoidalis</i>	Kayseri	26,9	20,2	26,2	26,7	1054
ERU-Eell2	İzolat 23	<i>E. ellipsoidalis</i>	Nevşehir	26,9	20,1	26,4	26,6	1054
ERU-Eell3	İzolat 24	<i>E. ellipsoidalis</i>	Kırşehir	26,9	20,1	26,4	26,7	1054
ERU-Eell4	İzolat 25	<i>E. ellipsoidalis</i>	Yozgat	27,0	20,1	26,3	26,6	1054
ERU-Ewyo1	İzolat 9	<i>E. wyomingensis</i>	Kırşehir	27,6	19,8	25,3	27,3	1379
ERU-Ewyo2	İzolat 26	<i>E. wyomingensis</i>	Kayseri	27,8	19,5	25,1	27,6	1381
ERU-Ewyo3	İzolat 27	<i>E. wyomingensis</i>	Yozgat	27,7	19,6	25,2	27,5	1381
ERU-Ebra1	İzolat 12	<i>E. brasiliensis</i>	Kayseri	27,0	18,9	27,0	27,1	1061
ERU-Ebra2	İzolat 28	<i>E. brasiliensis</i>	Kayseri	27,0	18,9	27,0	27,1	1061
ERU-Ebra3	İzolat 29	<i>E. brasiliensis</i>	Kırşehir	26,9	18,9	27,0	27,2	1061
ERU-Ebra4	İzolat 30	<i>E. brasiliensis</i>	Nevşehir	27,0	18,9	27,0	27,1	1061
ERU-Esubs1	İzolat 11	<i>E. subspherica</i>	Kayseri	27,6	19,8	26,2	26,5	1063
ERU-Esubs2	İzolat 31	<i>E. subspherica</i>	Kırşehir	27,6	19,8	26,2	26,4	1063
ERU-Esubs3	İzolat 32	<i>E. subspherica</i>	Nevşehir	27,6	19,8	26,2	26,4	1063
ERU-Ebuk1	İzolat 12	<i>E. bukidnonensis</i>	Kayseri	27,4	19,8	26,1	26,7	1061
ERU-Ebuk2	İzolat 33	<i>E. bukidnonensis</i>	Kırşehir	27,3	19,8	26,1	26,8	1061
ERU-Ebuk3	İzolat 34	<i>E. bukidnonensis</i>	Yozgat	27,3	19,9	26,1	26,7	1061
ERU-Eill1	İzolat 26	<i>E. illinoisensis</i>	Kayseri	26,9	20,2	26,2	26,8	1046
ERU-Eill2	İzolat 35	<i>E. illinoisensis</i>	Nevşehir	27,0	20,1	26,2	26,8	1046
ERU-Eill3	İzolat 36	<i>E. illinoisensis</i>	Yozgat	26,9	20,2	26,2	26,8	1046
ERU-Epel1	İzolat 11	<i>E. pellita</i>	Kayseri	27,6	20,0	25,1	27,3	1382
ERU-Epel2	İzolat 37	<i>E. pellita</i>	Nevşehir	27,6	20,1	25,1	27,2	1382
ERU-Epel3	İzolat 38	<i>E. pellita</i>	Yozgat	27,6	20,0	25,1	27,3	1382
ERU-Ecan1	İzolat 10	<i>E. canadensis</i>	Kayseri	27,0	19,8	26,4	26,7	1055
ERU-Ecan2	İzolat 39	<i>E. canadensis</i>	Nevşehir	26,9	19,7	26,5	26,8	1055
ERU-Ecan3	İzolat 40	<i>E. canadensis</i>	Kırşehir	26,9	19,9	26,5	26,6	1055
ERU-Ecyl1	İzolat 9	<i>E. cylindrica</i>	Kayseri	27,1	19,9	26,2	26,8	1055
ERU-Ecyl2	İzolat 41	<i>E. cylindrica</i>	Nevşehir	27,1	20,0	26,0	26,9	1055
ERU-Ecyl3	İzolat 42	<i>E. cylindrica</i>	Kırşehir	27,1	19,9	26,1	26,9	1055

4.7 18S rRNA Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları

Araştırma yöresinde sığırlarda belirlenen ve 18S rRNA gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Eimeria* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.51’de gösterilmiştir. Şekil 4.51’de görüldüğü üzere araştırma sahasından izole edilen izolatlar arasında interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. İncelenen *Eimeria* izolatları arasında ortalama genetik heterojenite $2,2 \pm 0,3$ saptanmıştır. İnterspesifik nükleotid varyasyonlarının yoğun olarak 20-160. ve 500-610. nükleotidler arasında yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4.51). Araştırma yöresinde karakterize edilen izolatların birbirleri ve GenBank’ta mevcut ve sığırlardan yalnızca Japonya’dan kaydedilmiş olan homolog bazı *Eimeria* izolatlarıyla hizalama analizleri sonucu oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.52’de

verilmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere karakterize edilen izolatlar, tür bazlı olarak Japonya izolatlarıyla birlikte kısmen yüksek bootstrap desteğiyle kümeler oluşturmuşlardır. 18S rRNA filogenisine göre *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. illinoisensis* ve *E. zuernii* clusterları birbirine daha yakın belirlenmiş ve filogenetik bir grup içerisinde yer almışlardır (Grup A). *E. auburnensis*, *E. cylindrica*, *E. wyomingensis* ve *E. canadensis* clusterları ilgili gen bölgesine göre birbirine daha yakın belirlenmiş ve Grup A'ya yakın diğer bir filogenetik grup (Grup B) oluşturmuşlardır. *E. pellita* clusterı bu iki filogenetik gruba yakın ayrı bir grup oluşturmuştur (Grup C). Diğer bir majör filogenetik grubu (Grup D) *E. subspherica*, *E. bukidnonensis* ve *E. alabamensis* clusterları oluşturmuş olup diğer gruplardan genetik olarak daha uzak bulunmuştur. *E. brasiliensis* clusterı ise diğer tüm gruplardan daha uzak olan ayrı bir filogenetik grup (Grup E) oluşturmuştur. Araştırma yöresinde belirlenen *E. bovis* ERU-Ebov1-8 izolatları $\%0,4 \pm 0,1$ genetik farklılık gösterirken Japonya *E. bovis* izolatlarıyla ortalama $\%0,2 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. zuernii* ERU-Ezue1-4 izolatları kendi aralarında ortalama $\%0,4 \pm 0,1$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,2 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. auburnensis* ERU-Eaub1-5 izolatları kendi aralarında $\%0,2 \pm 0,1$, Japonya izolatlarıyla $\%0,2 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. alabamensis* ERU-Eala1-5 izolatları kendi aralarında ortalama $\%0,6 \pm 0,2$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,5 \pm 0,1$ farklı bulunmuştur. *E. ellipsoidalis* ERU-Eell1-4 izolatları kendi aralarında $\%0,2 \pm 0,1$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,1 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. wyomingensis* ERU-Ewyo1-3 izolatları kendi aralarında $\%0,6 \pm 0,2$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,3 \pm 0,1$ farklı bulunmuştur. *E. subspherica* ERU-Esubs1-3 izolatları kendi aralarında ve Japonya izolatlarıyla ortalama $\%0,2 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. bukidnonensis* ERU-Ebuk1-3 izolatları kendi aralarında $\%0,1 \pm 0,1$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,4 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. canadensis* ERU-Ecan1-3 izolatları birbirleriyle $\%0,2 \pm 0,1$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,3 \pm 0,1$ farklı bulunmuştur. *E. cylindrica* ERU-Ecyl1-3 izolatları birbirleriyle $\%0,1 \pm 0,1$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $\%0,2 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. Çalışmamızda *E. brasiliensis*, *E. illinoisensis* ve *E. pellita* türlerine ait izolatların Dünyada ilk kez 18S rRNA karakterizasyonları yapılmış olup genetik heterojenite her üç türe ait izolatlar için de $\%0,1 \pm 0,1$ saptanmıştır.

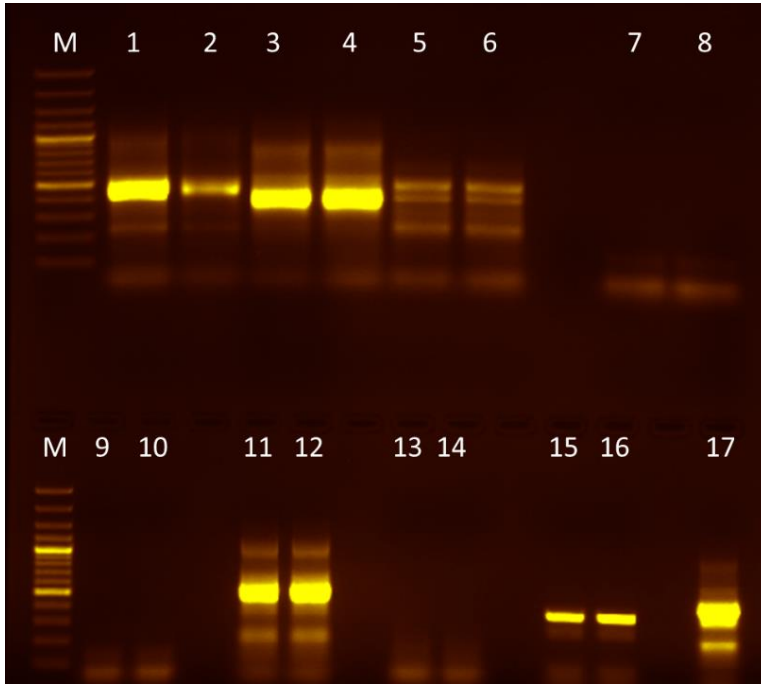
96



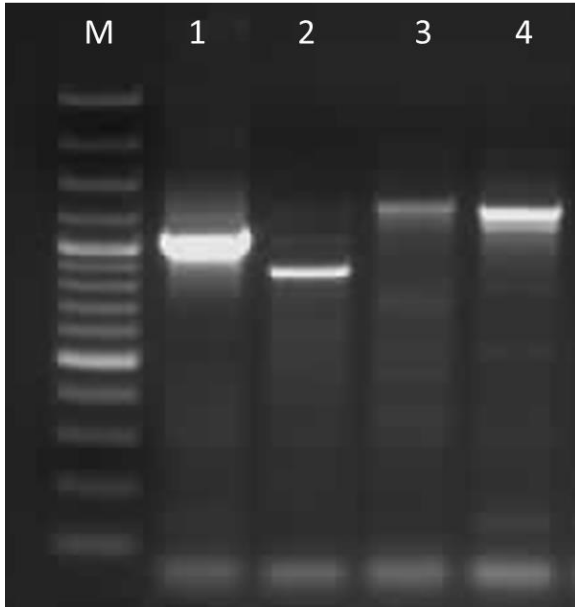
Şekil 4.52 *Eimeria* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Maximum Likelihood – Kimura Two Parameter modeli, Bootstrap: 1000). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Dış grup olarak *E. maxima* (FJ236361) kullanılmıştır.

4.8 ITS-1 Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

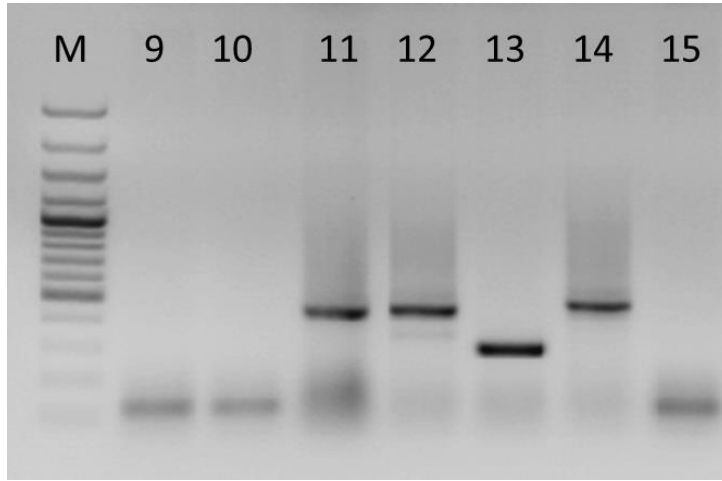
18S rRNA gen bölgesi yönünden analiz edilen örnekler ait genomik DNA izolatlarının ITS-1 ile 18S rRNA gen bölgesinden başlayıp 28S rRNA gen bölgesine kadar uzanan ve ITS-1, 5.8S rRNA ve ITS-2 gen bölgelerini complete olarak amplifiye eden primerlerle Nested PCR analizleri sonucu hedef büyüklüklerde (ITS-1: ~318-476; 18S-ITS-1-5.8S-ITS-2-28S: ~1003-1342 bp) ampikonlar saptanmıştır (Şekil 4.53-4.54). Elde edilen bu ampikonların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu belirlenmiş (Şekil 4.55) ve sonrasında kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Miks enfekte örnekler için 18S rRNA gen bölgesinde olduğu gibi klonlama sonrası agar üzerinde belirlenen kolonilerden farklı *Eimeria* türlerine ait insertlerin yakalanabileceği göz önüne alınarak her izolat için en az üç ayrı koloni seçilmiş ve plazmid pürifikasyonları yapılmıştır.



Şekil 4.53 Bazı *Eimeria* pozitif örneklere ait izolatların 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 2,4-6,11,12,15-17: Pozitif örnekler; 7-10,13,14:Negatif örnekler, 1: *E. zuernii* pozitif kontrol (Japonya); 3: *E. bovis* pozitif kontrol (Japonya)



Şekil 4.54 Bazı *Eimeria* pozitif örneklere ait izolatların 18S rRNA-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-4: Pozitif örnekler



Şekil 4.55 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle ITS-1 gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları.

Elde edilen toplam 48 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekans analizi sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür konfirmasyonları sağlanmış olup (Tablo 4.49) ilgili izolatlar tür bazlı olarak KU351709-21 aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

Tablo 4.49 ITS-1 sekansları sağlanan *Eimeria* izolatlarının tür, izolasyon bölgesi ve nükleotid kompozisyonları

İzolat (Plazmid)	Ait olduğu genomik DNA izolatı	Tür	İzolasyon bölgesi	Nükleotid kompozisyonu (%)				
				T	C	A	G	Toplam baz sayısı
ERU-Ezue1	İzolat 1	<i>E. zuernii</i>	Kayseri	38,0	19,4	24,9	17,7	474
ERU-Ezue2	İzolat 2	<i>E. zuernii</i>	Nevşehir	38,0	19,4	24,9	17,7	474
ERU-Ezue3	İzolat 3	<i>E. zuernii</i>	Kırşehir	38,0	19,4	25,1	17,5	474
ERU-Ezue4	İzolat 4	<i>E. zuernii</i>	Yozgat	38,2	19,2	24,9	17,7	474
ERU-Ebov1	İzolat 5	<i>E. bovis</i>	Kayseri	38,1	18,3	28,2	15,4	454
ERU-Ebov2	İzolat 6	<i>E. bovis</i>	Kayseri	38,1	18,4	27,5	16,0	451
ERU-Ebov3	İzolat 7	<i>E. bovis</i>	Kırşehir	37,9	18,5	27,8	15,8	449
ERU-Ebov4	İzolat 8	<i>E. bovis</i>	Kırşehir	38,1	18,3	28,2	15,4	454
ERU-Ebov5	İzolat 9	<i>E. bovis</i>	Nevşehir	38,1	18,3	28,2	15,4	454
ERU-Ebov6	İzolat 10	<i>E. bovis</i>	Nevşehir	38,1	18,4	27,5	16,0	451
ERU-Ebov7	İzolat 11	<i>E. bovis</i>	Yozgat	38,1	18,4	27,5	16,0	451
ERU-Ebov8	İzolat 12	<i>E. bovis</i>	Yozgat	37,9	18,5	27,8	15,8	449
ERU-Eaub1	İzolat 13	<i>E. auburnensis</i>	Kayseri	40,5	13,9	30,0	15,6	474
ERU-Eaub2	İzolat 14	<i>E. auburnensis</i>	Nevşehir	40,5	13,9	30,0	15,6	474
ERU-Eaub3	İzolat 15	<i>E. auburnensis</i>	Kırşehir	40,5	13,9	30,0	15,6	474
ERU-Eaub4	İzolat 16	<i>E. auburnensis</i>	Kayseri	40,2	14,3	29,9	15,6	475
ERU-Eaub5	İzolat 17	<i>E. auburnensis</i>	Yozgat	40,2	14,3	29,9	15,6	475

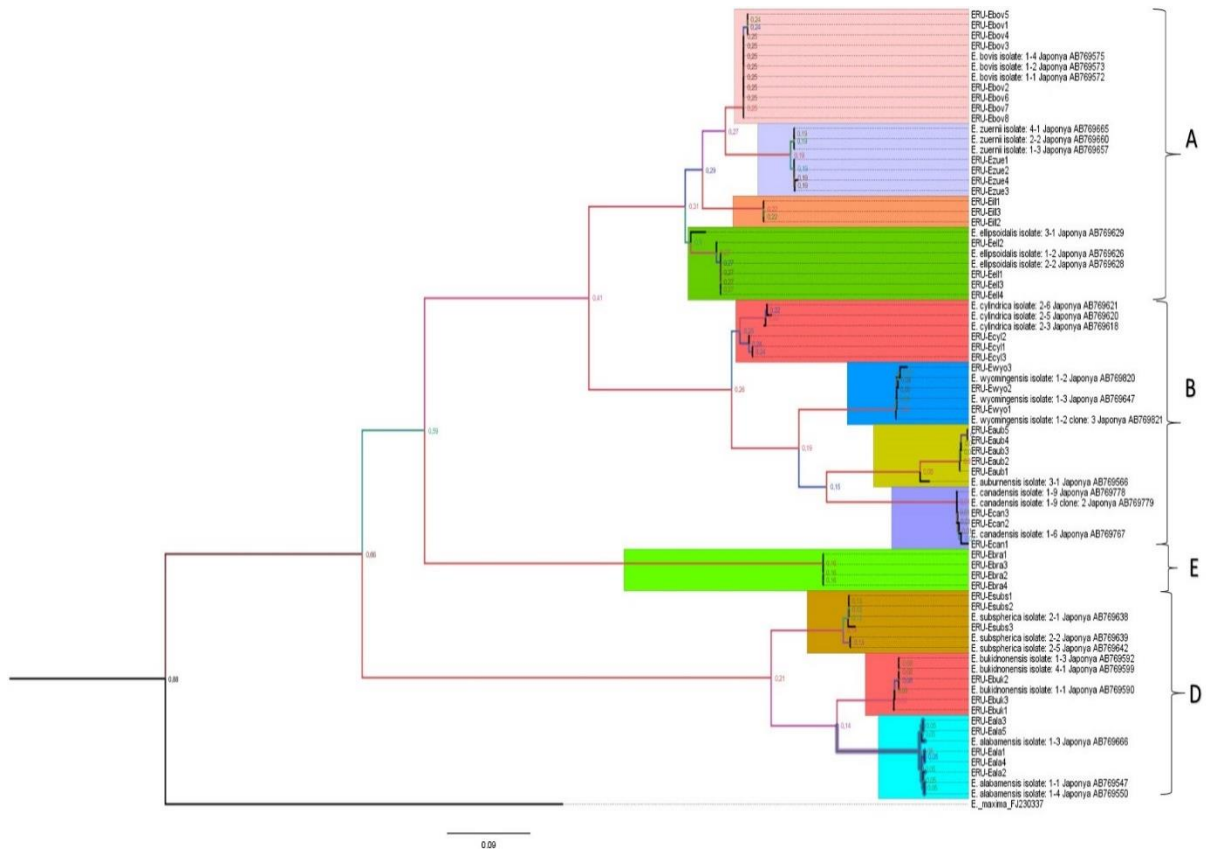
ERU-Eala1	İzolat 17	<i>E. alabamensis</i>	Kayseri	32,0	19,2	28,4	20,4	328
ERU-Eala2	İzolat 18	<i>E. alabamensis</i>	Nevşehir	32,3	18,9	28,0	20,7	328
ERU-Eala3	İzolat 19	<i>E. alabamensis</i>	Kırşehir	32,9	18,7	29,1	19,3	337
ERU-Eala4	İzolat 20	<i>E. alabamensis</i>	Kayseri	32,0	19,2	28,4	20,4	328
ERU-Eala5	İzolat 21	<i>E. alabamensis</i>	Yozgat	32,9	18,7	29,1	19,3	337
ERU-Eell1	İzolat 22	<i>E. ellipsoidalis</i>	Kayseri	38,5	17,2	27,8	16,5	442
ERU-Eell2	İzolat 23	<i>E. ellipsoidalis</i>	Nevşehir	38,2	17,4	27,8	16,5	442
ERU-Eell3	İzolat 24	<i>E. ellipsoidalis</i>	Kırşehir	38,5	17,0	27,8	16,7	442
ERU-Eell4	İzolat 25	<i>E. ellipsoidalis</i>	Yozgat	38,7	17,2	27,6	16,5	442
ERU-Ewyo1	İzolat 9	<i>E. wyomingensis</i>	Kırşehir	39,4	16,1	27,7	16,8	465
ERU-Ewyo2	İzolat 26	<i>E. wyomingensis</i>	Kayseri	39,6	15,9	27,7	16,8	465
ERU-Ewyo3	İzolat 27	<i>E. wyomingensis</i>	Yozgat	39,1	16,3	27,7	16,8	465
ERU-Ebra1	İzolat 12	<i>E. brasiliensis</i>	Kayseri	31,9	18,4	27,3	22,4	370
ERU-Ebra2	İzolat 28	<i>E. brasiliensis</i>	Kayseri	32,2	18,1	27,6	22,2	370
ERU-Ebra3	İzolat 29	<i>E. brasiliensis</i>	Kırşehir	31,9	18,4	27,3	22,4	370
ERU-Ebra4	İzolat 30	<i>E. brasiliensis</i>	Nevşehir	32,2	18,1	27,6	22,2	370
ERU-Esubs1	İzolat 11	<i>E. subspherica</i>	Kayseri	33,1	19,1	30,0	17,8	320
ERU-Esubs2	İzolat 31	<i>E. subspherica</i>	Kırşehir	33,1	19,1	30,0	17,8	320
ERU-Esubs3	İzolat 32	<i>E. subspherica</i>	Nevşehir	32,8	19,1	30,3	17,8	320
ERU-Ebuk1	İzolat 12	<i>E. bukidnonensis</i>	Kayseri	34,6	19,1	29,3	17,0	393
ERU-Ebuk2	İzolat 33	<i>E. bukidnonensis</i>	Kırşehir	34,6	19,3	29,3	16,8	393
ERU-Ebuk3	İzolat 34	<i>E. bukidnonensis</i>	Yozgat	34,9	19,1	29,0	17,0	393
ERU-Eill1	İzolat 26	<i>E. illinoisensis</i>	Kayseri	37,0	17,9	26,9	18,2	446
ERU-Eill2	İzolat 35	<i>E. illinoisensis</i>	Nevşehir	37,0	17,9	26,9	18,2	446
ERU-Eill3	İzolat 36	<i>E. illinoisensis</i>	Yozgat	37,0	18,2	26,9	17,9	446
ERU-Ecan1	İzolat 10	<i>E. canadensis</i>	Kayseri	39,3	15,1	28,1	17,6	438
ERU-Ecan2	İzolat 39	<i>E. canadensis</i>	Nevşehir	39,7	14,6	27,9	17,8	438
ERU-Ecan3	İzolat 40	<i>E. canadensis</i>	Kırşehir	39,3	15,1	27,9	17,8	438
ERU-Ecyl1	İzolat 9	<i>E. cylindrica</i>	Kayseri	38,8	16,2	28,3	16,6	487
ERU-Ecyl2	İzolat 41	<i>E. cylindrica</i>	Nevşehir	38,8	16,2	28,5	16,4	487
ERU-Ecyl3	İzolat 42	<i>E. cylindrica</i>	Kırşehir	38,6	16,2	28,5	16,6	487

4.9 ITS-1 Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları

ITS-1 gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Eimeria* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.56'da gösterilmiştir. Şekil 4.56'da görüldüğü üzere araştırma sahasından izole edilen izolatlar arasında yüksek düzeyde interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. İncelenen *Eimeria* izolatları arasında ortalama genetik heterojenite %61,5±7,5 saptanmıştır. Araştırma yöresinde karakterize edilen izolatların birbirleri ve GenBank'ta mevcut ve sığırlardan yalnızca Japonya'dan kaydedilmiş olan homolog bazı *Eimeria* izolatlarıyla hizalama analizleri sonucu oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.57'de gösterilmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere karakterize edilen izolatlar, tür bazlı olarak Japonya izolatlarıyla birlikte kümeler oluşturmalarına karşın bootstrap

değerleri düşük bulunmuştur. ITS-1 filogenisine göre izolatların tür bazlı olarak oluşturdukları clusterlar 18S rRNA gen bölgesinde olduğu gibi filogenetik gruplanma göstermiştir (Şekil 4.57). Ancak 18S rRNA filogenisinde Grup C’de yer alan *E. pellita* clusterı bu türe ait genomik DNA izolatlarının ITS-1 primerleriyle etkin amplifikasyon göstermemesi neticesinde bu gen bölgesi yönünden filogenetik analizleri yapılamamıştır. Araştırma yöresinde belirlenen *E. bovis* ERU-Ebov1-8 izolatları $0,2 \pm 0,2$ genetik farklılık gösterirken Japonya *E. bovis* izolatlarıyla ortalama $0,6 \pm 0,3$ farklılık göstermiştir. *E. zuernii* ERU-Ezue1-4 izolatları kendi aralarında ortalama $0,2 \pm 0,2$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $0,4 \pm 0,3$ farklılık göstermiştir. *E. auburnensis* ERU-Eaub1-5 izolatları kendi aralarında $0,2 \pm 0,2$, Japonya izolatlarıyla $0,6 \pm 0,1$ farklılık göstermiştir. *E. alabamensis* ERU-Eala1-5 izolatları kendi aralarında ortalama $0,9 \pm 0,5$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $0,6 \pm 0,3$ farklı bulunmuştur. *E. ellipsoidalıs* ERU-Eell1-4 izolatları kendi aralarında $0,2 \pm 0,2$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $2,7 \pm 0,5$ farklılık göstermiştir. *E. wyomingensis* ERU-Ewyo1-3 izolatları kendi aralarında $0,3 \pm 0,3$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $0,3 \pm 0,2$ farklı bulunmuştur. *E. subspherica* ERU-Esubs1-3 izolatları kendi aralarında $0,6 \pm 0,4$ ve Japonya izolatlarıyla $1,0 \pm 0,4$ ortalama farklılık göstermiştir. *E. bukidnonensis* ERU-Ebuk1-3 izolatları birbirleriyle %100 identik, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $0,3 \pm 0,2$ farklılık göstermiştir. *E. canadensis* ERU-Ecan1-3 izolatları birbirleriyle $0,6 \pm 0,4$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $0,3 \pm 0,2$ farklı bulunmuştur. *E. cylindrica* ERU-Ecyl1-3 izolatları birbirleriyle $0,3 \pm 0,3$, Japonya izolatlarıyla ise ortalama $9,7 \pm 1,6$ farklılık göstermiştir. Çalışmamızda *E. brasiliensis* ve *E. illinoisensis* türlerine ait izolatların Dünyada ilk kez ITS-1 karakterizasyonları yapılmış olup her iki türe ait izolatların tür bazlı olarak %100 identiklik gösterdikleri saptanmıştır.

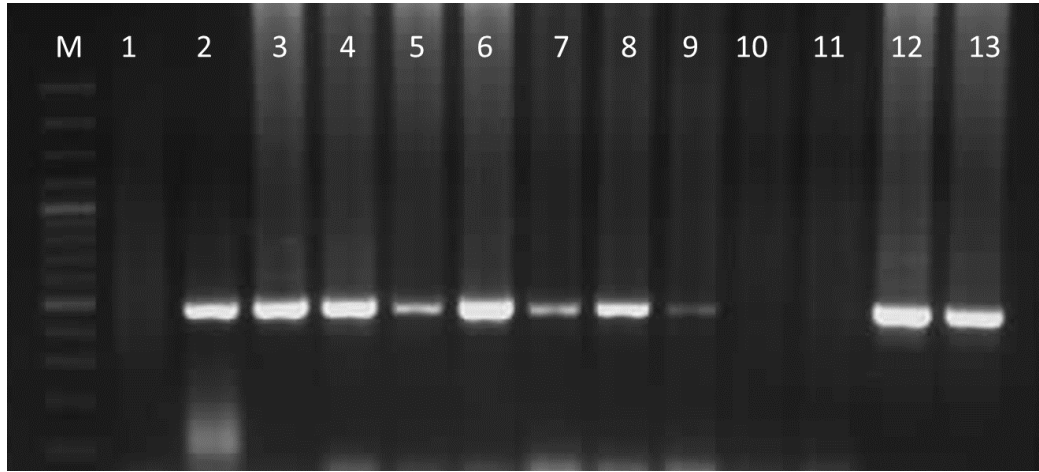




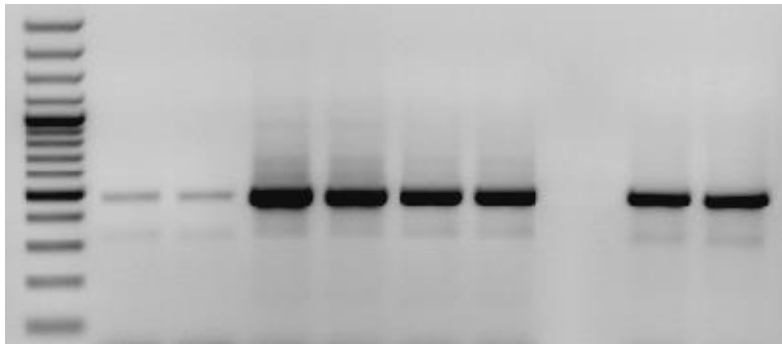
Şekil 4.57 *Eimeria* izolatlarının ITS-1 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Maximum Likelihood – Kimura Two Parameter modeli, Bootstrap: 1000). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Dış grup olarak *E. maxima* (FJ230337) kullanılmıştır.

4.10 Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

18S rRNA ve ITS-1 gen bölgeleri yönünden analiz edilen örnekler ait genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesini parsiyel olarak amplifiye eden primerlerle Nested PCR analizleri sonucu hedef büyüklükte (484 bp) ampliconlar saptanmıştır (Şekil 4.58). Elde edilen bu ampliconların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu belirlenmiş (Şekil 4.59) ve sonrasında kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Miks enfekte örnekler için diğer gen bölgelerinde olduğu gibi klonlama sonrası agar üzerinde belirlenen kolonilerden farklı *Eimeria* türlerine ait insertlerin yakalanabileceği göz önüne alınarak her izolat için en az üç ayrı koloni seçilmiş ve plazmid pürifikasyonları yapılmıştır.



Şekil 4.58 Bazı *Eimeria* pozitif örneklerle ait izolatların mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü
M: Marker (100bp); 2-9: Pozitif örnekler; 1,10-11: Negatif örnekler; 12: *E. zuernii* pozitif kontrol (Japonya); 13: *E. bovis* pozitif kontrol (Japonya)



Şekil 4.59 Gen spesifik primerlerle koloni PCR sonucu mt-COI gen bölgesi amplifikasyonu

Elde edilen toplam 48 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekans analizi sonucu nükleotid kompozisyonları ve hizalama analizleriyle tür konfirmasyonları sağlanmış olup (Tablo 4.50) ilgili izolatlar tür bazlı olarak KU351722-40 aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

Tablo 4.50 Mt-COI sekansları sağlanan *Eimeria* izolatlarının tür, izolasyon bölgesi ve nükleotid kompozisyonları

İzolat (Plazmid)	Ait olduğu genomik DNA izolatı	Tür	İzolasyon bölgesi	Nükleotid kompozisyonu (%)				
				T	C	A	G	Toplam baz sayısı
ERU-Ezue1	İzolat 1	<i>E. zuernii</i>	Kayseri	36,4	20,1	25,1	18,4	467
ERU-Ezue2	İzolat 2	<i>E. zuernii</i>	Nevşehir	36,4	20,1	25,3	18,2	467

ERU-Ezue3	İzolat 3	<i>E. zuernii</i>	Kırşehir	36,6	20,1	24,8	18,4	467
ERU-Ezue4	İzolat 4	<i>E. zuernii</i>	Yozgat	36,2	20,1	25,5	18,2	467
ERU-Ebov1	İzolat 5	<i>E. bovis</i>	Kayseri	37,0	19,4	25,6	18,0	484
ERU-Ebov2	İzolat 6	<i>E. bovis</i>	Kayseri	37,0	19,4	25,6	18,0	484
ERU-Ebov3	İzolat 7	<i>E. bovis</i>	Kırşehir	37,2	19,4	25,4	18,0	484
ERU-Ebov4	İzolat 8	<i>E. bovis</i>	Kırşehir	37,0	19,4	25,6	18,0	484
ERU-Ebov5	İzolat 9	<i>E. bovis</i>	Nevşehir	37,2	19,4	25,4	18,0	484
ERU-Ebov6	İzolat 10	<i>E. bovis</i>	Nevşehir	37,0	19,4	25,6	18,0	484
ERU-Ebov7	İzolat 11	<i>E. bovis</i>	Yozgat	37,2	19,4	25,4	18,0	484
ERU-Ebov8	İzolat 12	<i>E. bovis</i>	Yozgat	37,0	19,4	25,6	18,0	484
ERU-Eaub1	İzolat 13	<i>E. auburnensis</i>	Kayseri	37,8	19,2	24,8	18,2	484
ERU-Eaub2	İzolat 14	<i>E. auburnensis</i>	Nevşehir	38,2	19,2	24,4	18,2	484
ERU-Eaub3	İzolat 15	<i>E. auburnensis</i>	Kırşehir	38,0	19,2	24,6	18,2	484
ERU-Eaub4	İzolat 16	<i>E. auburnensis</i>	Kayseri	37,8	19,2	24,8	18,2	484
ERU-Eaub5	İzolat 17	<i>E. auburnensis</i>	Yozgat	38,2	19,2	24,4	18,2	484
ERU-Eala1	İzolat 17	<i>E. alabamensis</i>	Kayseri	37,4	20,9	24,8	16,9	484
ERU-Eala2	İzolat 18	<i>E. alabamensis</i>	Nevşehir	37,4	20,7	25,0	16,9	484
ERU-Eala3	İzolat 19	<i>E. alabamensis</i>	Kırşehir	38,0	20,2	24,8	16,9	484
ERU-Eala4	İzolat 20	<i>E. alabamensis</i>	Kayseri	37,4	20,9	24,8	16,9	484
ERU-Eala5	İzolat 21	<i>E. alabamensis</i>	Yozgat	37,8	20,2	24,8	17,1	484
ERU-Eell1	İzolat 22	<i>E. ellipsoidalis</i>	Kayseri	36,0	20,9	25,1	18,0	483
ERU-Eell2	İzolat 23	<i>E. ellipsoidalis</i>	Nevşehir	36,2	21,1	24,8	18,0	484
ERU-Eell3	İzolat 24	<i>E. ellipsoidalis</i>	Kırşehir	36,0	21,1	25,0	18,0	484
ERU-Eell4	İzolat 25	<i>E. ellipsoidalis</i>	Yozgat	36,4	21,1	24,6	18,0	484
ERU-Ewyo1	İzolat 9	<i>E. wyomingensis</i>	Kırşehir	37,0	20,0	25,0	18,0	484
ERU-Ewyo2	İzolat 26	<i>E. wyomingensis</i>	Kayseri	37,2	20,0	24,8	18,0	484
ERU-Ewyo3	İzolat 27	<i>E. wyomingensis</i>	Yozgat	37,2	20,0	24,8	18,0	484
ERU-Ebra1	İzolat 12	<i>E. brasiliensis</i>	Kayseri	40,9	16,9	25,8	16,3	484
ERU-Ebra2	İzolat 28	<i>E. brasiliensis</i>	Kayseri	40,7	17,1	25,6	16,5	484
ERU-Ebra3	İzolat 29	<i>E. brasiliensis</i>	Kırşehir	40,9	16,9	25,8	16,3	484
ERU-Ebra4	İzolat 30	<i>E. brasiliensis</i>	Nevşehir	40,7	17,1	25,6	16,5	484
ERU-Esubs1	İzolat 11	<i>E. subspherica</i>	Kayseri	38,8	18,4	26,7	16,1	484
ERU-Esubs2	İzolat 31	<i>E. subspherica</i>	Kırşehir	39,3	18,4	26,2	16,1	484
ERU-Esubs3	İzolat 32	<i>E. subspherica</i>	Nevşehir	39,3	18,4	26,2	16,1	484
ERU-Ebuk1	İzolat 12	<i>E. bukidnonensis</i>	Kayseri	38,4	20,5	24,4	16,7	484
ERU-Ebuk2	İzolat 33	<i>E. bukidnonensis</i>	Kırşehir	38,6	20,5	24,2	16,7	484
ERU-Ebuk3	İzolat 34	<i>E. bukidnonensis</i>	Yozgat	38,6	20,5	24,2	16,7	484
ERU-Eill1	İzolat 26	<i>E. illinoisensis</i>	Kayseri	36,6	20,0	25,2	18,2	484
ERU-Eill2	İzolat 35	<i>E. illinoisensis</i>	Nevşehir	36,8	20,0	25,0	18,2	484
ERU-Eill3	İzolat 36	<i>E. illinoisensis</i>	Yozgat	37,0	20,0	24,8	18,2	484
ERU-Ecan1	İzolat 10	<i>E. canadensis</i>	Kayseri	38,0	19,4	24,8	17,8	484
ERU-Ecan2	İzolat 39	<i>E. canadensis</i>	Nevşehir	38,2	19,4	24,6	17,8	484
ERU-Ecan3	İzolat 40	<i>E. canadensis</i>	Kırşehir	38,2	19,4	24,6	17,8	484
ERU-Ecyl1	İzolat 9	<i>E. cylindrica</i>	Kayseri	37,2	19,6	25,2	18,0	484
ERU-Ecyl2	İzolat 41	<i>E. cylindrica</i>	Nevşehir	37,2	19,6	25,2	18,0	484
ERU-Ecyl3	İzolat 42	<i>E. cylindrica</i>	Kırşehir	37,4	19,6	25,0	18,0	484

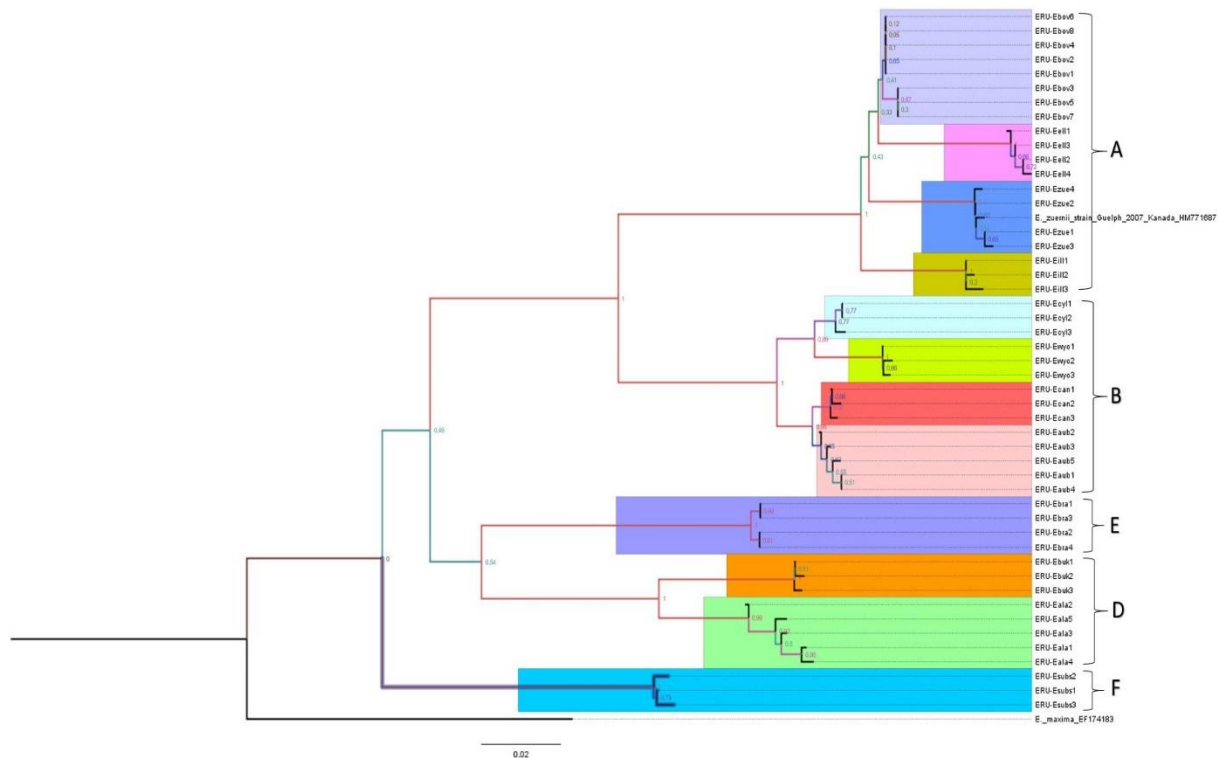
4.11 Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları

Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Eimeria* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.60'da gösterilmiştir. Araştırma sahasından izole edilen izolatlar arasında çeşitli interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. İncelenen *Eimeria* izolatları arasında ortalama genetik heterojenite $14,2 \pm 1,4$ saptanmıştır. Araştırma yöresinde karakterize edilen izolatlar ile GenBank'ta mevcut olan ve Kanada'da bir sığırdan izole edilmiş tek bir *E. zuernii* izolatının hizalama analizleri sonucu oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.61'de gösterilmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere karakterize edilen izolatlar, tür bazlı olarak kümelenme göstermiş ve filogenetik yapılanma yüksek bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Mt-COI filogenisine göre izolatların tür bazlı olarak oluşturdukları clusterlar diğer gen bölgelerinde olduğu gibi filogenetik gruplanma göstermiştir (Şekil 4.61). Ancak 18S rRNA filogenisinde Grup C'de yer alan *E. pellita* clusterı, bu türe ait genomik DNA izolatlarının ITS-1 gen bölgesinde olduğu gibi bu gen bölgesi için de amplifikasyon primerleriyle etkin reaksiyon göstermemesi neticesinde filogenetik analizleri yapılamamıştır. Bununla birlikte *E. subspherica* clusterının diğer gen bölgelerinden farklı olarak tüm gruplara daha uzak ayrı bir filogenetik grup oluşturduğu belirlenmiştir. İntraspesifik genetik farklılık *E. auburnensis* ERU-Eaub1-5, *E. ellipsoidalis* ERU-Eell1-4, *E. wyomingensis* ERU-Ewyo1-3, *E. bukidnonensis* ERU-Ebuk1-3, *E. canadensis* ERU-Ecan1-3, *E. cylindrica* ERU-Ecyl1-3 ve *E. brasiliensis* ERU-Ebra1-4 izolatları için $0,3 \pm 0,2$; *E. zuernii* ERU-Ezue1-4 ve *E. illinoisensis* ERU-Eill1-3 izolatları için $0,4 \pm 0,2$; *E. bovis* ERU-Ebov1-8 izolatları için $0,2 \pm 0,2$; *E. alabamensis* ERU-Eala1-5 izolatları için $1,0 \pm 0,3$ ve *E. subspherica* ERU-Esubs1-3 izolatları için $0,6 \pm 0,3$ saptanmıştır. *E. zuernii* ERU-Ezue1-4 izolatları ayrıca Kanada'dan bildirilmiş Guelph 2007 izolatıyla (HM771687) ortalama $0,4 \pm 0,2$ farklılık göstermiştir. Çalışmamızda Kanada'dan bildirilmiş *E. zuernii* Guelph 2007 izolatı (HM771687) dışında sığır *Eimeria* türlerine ait izolatların Dünyada ilk kez Mt-COI karakterizasyonları yapılmış ve mt-COI gen bölgesi yönünden moleküler taksonomiye yerleşimleri sağlanmıştır.

108

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 1. ERU-Eai1 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 2. ERU-Eai2 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 3. ERU-Eai3 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 4. ERU-Eai4 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 5. ERU-Eai5 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 6. ERU-Eai6 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 7. ERU-Eai7 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 8. ERU-Eai8 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 9. ERU-Eai9 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 10. ERU-Eai10 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 11. ERU-Eai11 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 12. ERU-Eai12 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 13. ERU-Eai13 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 14. ERU-Eai14 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 15. ERU-Eai15 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 16. ERU-Eai16 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 17. ERU-Eai17 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 18. ERU-Eai18 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 19. ERU-Eai19 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 20. ERU-Eai20 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 21. ERU-Eai21 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 22. ERU-Eai22 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 23. ERU-Eai23 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 24. ERU-Eai24 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 25. ERU-Eai25 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 26. ERU-Eai26 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 27. ERU-Eai27 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 28. ERU-Eai28 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 29. ERU-Eai29 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 30. ERU-Eai30 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 31. ERU-Eai31 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 32. ERU-Eai32 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 33. ERU-Eai33 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 34. ERU-Eai34 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 35. ERU-Eai35 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 36. ERU-Eai36 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 37. ERU-Eai37 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 38. ERU-Eai38 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 39. ERU-Eai39 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 40. ERU-Eai40 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 41. ERU-Eai41 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 42. ERU-Eai42 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 43. ERU-Eai43 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 44. ERU-Eai44 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 45. ERU-Eai45 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 46. ERU-Eai46 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 47. ERU-Eai47 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC
 48. ERU-Eai48 TTTCTCAAGCACTCTCTACTACTGCGAGGTAAGATGATTTGGAGGTCCTCTATGATCTAGCAATGGGCTGATTACGTAATAGGTCACATAGTTTGGGCACACCATATGATGAC

Şekil 4.60 *Eimeria* izolatlarına ait mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları



Şekil 4.61 *Eimeria* izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Maximum Likelihood – Kimura Two Parameter modeli, Bootstrap: 1000). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Dış grup olarak *E. maxima* (EF174183) kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Eimeria soyundaki coccidian parazitler dünya çapında sığırların gastro-intestinal parazitleri arasında önemli bir rol oynamaktadır (Lucas et al., 2014). Tek hücreli bu parazitler özellikle genç hayvanlarda problemlere yol açmaktadır. Ancak ergin bireylerde de enfeksiyona yol açabilen parazitler bu hayvanlarda da bazen patolojiye sebebiyet verebilirler (Daugeschies and Najdrowski, 2005). Eimeriosis için kanlı ishal tablosu tipik olarak bilinmekle birlikte sığır coccidiosis'inin sıklıkla sulu ishal tablosuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Jolley and Bardsley, 2006; Taylor and Catchpole, 1994). Bununla birlikte coccidiosis sıklıkla immun sistemin baskılanmasına yol açmakta olup bu durum da özellikle buzağuları diğer hastalıkla daha duyarlı hale getirmektedir (Faber et al., 2002). Sığır coccidiosis'i ayrıca sığır yetiştiriciliğinde oldukça yüksek ekonomik kayıplara yol açmakta olup Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalığa bağlı yıllık kayıpların 346 milyon ile 1.36 milyar dolar arasında değiştiği kaydedilmiştir (Fitzgerald, 1980). Sığırlarda bugüne kadar coccidiosis etkeni olarak biri *Isospora* soyunda olmak üzere 21 tür bildirilmiş olup bu türlerden 13'ünün Avrupa'daki sığırlarda görüldüğü kaydedilmiştir (Faber et al., 2002; Oda and Nishida, 1990). Bu türlerin çoğunun düşük patojeniteye sahip olduğu bilinmekte olup, bunlar arasında yalnızca *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii* türlerinin patojenik olduğu ve buzağılarda ağır klinik tabloya yol açtığı kaydedilmiştir (Daugeschies and Najdrowski, 2005). Patojen bu türler arasında özellikle *E. bovis* ve *E. zuernii* oldukça yüksek patojeniteye sahip olup buzağılarda genellikle şiddetli kanlı ishale sebep olmaktadır (Bangoura et al., 2007; Mundt et al., 2003).

Bu çalışmada İç Anadolu Yöresinin Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Yozgat illerindeki halk elinde yetiştiriciliği yapılan sığırlarda coccidiosis'e yol açan patojenik ve non-patojenik *Eimeria* türlerinin konvansiyonel morfolojik ve moleküler tabanlı teknikler ile araştırılması ve hastalıktan sorumlu türlerin moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Nitekim Türkiye'de sığır coccidiosis'i ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışmalar sınırlıdır. Aynı zamanda bu çalışmaların konvansiyonel parazitolojik teşhis yöntemleri ve morfolojik identifikasyona göre prevalans çalışmaları şeklinde olduğu görülmektedir. Sığır coccidiosis'i üzerine yapılan bu çalışmalarda enfeksiyon oranları Ankara ve çevresinde %16,0 (Mimioğlu et al., 1956); Ankara, Kayseri, Konya, Çorum, Yozgat, Amasya, Eskişehir, Samsun, Erzurum, Erzincan, Malatya, Adana, Bolu, Adapazarı ve Afyon'dan örneklenmiş sığırlarda %93,33

(Sayın, 1970); Elazığ'da %51,4 (Dumanlı et al., 1993), Kars'ta %90,8 (Arslan, 1997), Trakya bölgesinde %68,1 (Arslan and Tüzer, 1998); Bursa'da %49,3 (Güleğen and Okursoy, 2000), Van'da %22,53-%86,4 (Değer et al., 2001; Gül et al., 2000; Gül et al., 2008); Hakkari'de %89,13 (Göz and Aydın, 2005), Afyon'da %20,04 (Cicek et al., 2007), Erzurum'da %25,9 (Aktaş et al., 2008) ve Kırşehir'de %50,6 (Güven et al., 2010) olarak rapor edilmiştir. Ayrıca Arslan ve ark. (2012), Kars yöresinde *Eimeria* ookistlerinin yaygınlığını periparturient dönemdeki ineklerde %65,6, periparturient dönem dışındaki gebe ineklerde ise %60,0 olarak kaydetmişlerdir. Çalışmamızda İç Anadolu Yöresinde sığırlarda parazitolojik inceleme sonuçlarına göre sığır coccidiosis'inin yaygınlığı %47,2 olarak saptanmış olup bu oranın yukarıda Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden bildirilen yayılış sınırları içerisinde olduğu dikkati çekmiştir. Ayrıca illere göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı benzer oranlar göstermiştir (%40,0-53,7). Çalışmamızda ayrıca sığırların yaş grupları ve ırk karakterlerine göre *Eimeria* pozitifliğinde istatistiksel bir farklılık belirlenmezken, dişi sığırlarda ve kanlı ishalli ile ishalli dışkı gruplarında *Eimeria* pozitifliği istatistiksel anlamda daha yüksek belirlenmiştir. Benzer sonuçlar Heidari ve ark. (2014) tarafından da rapor edilmiştir. Buna karşın bazı araştırmacılar (Güven et al., 2010; Pilarczyk et al., 2002; Tomczuk et al., 2015) yaşa bağlı coccidiosis görülme oranında farklılıklar bildirmişler ve genelde 6-12 ay yaş grubu sığırlarda coccidiosis görülme oranını yüksek bulmuşlardır.

Çalışmamızda *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen 434 sığırdaki ortalama OPG değeri 464,8 (min:50,00, max:3833,00) belirlenmiş olup ookist düzeylerinin nadir olarak 4000 OPG'ye yaklaştığı görülmüştür. Danimarka ve Estonya'da sığırlarda doğal enfeksiyonlar üzerine yapılan diğer bazı çalışmalarda (Autzen et al., 2002; Lassen, 2009; Nielsen et al., 2003) da benzer sonuçlar bildirilirken Polonya, Almanya ve Güney Afrika'da sığırlar üzerinde yürütülmüş diğer bazı çalışmalarda ise (Klockiewicz et al., 2007; Matjila and Penzhorn, 2002; von Samson-Himmelstjerna et al., 2006) daha yüksek oranlar rapor edilmiştir. Çalışmamızda OPG değerlerinin sığırların yaşına bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiş olup <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları ile >12 ay yaş grubu arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuş, <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık ise önemsiz ($p>0,05$) belirlenmiştir. Bu sonuçlar Koutny ve ark. (2012)'nin bulgularıyla paralellik göstermiş olup özellikle buzağı ve genç sığırların gelişen hastalık için risk altında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Özellikle 4-12 ay yaş grubundaki sığırların yüksek düzeyde *Eimeria* ookistleri çıkarmasının, Taylor ve Catchpole (1994) tarafından da belirtildiği gibi gelişmemiş immun sistemden ziyade

muhtemelen immun sistemin baskılanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bunun yanında çalışmamızda sığırların dışkı karakterlerine göre ortalama OPG değeri en yüksek kanlı ishalli dışkılarda belirlenmiş bunu ishalli ve normal dışkı örnekleri izlemiştir. OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımında her üç kategori için de istatistiksel farklılık önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Bu sonuç da özellikle 3 aylığa kadar buzağılar başta olmak üzere bir yaşına kadar genç sığırlarda görülen ishal olgularında coccidiosis'in de önemli rol üstlendiğini göstermektedir. Benzer şekilde Koutny ve ark. (2012), şekilli dışkılar ile yarı sulu ve sulu dışkılarda *Eimeria* ookistlerinin istatistiksel anlamda daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Yine Bangoura ve ark. (2007), *E. zuernii* ile deneysel enfekte buzağılarda kantitatif düzeyde ookist çıkarımı ve dışkı karakteri arasında pozitif korelasyon saptamışlar ve enfeksiyon yükünün klinik semptomların ortaya çıkması üzerine belirgin etkisi olduğunu kaydetmişlerdir. Buna karşın bazı araştırmacılar (Daugochies and Najdrowski, 2005; Koutny et al., 2012) ise ookist çıkarım dozunun klinik coccidiosis'in ağır seyretmesiyle çok yakın ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Bunun yanında sığır coccidiosis'i üzerine birçok epidemiyolojik çalışmada (Cicek et al., 2007; Cornelissen et al., 1995; Matjila and Penzhorn, 2002) klinik olguların nadiren veya bildirilmemiş olduğu dikkati çekmektedir. Bu şekilde sığırlarda coccidiosis'in daha çok subklinik formda görüldüğü genel kabul görmektedir. Nitekim çalışmamızda da coccidiosis yönünden pozitif belirlenen 434 sığırdan yalnızca 18'i kanlı ishalli olmak üzere toplam 60 (%13,8) hayvanda ishal tablosunun belirlenmiş olması da bu genel kanaati destekler niteliktedir. Bunun yanında mevcut çalışmada ortalama sığırların cinsiyet ve ırkına bağlı olarak OPG değerlerinde istatistiksel bir önem olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Eimeria türlerinin prevalansı, coğrafik bölge (Niilo, 1970), iklim (Gräfner et al., 1985), hayvanların yaşı ve barınma durumları (Daugochies and Najdrowski, 2005) gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Sığırlarda coccidiosis'e yol açan türlerden şimdiye kadar 12'sinin morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre Türkiye'de görüldüğü kaydedilmiştir (Karaer et al., 2012). Bu türlerden *E. bovis* (%17,6-58,5), *E. zuernii* (%12,7-47,3), *E. auburnensis* (%4,5-64,7) ve *E. canadensis*'in (%4,1-64,7) en çok görülen türler, en az görülen türlerin ise *E. illinoisensis* (%1,6-4,8), *E. brasiliensis* (%0,8-8,3), ve *E. cylindrica* (%3,7-14,4) olduğu bildirilmiştir (Arslan and Tüzer, 1998; Cicek et al., 2007; Özer and Şaki, 2001). *E. bovis* ve *E. zuernii* türlerinin dominant türler olduğu İngiltere (Stewart et al., 2008), Almanya (Bangoura et al., 2012), Danimarka (Enemark et al., 2013), Avusturya (Koutny et al., 2012) ve Polonya (Tomczuk et al., 2015) gibi çeşitli Avrupa ülkelerinde yapılan

Çalışmalarda da rapor edilmiştir. Çalışmamızda da morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre yukarıdaki çalışmalara paralel olarak patojenik *Eimeria* türleri daha yaygın belirlenmiş olup en yaygın tür %30,0 ile *E. auburnensis* bulunmuş bunu sırasıyla %28,8 ile *E. bovis*, %26,6 ile *E. zuernii*, %25,1 ile *E. canadensis*, %14,1 ile *E. ellipsoidalis*, %8,9 ile *E. cylindrica*, %8,2 ile *E. alabamensis*, %5,7 ile *E. brasiliensis*, %5,0 ile *E. bukidnonensis*, %4,8 ile *E. subspherica*, %1,6 ile *E. wyomingensis* ve %0,5 ile *E. pellita* izlemiştir. Araştırma illerine göre *Eimeria* türlerinin dağılımları genel anlamda ortalama değerler bazında birbirine yakın belirlenmiştir. Buna karşın morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre <3 ay yaş grubu sığırlarda *E. bovis* en yüksek dağılım gösterirken, 4-12 ve >12 ay yaş grubu sığırlarda *E. auburnensis* pozitifliği daha yüksek bulunmuştur. Sığırların dışkı karakterlerine göre ise ishalli ve kanlı ishalli dışkı gruplarında *E. bovis* ve *E. zuernii* pozitiflikleri diğer patojenik ve non-patojenik *Eimeria* türlerine göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Bu sonuç da yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermiştir (Bangoura et al., 2012; Enemark et al., 2013; Koutny et al., 2012; Stewart et al., 2008; Tomczuk et al., 2015).

Çalışmamızda *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen hayvanlarda miks enfeksiyonların (%44,9) tek türle (%2,3) enfeksiyonlara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek iki türle miks enfeksiyonlar saptanmış, bunu sırasıyla üç, dört, tek ve beş türle enfeksiyonlar izlemiştir. Bu sonuçlara paralel olarak Montero ve ark. (Montero et al., 1990) Kosta Rika’da incelemesini yaptıkları buzağların %73’ünü miks enfekte olduğunu belirlemişlerdir. Çiçek ve ark. (Cicek et al., 2007) Afyon bölgesinde sığırlarda miks enfeksiyonları (2-4 tür) %43,6 olarak saptamışlardır. Arslan ve Tüzer (Arslan and Tüzer, 1998), Trakya bölgesinde sığırlarda miks enfeksiyonları tek türle enfeksiyonlara oranla yaklaşık 2,5 kat daha fazla belirlemişlerdir. Buna karşın Polonya, Fransa, Almanya ve ek Cumhuriyeti’nde örneklenen sığırlar üzerinde yapılan çalışmalarda (Farkas et al., 2007; Pilarczyk et al., 2011; Tomczuk et al., 2015) tek türle enfeksiyon oranları daha yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerde patojenik *Eimeria* türlerinin moleküler identifikasyonu için Kawahara ve ark. (2010) tarafından bildirilen ve ribozomal ITS-1 gen bölgesini hedef alan primer çiftleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiş ancak bu primer çiftlerinin non-spesifik amplikonlara yol açtığı ve bağlanma spesifitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu proje çalışmasında ilk olmak üzere patojenik *Eimeria* türlerinin kantitatif identifikasyonları için TaqMan prob tabanlı real time PCR geliştirilmiştir. Nitekim geleneksel

mikroskopi ve morfolojik teknikler tipik olarak coccidian ookistlerin identifikasyonu için kullanılmakta olup sıklıkla sübjektif özelliktedir. Bununla birlikte bu teknikler önemli düzeyde parazitolojik uzmanlık gerektirmekte ve tür identifikasyonlarında güvenilirliği yüksek olmamaktadır (Lalonde and Gajadhar, 2011). Ookistlerin fekal ve gıda örneklerinden izole edilmesi, saptanması ve identifikasyonundaki zorluklar, *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* ve *Toxoplasma* gibi soylara ait türlerin oluşturdukları hastalıkların kesin olarak saptanamamasına ve dolayısıyla da hastalık salgın araştırmalarının ve etkin tedavi stratejilerinin ortaya konmasına engel teşkil etmektedir (Gajadhar and Allen, 2004). Bu açıdan insan ve hayvanlarda coccidian ookistlerin saptanması için epidemiyolojik ve hastalık salgın araştırmalarında rutin kullanım amacıyla güvenilir moleküler tabanlı tekniklerle araştırmalara ihtiyaç ortaya çıkmıştır (Lalonde and Gajadhar, 2011). Farklı Real Time PCR teknikleri birçok farklı bilimsel alanda kullanılmaktadır. Örneğin *Cryptosporidium parvum*'un insanlar için patojenik genetik varyantlarının (Pangasa et al., 2009; Ramirez and Sreevatsan, 2006), çeşitli kanatlı *Eimeria* türleri (Kirkpatrick et al., 2009; Vrba et al., 2010), *Borellia* (Rauter et al., 2002) ve *Plasmodium* (Safeukui et al., 2008), *Leishmania* organizma grupları (Schulz et al., 2003) ile plum pox virus suşlarının (Varga and James, 2005) başarılı bir şekilde ayırımında ve tek nükleotid polimorfizmlerinin spesifik olarak belirlenmesinde (Graham et al., 2005; Zhou et al., 2004) Real Time PCR teknikleri yüksek özgünlükte kullanılmıştır. Çalışmamızda TaqMan Real Time PCR'da primer ve prob dizaynı için ribozomal ITS-1 türler arası göstermiş olduğu yüksek sekans heterojenitesi açısından hedef bölge olarak belirlenmiş ve ilgili spesifik primer ve probler sentezlenmiştir. Her patojenik *Eimeria* türü için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğri analiz sonuçlarına göre de TaqMan prob tabanlı Real Time PCR etkinlik oranları (eff: %104,5-%132,6) yüksek belirlenmiştir. Elde edilen verilerle her bir replikasyonda tüm türler için 10 hedef kopyanın saptanabileceği belirlenmiş olup Vrba ve ark. (2010) tarafından da belirtildiği gibi DNA kopya sayısındaki bu miktar sekiz haploid genom içeren tek bir ookiste karşılık gelmektedir.

Real Time PCR analiz sonuçları temelinde çalışmamızda *Eimeria* türleri için DNA kopya sayısı düzeyinde en yüksek pozitiflik *E. auburnensis* için belirlenmiş olup bunu sırasıyla *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* ve *E. alabamensis* pozitiflikleri izlemiştir. Saptanan patojenik *Eimeria* türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde her tür için DNA kopya sayısı düzeyinde 1 yaş altı hayvanlarda pozitiflik istatistiksel anlamda önemli olmak üzere daha yüksek belirlenmiştir. Bununla birlikte dışkı karakterlerine göre patojenik *Eimeria* türlerinin

dağılımında da her tür için kanlı ishaller ve ishaller dışkıları DNA kopya sayısı bazında pozitiflik normal dışkıları oranla istatistiksel açıdan daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar morfolojik identifikasyon ve OPG düzeyleri ile de paralellik göstermiş olup buzağılarda ve genç sığırlarda ve özellikle ishal olgularında başta *E. bovis* ve *E. zuernii* enfeksiyonlarının risk oluşturan primer türler olduğunu kantitatif düzeyde de teyit etmiştir. Nitekim <3 ay grubu ve ishaller dışkı karakterinde olan örneklerde *E. bovis* ve *E. zuernii* pozitifliği de DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. alabamensis* pozitifliklerine oranla daha yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

Eimeria türlerinin identifikasyonu genel olarak sporlanmış ookistlerin morfolojisine dayanmaktadır. Ancak bazı türler birbirleri ile morfolojik benzerlik göstermektedir. Bu açıdan moleküler karakterizasyon birçok *Eimeria* türünün başarılı bir şekilde sınırlarının ayrılmasında ve filogenetik ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında zorunlu hale gelmiştir (Kokuzawa et al., 2013). Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) geni moleküler karakterizasyon için iyi bilinen bir markerdir. Kümes hayvanlarında, rodentlerde ve tavşanlarda parazitlenen çeşitli *Eimeria* türlerinin filogenetik ilişkilerinin araştırıldığı farklı çalışmalar (Barta et al., 1997; Kvicerova et al., 2008; Zhao and Duszynski, 2001) 18S rRNA sekansları ve *Eimeria* türlerinin morfolojisi temeline dayanmıştır. Ancak günümüze kadar sığır coccidiosis'ine yol açan *Eimeria* türlerinin 18S rRNA sekansları temeline filogenetik yapılanması üzerine yalnızca Japonya'da sığırlardan izole edilmiş farklı 10 *Eimeria* türüne ait izolatların incelendiği yalnızca bir çalışma (Kokuzawa et al., 2013) bulunmaktadır. Bu çalışmada (Kokuzawa et al., 2013) incelenen izolatların tür bazlı olarak 3 monofiletik grupta yer aldığı ve her grupta yer alan türlere ait izolatların da benzer ookist morfolojisi göstermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda karakterize edilen *Eimeria* türlerine ait izolatların Japonya'dan bildirilen izolatlarla birlikte tür bazlı olarak cluster oluşturmuş olması da araştırmacıların bulgularını destekler nitelikte bulunmuştur. Bunun yanında bu proje çalışmasıyla *E. pellita*, *E. brasiliensis* ve *E. illinoisensis* türlerine ait izolatların Dünya'da ilk kez 18S rRNA karakterizasyonları yapılmış ve ilgili gen bölgesi yönünden moleküler taksonomiye geçirilmesi sağlanmıştır. İlgili bu türler göz önüne alındığında 18S rRNA filogenisine göre Kokuzawa ve ark. (2013) tarafından saptanan 3 monofiletik gruba ilaveten A ve B filogenetik gruplarına yakın olarak *E. pellita*'nın (Grup C) ve diğer tüm gruplardan daha uzak olarak *E. brasiliensis*'in (Grup E) 2 farklı monofiletik grup daha oluşturduğu saptanmıştır. Kokuzawa ve ark. (2013) ayrıca inceledikleri çoğu sığır *Eimeria* türü

için değişik oranda intraspesifik sekans diversitesi belirlemişler ve bu diversitenin özellikle *E. alabamensis* ve *E. bukidnonensis* türlerinde daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Nitekim alışmamızda da tür bazlı olarak izolatlarımız arasında ve aynı türe ait Japonya izolatları arasında farklı oranlarda intraspesifik sekans heterojenitesi belirlenmiş olup ortalama genetik diversite $2,2\pm0,3$ saptanmıştır. Yine araştırma yöresinde karakterize edilen *E. alabamensis* ve *E. bukidnonensis* izolatlarının kendi aralarında ve Japonya izolatlarıyla ortalama sırasıyla $0,6\pm0,2$ ve $0,4\pm0,1$ farklılığı göstermiş olması da Kokuzawa ve ark.nın (2013) bulgularını destekler nitelikte değerlendirilmiştir.

Ökaryotik sistemde ribosomal RNA (rRNA) genleri yüksek düzeyde korunmuş yapı gösterir. 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerinden oluşan clusterın sınırları internal transcribed spacers 1 ve 2 (ITS-1 ve ITS-2) genleriyle belirlenmiştir. ITS-1 ve ITS-2 sekansları türler arasında oldukça yüksek variabilite gösterirken tür içinde kısmen korunmuş yapı sergileyebilir. Bu özelliğiyle özellikle ITS-1 sekansları *Eimeria* dahil birçok organizmdeki türlerin identifikasyonunda genetik markerlar olarak kullanılmaktadır (Barta et al., 1997; Hnida and Duszynski, 1999; Kawahara et al., 2010; Lew et al., 2003; Mugridge et al., 2000; Schnitzler et al., 1998; Stucki et al., 1993). Ancak bunun yanında belirli bazı *Eimeria* türleri içinde ITS-1 bölgesinde nükleotid varyasyonları da farklı ülkelerden çeşitli araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir (Bhaskaran et al., 2010; Kawahara et al., 2010; Lew et al., 2003; Schnitzler et al., 1999; Woods et al., 2000) Bu varyasyonların tür spesifik primerlerin dizayn edildiği bölgelerde görülmesi durumunda yayınlanmış primerler niversal olarak kabul görmeyebilir. Nitekim alışmamızda da Kawahara ve ark. (2010) tarafından ITS-1 gen bölgesinden dizayn edilen primerlerin amplifikasyon etkinliğinin düşük bulunması da ilgili gen bölgesi içindeki varyasyonlarla da ilişkili grlmştir. Sığırlarda *Eimeria* türlerinin ITS-1 gen bölgesi filogenisi zerine Kawahara ve ark. (2010) tarafından Japonya’da yürütülmüş bir çalışma bulunmaktadır. Bu alışmada (Kawahara et al., 2010) patojenik *Eimeria* türlerine ait izolatların yanısıra *E. cylindrica* izolatlarının filogenetik yapılanması incelenmiş ve türlere ait izolatların  filogenetik grupta yerleştiği kaydedilmiştir. Major grupta *E. auburnensis*, *E. cylindrica* ve *E. ellipsoidalis* türlerine ait izolatların kümelendiği, *E. bovis*, *E. zuernii* ve *E. alabamensis*’e ait izolatların ise her birinin ayrı olarak küçük clusterlarda yer aldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise tüm patojenik türlerin yanısıra *E. pellita* dışında diğer tüm türlere ait izolatların Japonya izolatları ile birlikte ITS-1 filogenisine göre yapılanması belirlenmiştir. Bunun yanında bu proje çalışmasıyla *E. brasiliensis* ve *E. illinoisensis* türlerine ait izolatların

Dünya’da ilk kez ITS-1 karakterizasyonları yapılmış ve ilgili gen bölgesi yönünden moleküler taksonomiye geçirilmesi sağlanmıştır. 18S rRNA filogenisine göre Grup C’de yer alan *E. pellita* clusterı bu türe ait genomik DNA izolatlarının ITS-1 primerleriyle etkin amplifikasyon göstermemesi neticesinde bu gen bölgesi yönünden filogenetik analizleri yapılamamıştır. ITS-1 filogenetik analiz sonuçlarına göre izolatların tür bazlı olarak oluşturdukları clusterlar bazı farklı yerleşimler göstermekle birlikte (Örn., *E. brasiliensis* 18S rRNA filogenisine göre en uzak cluster saptanırken, ITS-1 filogenisine göre A ve B gruplarına yakın bulunmuştur) 18S rRNA gen bölgesinde olduğu gibi filogenetik gruplanma göstermiştir. Bu sonuçlarla Kawahara ve ark. (2010) tarafından bildirilen ITS-1 filogenisinin tüm türlere ait izolatların analizlere dahil edilmesiyle yeterli olmadığı görülmüştür. Bunun yanında çalışmamızda incelenen *Eimeria* izolatları arasında genetik heterojenite oldukça yüksek ($61,5 \pm 7,5$) belirlenmiş, filogenetik yapılanmada bootstrap desteğinin de yüksek olmadığı saptanmıştır. Bu açıdan ilgili gen bölgesine göre *Eimeria* türlerinin filogenetik yapılanması her ne kadar 18SrRNA yapılanmasına benzer bulunmuş olsa da bu gen bölgesinin türler arası filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında yeterli olmadığı belirlenmiş, ancak intraspesifik homolojinin *E. cylindrica* dışında oldukça yüksek olması ($>99,0$; *E. cylindrica* Japonya izolatlarıyla $9,7 \pm 1,6$ farklı bulunmuştur) yönüyle türlerin ayrımında ideal bir genetik marker olduğu kanaatine varılmıştır. Nitekim çeşitli araştırmacılar da (Alasaad et al., 2009; Buckler et al., 1997) ITS gen bölgelerinin yaygın olarak farklı paraloglar ve pseudogenleri yaygın olarak bulundurmaları sebebiyle anlamlı filogenetik yapılandırılmada veya genetik diversitenin incelenmesinde uygun gen bölgeleri olmadıklarını rapor etmişlerdir.

Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) bölgesini kodlayan gen, enerji kaynağı olarak oksidatif fosforilasyonu kullanan organizimlerde üniversal olarak bulunmasıyla birçok organizmin filogenetik analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004). Mt-COI gen bölgesi aynı zamanda DNA barkodlaması için de ideal bir gen bölgesidir. Yaşam barkodlaması (BOL), PCR sekanslaması ve “DNA barkodları” olarak bilinen ve mt-COI geninin 50 bölgesinden elde edilen kısa standart DNA sekanslarının analizini kullanarak tür identifikasyonlarını ve yeni türlerin keşfini kolaylaştıran global bir girişimdir. Apicomplexa anacında, özellikle de coccidia’da mitokondriyal genlerin moleküler sistematik ve/veya parazit identifikasyonunda kullanışlı olduğunu gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte mitokondriyal genomun epidemiyolojideki problemleri ortaya çıkarmada, daha yaygın olarak kullanılan nükleer genlerin tek başına kullanımıyla tam olarak

çözümlemeyen evrim veya tür identifikasyonlarında gün geçtikçe kullanımı daha yaygın hale gelmektedir. Örneğin Schwarz et al. (2009) kanatlı çiftliklerindeki farklı *Eimeria* türlerinin popülasyon dinamiklerinin ortaya çıkarılmasında hem ribozomal SSU hem de mt-COI genlerini birlikte kullanmışlardır. Yine Ogedebenge ve ark. (2010) kanatlı *Eimeria* türlerinin DNA barkodlamasıyla identifikasyonu ve filogenetik analizlerinde her iki gen bölgesini müşterek olarak kullanmışlar ve bu iki gen bölgesinin tür identifikasyonlarındaki kabiliyetlerini kıyaslamışlardır. Araştırmacılar (Ogedebenge ve ark. 2010) tavuklardaki yaygın tüm coccidia türlerinin mt-COI gen bölgesi sekanslarının kullanımıyla güvenilir bir şekilde ayrılabilirdiğini ve birbirine çok yakın sekansların clusterlarının tek bir *Eimeria* türü için monofiletik olarak çözümlenebildiğini ortaya koymuşlardır. Buna ilaveten, COI gen bölgesinin protein kodlaya bir gen bölgesi olması sebebiyle hizalama analizleri için daha anlamlı sonuçlar ortaya koyduğu ve hizalama analizlerindeki pozisyonel homolojinin daha doğru olduğu çalışmada (Ogedebenge ve ark. 2010) belirlenmiştir. Tüm bu verilerle mt-COI sekanslarının coccidian türlerin moleküler identifikasyonu ve filogenetik ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında oldukça kullanışlı olduğu görülmektedir. Nitekim malarya parazitleri için de benzer sonuçlar bildirilmiştir (Martinsen et al., 2008). Çalışmamızda dünyada ilk olarak sığır *Eimeria* türlerinin mitokondriyal DNA barkodlaması gerçekleştirilmiş ve mt-COI gen bölgesine göre filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur. Mt-COI filogenisine göre izolatların tür bazlı olarak diğer gen bölgelerinde olduğu gibi filogenetik gruplanma gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanında Ogedebenge ve ark. (2010)'nın bulgularına paralel olarak çalışmamızda mt-COI gen bölgesi filogenetik çözümlemesinin 18S rRNA gen bölgesine göre daha yüksek olduğu maximum likelihood bootstrap değerleriyle desteklenmiş ve ortalama genetik heterojenite (%14,2±1,4) 18S rRNA gen bölgesine göre anlamlı düzeyde daha yüksek belirlenmiştir. Benzer şekilde Ogedebenge ve ark. (2011) da tavuklarda *Eimeria* türlerinin mt-COI sekanslarındaki genetik heterojeniteyi %17,1±3,8 olarak 18S rRNA gen bölgesine göre daha yüksek bulmuşlardır. 18S rRNA filogenisinde A grubu içerisinde en dış cluster olarak yer alan *E. illinoisensis*'in mt-COI filogenisine göre *E. bovis* ve *E. ellipsoidalis* clusterlarına daha yakın olduğu görülmüş, *E. zuernii*'nin ise bu grup içerisinde dış clusterı oluşturduğu saptanmıştır. 18S rRNA filogenisinde B grubunda yer alıp en dış küme oluşturan *E. canadensis*'in mt-COI filogenisine göre *E. auburnensis* ile cluster oluşturduğu belirlenmiştir. D grubunda yer alan *E. subspherica*'nın mt-COI filogenisine göre en uzak clusterı oluşturduğu ve ayrı bir filogenetik grupta (Grup F) yer aldığı ortaya çıkarılmıştır. Yine 18S rRNA filogenisine göre en uzak grubu (Grup E) oluşturan

E. brasiliensis'in D grubunda yer alan *E. bukidnonensis* ve *E. alabamensis* clusterlarına yakın farklı bir filogenik yerleşim gösterdiği (Grup E) tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile İç Anadolu Yöresindeki sığırlarda coccidiosis'e yol açan patojenik ve non-patojenik *Eimeria* türlerinin moleküler prevalansı ve enfeksiyon yükleri kantitatif düzeyde ortaya konmuş olup patojenik *Eimeria* türlerinden *E. auburnensis*, *E. bovis* ve *E. zuernii* türlerinin primer yaygın türler olduğu ve özellikle buzağı ve genç sığırlarda ishal olgularının epidemiyolojisinde önem arz ettikleri belirlenmiştir. Çalışma ile ayrıca dünyada ilk olarak patojenik *Eimeria* türlerinin kantitatif moleküler identifikasyonları için yüksek özgünlük ve duyarlılıkta TaqMan Real Time PCR geliştirilmiş olup bu tekniğin moleküler epidemiyolojik araştırmalar ve tedavi etkinliği çalışmaları için oldukça kullanışlı olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu proje çalışmasıyla sığır *Eimeria* türlerinin 18S rRNA, ribozomal ITS-1 ve mt-COI gen bölgelerinin bir arada kullanılmasıyla moleküler karakterizasyonları yapılmış ve filogenetik yapılanmaları ortaya konulmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Aktaş, M.S., Sarı, B., Arslan, M.Ö., 2008. "Prevalence of *Eimeria* species in dairy calves of Erzurum and vicinity", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 14, 25-29.
- Alasaad, S., Soglia, D., Spalenza, V., Maione, S., Soriguer, R.C., Perez, J.M., Rasero, R., Degiorgis, M.P., Nimmervoll, H., Zhu, X.Q., Rossi, L., 2009. "Is ITS-2 rDNA suitable marker for genetic characterization of *Sarcoptes* mites from different wild animals in different geographic areas?", Vet Parasitol 159, 181-185.
- Arslan, M.O., 1997. "Prevalance of *Eimeria* species in calves in Kars province, Turkey", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 3, 141-149.
- Arslan, M.Ö. 1995. Trakya yöresi sığırlarında Eimeriidae türlerinin yaygınlığı. (İstanbul, Doktora Tezi. İstanbul Üniv. Sağ. Bil. Enst., Parazitoloji Anabilim Dalı.).
- Arslan, M.Ö., Sarı, B., 2013. "Coccidiosis", In: M.A, Ö., İnci, A. (Eds.) Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, pp. 123-134.
- Arslan, M.Ö., Sarı, B., Kara, M., Taşçi, G.T., Ekinci, A.I., Gündüz, N., 2012. "Research on the prevalence of *Eimeria* and *Cryptosporidium* species in cows in periparturient period in Kars region", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 18, A65-A70.
- Arslan, M.Ö., Tüzer, E., 1998. "Prevalence of bovine eimeridosis in Thracia, Turkey", Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi 22, 161-164.
- Autzen, S., Maddox-Hyttel, C., Monrad, J., 2002. "Infection with *Eimeria* species in calves: evaluation of risk factors and association between diarrhoea and oocyst excretion", Dansk Veterinærtidsskrift 85, 6-10.
- Bangoura, B., Dauschies, A., Fuerll, M., 2007. "Influence of experimental *Eimeria zuernii* infection on clinical blood chemistry in calves", Vet Parasitol 150, 46-53.
- Bangoura, B., Mundt, H.C., Schmaschke, R., Westphal, B., Dauschies, A., 2012. "Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion", Parasitol Res 110, 875-881.
- Barta, J.R., Martin, D.S., Liberator, P.A., Dashkevich, M., Anderson, J.W., Feighner, S.D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M.C., Danforth, H.D., Ruff, M.D., Profous-Juchelka, H., 1997. "Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences", J Parasitol 83, 262-271.
- Bhaskaran, M.S., Venkatesan, L., Aadimoolam, R., Tirunelveli Jayagopal, H., Sriraman, R., 2010. "Sequence diversity of internal transcribed spacer-1 (ITS-1) region of *Eimeria* infecting chicken and its relevance in species identification from Indian field samples", Parasitol Res 106, 513-521.

- Buckler, E.S.t., Ippolito, A., Holtsford, T.P., 1997. "The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications", *Genetics* 145, 821-832.
- Cicek, H., Sevimli, F., Kozan, E., Kose, M., Eser, M., Dogan, N., 2007. "Prevalence of coccidia in beef cattle in western Turkey", *Parasitol Res* 101, 1239-1243.
- Collins, J.E., Dubey, J.P., Rossow, K.D., 1988. "Hepatic coccidiosis in a calf", *Vet Pathol* 25, 98-100.
- Cornelissen, A.W., Verstegen, R., van den Brand, H., Perie, N.M., Eysker, M., Lam, T.J., Pijpers, A., 1995. "An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms", *Vet Parasitol* 56, 7-16.
- Cotton, P.A., 1998. "Coevolution in an Amazonian humminbird-plant community ", *Ibis* 140, 639-646.
- Courtney, C.H., Ernst, J.V., Benz, G.W., 1976. "Redescription of oocysts of the bovine coccidia *Eimeria bukidnonensis* Tubangui 1931 and *E. wyomingensis* Huizinga and Winger 1942", *J Parasitol* 62, 372-376.
- Dahlgren, S.S., Gouveia-Oliveira, R., Gjerde, B., 2008. "Phylogenetic relationships between *Sarcocystis* species from reindeer and other Sarcocystidae deduced from ssu rRNA gene sequences", *Vet Parasitol* 151, 27-35.
- Dauguschies, A., Najdrowski, M., 2005. "Eimeriosis in cattle: current understanding", *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 417-427.
- Değer, S., Biçek, K., Gül, A., Eraslan, E., 2001. " Van yöresi buzağı ve danalarında *Eimeria* türlerinin yaygınlığı", *Yüzüncü Yıl Univ Sağlık Bil Derg* 7, 69-72.
- Dumanlı, N., Güler, S., Erdoğan, Z., Köroğlu, E., Yılmaz, H., Küçükerden, N., 1993. "The incidence of coccidia species found in cattle in Elazığ province of Turkey", *Doğa, Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi* 17, 223-227.
- Duszynski, D.W., Upton, S.J., 2001. "*Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*, and *Cryptosporidium* spp.", In: Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. (Eds.) *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State Press, Iowa City, pp. 416-433.
- Duszynski, D.W., Wilber, P.G., 1997. "A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae", *J Parasitol* 83, 333-336.
- Enemark, H.L., Dahl, J., Enemark, J.M., 2013. "Eimeriosis in Danish dairy calves--correlation between species, oocyst excretion and diarrhoea", *Parasitol Res* 112 Suppl 1, 169-176.
- Ernst, J.V., Stewart, T.B., Witlock, D.R., 1987. "Quantitative determination of coccidian oocysts in beef calves from the coastal plain area of Georgia (U.S.A.)", *Vet Parasitol* 23, 1-10.
- Escalante, A.A., Ayala, F.J., 1995. "Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes", *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5793-5797.

- Faber, J.E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Burger, H.J., Zahner, H., 2002. "Eimeria infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies", Vet Parasitol 104, 1-17.
- Farkas, R., Szeidemann, Z., Majoros, G., 2007. "Studies on coccidiosis of calves in Hungarian dairy farms", Parasitol Res 101, S113-S120.
- Fitzgerald, P.R., 1980. "The economic impact of coccidiosis in domestic animals", Adv Vet Sci Comp Med 24, 121-143.
- Gajadhar, A.A., 1994. "Host specificity studies and oocyst description of a *Cryptosporidium* sp. isolated from ostriches", Parasitol Res 80, 316-319.
- Gajadhar, A.A., Allen, J.R., 2004. "Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites", Vet Parasitol 126, 3-14.
- Göz, Y., Aydın, A., 2005. "Prevalence of coccidiosis agents in calves in the Yüksekova (Hakkari) Region", Türkiye Parazitoloji Dergisi 29, 13-16.
- Gräfner, G., Graubmann, H.D., Daetz, H., Müller, H., Meinke, N., 1985. "Epidemiology of *Eimeria alabamensis* coccidiosis in young cattle", Monatshefte für Veterinärmedizin 40, 44-47.
- Graham, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E., Wittwer, C.T., 2005. "Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting", Clin Chem 51, 1295-1298.
- Gül, A., Biçek, K., Değer, S., 2000. "Van belediye mezbahasında kesimi yapılan sığırlarda bulunan *Eimeria* türleri ve bunların yayılış oranları", Yüzüncü Yıl Univ Vet Fak Derg 11, 12-14.
- Gül, A., Çiçek, M., Kılınç, Ö., 2008. "Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van Province", Türkiye Parazitoloji Dergisi 32, 202-204.
- Güleğen, A.E., Okursoy, S., 2000. "Coccidia species and their prevalence in cattle in the province of Bursa", Türkiye Parazitoloji Dergisi 24, 297-303.
- Güven, E., Nalbantoğlu, S., Orkun, Ö., Akçay, A., Koçak, A., 2010. "Prevalance of *Eimeria* species in cattle in Mucur District of Kırşehir", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 16, 483-486.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. "Biological identifications through DNA barcodes", Proc Biol Sci 270, 313-321.
- Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*", Proc Natl Acad Sci U S A 101, 14812-14817.
- Heidari, H., Sadeghi-Dehkordi, Z., Moayedi, R., Gharekhani, J., 2014. "Occurrence and diversity of *Eimeria* species in cattle in Hamedan province, Iran", Veterinární Medicina 59, 271-275.

Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N.M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K., Tanabe, K., 2011. "Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*", *Mitochondrion* 11, 273-278.

Hill, N.J., Richter, C., Power, M.L., 2012. "Pinning down a polymorphic parasite: new genetic and morphological descriptions of *Eimeria macropodis* from the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*)", *Parasitol Int* 61, 461-465.

Hnida, J.A., Duszynski, D.W., 1999. "Taxonomy and systematics of some *Eimeria* species of murid rodents as determined by the ITS1 region of the ribosomal gene complex", *Parasitology* 119 (Pt 4), 349-357.

Jolley, W.R., Bardsley, K.D., 2006. "Ruminant coccidiosis", *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22, 613-621.

Karaer, Z., Orkun, Ö., Sürsal, N., 2012. "Sığır, Koyun ve Keçilerde Coccidiosis", *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* 3, 1-8.

Kawahara, F., Zhang, G., Mingala, C.N., Tamura, Y., Koiwa, M., Onuma, M., Nunoya, T., 2010. "Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites", *Vet Parasitol* 174, 49-57.

Kaya, G., 1998. Phylogenetic analyses of five sheep infective *Eimeria* species and development of a novel total nucleic acid extraction method from small numbers of *Eimeria* oocysts. PhD. University of Bristol, England.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data", *Bioinformatics* 28, 1647-1649.

Kirkpatrick, N.C., Blacker, H.P., Woods, W.G., Gasser, R.B., Noormohammadi, A.H., 2009. "A polymerase chain reaction-coupled high-resolution melting curve analytical approach for the monitoring of monospecificity of avian *Eimeria* species", *Avian Pathol* 38, 13-19.

Klockiewicz, M., Kaba, J., Tomczuk, K., Janecka, E., Sadzikowski, A.B., Rypuła, K., Studzin'ska, M., Małecki-Tepicht, J., 2007. "The epidemiology of calf coccidiosis (*Eimeria* spp.) in Poland", *Parasitol Res* 101, S121-S128.

Kokuzawa, T., Ichikawa-Seki, M., Itagaki, T., 2013. "Determination of phylogenetic relationships among *Eimeria* species, which parasitize cattle, on the basis of nuclear 18S rDNA sequence", *J Vet Med Sci* 75, 1427-1431.

Koutny, H., Joachim, A., Tichy, A., Baumgartner, W., 2012. "Bovine *Eimeria* species in Austria", *Parasitol Res* 110, 1893-1901.

Kvicerova, J., Pakandl, M., Hypsa, V., 2008. "Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features", *Parasitology* 135, 443-452.

- Lalonde, L.F., Gajadhar, A.A., 2008. "Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts", *Appl Environ Microbiol* 74, 4354-4358.
- Lalonde, L.F., Gajadhar, A.A., 2011. "Detection and differentiation of coccidian oocysts by real-time PCR and melting curve analysis", *J Parasitol* 97, 725-730.
- Lassen, B. 2009. Diagnosis, Epidemiology and Control of Bovine Coccidiosis in Estonia, Section of Parasitology, D.o.I.D., Institute of, Veterinary Medicine and Animal Sciences, E.U.o.L., Sciences, eds.
- Lassen, B., Järvis, T., 2009. "*Eimeria* and *Cryptosporidium* in Lithuanian cattle farms", *Veterinarija ir Zootechnika*, 24-28.
- Legendre, P., Desdevises, Y., Bazin, E., 2002. "A statistical test for host-parasite coevolution", *Syst Biol* 51, 217-234.
- Levine, N., 1985. *Veterinary Protozoology*, First edition Edition. Iowa State Univ Press, Ames.
- Levine, N., Ivens, V. 1970. *The Coccidian Parasites (Protozoa, Sporozoa) of Ruminants*, Illinois (London, University of Illinois Press No. 44.).
- Lew, A.E., Anderson, G.R., Minchin, C.M., Jeston, P.J., Jorgensen, W.K., 2003. "Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens", *Vet Parasitol* 112, 33-50.
- Li, G., Xiao, S., Zhou, R., Li, W., Wade, H., 2007. "Molecular characterization of *Cyclospora*-like organism from dairy cattle", *Parasitol Res* 100, 955-961.
- Lin, R.Q., Qiu, L.L., Liu, G.H., Wu, X.Y., Weng, Y.B., Xie, W.Q., Hou, J., Pan, H., Yuan, Z.G., Zou, F.C., Hu, M., Zhu, X.Q., 2011. "Characterization of the complete mitochondrial genomes of five *Eimeria* species from domestic chickens", *Gene* 480, 28-33.
- Long, P.L., Joyner, L.P., 1984. "Problems in the identification of species of *Eimeria*", *J Protozool* 31, 535-541.
- Lucas, A.S., Swecker, W.S., Jr., Lindsay, D.S., Scaglia, G., Neel, J.P., Elvinger, F.C., Zajac, A.M., 2014. "A study of the level and dynamics of *Eimeria* populations in naturally infected, grazing beef cattle at various stages of production in the Mid-Atlantic USA", *Vet Parasitol* 202, 201-206.
- Marshall, R.N., Catchpole, J., Green, J.A., Webster, K.A., 1998. "Bovine coccidiosis in calves following turnout", *Vet Rec* 143, 366-367.
- Martinsen, E.S., Perkins, S.L., Schall, J.J., 2008. "A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches", *Mol Phylogenet Evol* 47, 261-273.
- Matjila, P.T., Penzhorn, B.L., 2002. "Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa", *Vet Parasitol* 104, 93-102.

Mimioğlu, M., Göksu, K., Sayın, F., 1956. "Ankara ve civarı sığırlarında coccidiosis olayları üzerine araştırmalar", Ankara Univ Vet Fak Derg 3, 136-158.

Modry, D., Slapeta, J.R., Jirku, M., Obornik, M., Lukes, J., Koudela, B., 2001. "Phylogenetic position of a renal coccidium of the European green frogs, '*Isospora*' lieberkuehni Labbe, 1894 (Apicomplexa: Sarcocystidae) and its taxonomic implications", Int J Syst Evol Microbiol 51, 767-772.

Montero, V., Molina, M.A., Chinchilla, M., 1990. "*Eimeria* of calves in Coronada County: prevalence and identification", Ciencias Veterinarias (Heredia) 12, 21-24.

Morrison, D.A., Bornstein, S., Thebo, P., Wernery, U., Kinne, J., Mattsson, J.G., 2004. "The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa)", Int J Parasitol 34, 501-514.

Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Jakel, T., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Johnson, A.M., 2000. "Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae", Mol Biol Evol 17, 1842-1853.

Mundt, H.C., Dauschies, A., Uebe, F., Rinke, M., 2003. "Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves", Parasitol Res 90 Suppl 3, S166-167.

Nielsen, B.K., Thamsborg, S.M., Kristensen, T., 2003. "Feed supplements for young dairy breed calves after turn-out to pasture: effect on weight gain and subclinical coccidiosis in organic production systems", Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science 53, 1-10.

Niilo, L., 1970. "Bovine coccidiosis in Canada", Can Vet J 11, 91-98.

Obornik, M., Jirku, M., Slapeta, J.R., Modry, D., Koudela, B., Lukes, J., 2002. "Notes on coccidian phylogeny, based on the apicoplast small subunit ribosomal DNA", Parasitol Res 88, 360-363.

Oda, K., Nishida, Y., 1990. "Prevalence and distribution of bovine coccidia in Japan", Nihon Juigaku Zasshi 52, 71-77.

Ogedengbe, J.D., Hanner, R.H., Barta, J.R., 2011. "DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata)", Int J Parasitol 41, 843-850.

Özer, E., Şaki, C., 2001. "Türkiye’de Coccidiosis", In: Dinçer, Ş. (Ed.) Coccidiosis. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, pp. 151-162.

Page, R.D., Charleston, M.A., 1998. "Trees within trees: phylogeny and historical associations", Trends Ecol Evol 13, 356-359.

Pangasa, A., Jex, A.R., Campbell, B.E., Bott, N.J., Whipp, M., Hogg, G., Stevens, M.A., Gasser, R.B., 2009. "High resolution melting-curve (HRM) analysis for the diagnosis of cryptosporidiosis in humans", Mol Cell Probes 23, 10-15.

- Parker, R.J., Boothby, K., Polkinghorne, I., Holroyd, R.G., 1984. "Coccidiosis associated with post-weaning diarrhoea in beef calves in a dry tropical region", *Aust Vet J* 61, 181-183.
- Parker, R.J., Jones, G.W., 1990. "Destruction of bovine coccidial oocysts in simulated cattle yards by dry tropical winter weather", *Vet Parasitol* 35, 269-272.
- Pilarczyk, B., Pilarczyk, R., Binerowska, B., Hendzel, D., Tomza-Marciniak, A., Kavetska, K., Królaczyk, K., 2011. "Prevalence of *Eimeria* protozoa in cows imported to Poland from the Czech Republic, France, and Germany. A preliminary study", *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy* 55, 203-206.
- Pilarczyk, B., Ramisz, A., Jastrzfbksi, G., 2002. "[Internal parasites of cattle in select Western Pomerania farms]", *Wiad Parazytol* 48, 383-390.
- Ramirez, N.E., Sreevatsan, S., 2006. "Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples", *Vet Parasitol* 136, 201-213.
- Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M., Hartung, T., 2002. "Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR", *J Clin Microbiol* 40, 36-43.
- Reduker, D.W., Duszynski, D.W., Yates, T.L., 1987. "Evolutionary relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa) infecting cricetid rodents", *Canadian Journal of Zoology* 65, 722-735.
- Rehman, T.U., Khan, M.N., Sajid, M.S., Abbas, R.Z., Arshad, M., Iqbal, Z., Iqbal, A., 2011. "Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan", *Parasitol Res* 108, 1171-1177.
- Rind, R., Brohi, M., 2001. "Factors affecting the survival and sporulation of *Eimeria* oocysts of cattle", *Pakistan J Biol Sci* 4, 487-491.
- Safeukui, I., Millet, P., Boucher, S., Melinard, L., Fregeville, F., Receveur, M.C., Pistone, T., Fialon, P., Vincendeau, P., Fleury, H., Malvy, D., 2008. "Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of *Plasmodium* species in returning travellers and migrants", *Malar J* 7, 70.
- Sanchez, R.O., Romero, J.R., Founroge, R.D., 2008. "Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age", *Vet Parasitol* 151, 133-138.
- Sayin, F., 1970. "The species of *Eimeria* occurring in cattle in Turkey", *Ankara Univ Vet Fak Derg* 17, 311-326.
- Schnitzler, B.E., Thebo, P.L., Mattsson, J.G., Tomley, F.M., Shirley, M.W., 1998. "Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken", *Avian Pathol* 27, 490-497.
- Schnitzler, B.E., Thebo, P.L., Tomley, F.M., Uggla, A., Shirley, M.W., 1999. "PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out", *Avian Pathol* 28, 89-93.

- Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B., Drosten, C., 2003. "Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay", *J Clin Microbiol* 41, 1529-1535.
- Schwarz, R.S., Jenkins, M.C., Klopp, S., Miska, K.B., 2009. "Genomic analysis of *Eimeria* spp. populations in relation to performance levels of broiler chicken farms in Arkansas and North Carolina", *J Parasitol* 95, 871-880.
- Stefka, J., Hypsa, V., Scholz, T., 2009. "Interplay of host specificity and biogeography in the population structure of a cosmopolitan endoparasite: microsatellite study of *Ligula intestinalis* (Cestoda)", *Mol Ecol* 18, 1187-1206.
- Stewart, I.D., Smith, R.P., Ellis-Iversen, J., 2008. "*Eimeria* species in cattle on farms in England and Wales", *Vet Rec* 162, 482-483.
- Stucki, U., Braun, R., Roditi, I., 1993. "*Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe", *Exp Parasitol* 76, 68-75.
- Svensson, C., Olofsson, H., Uggla, A., 1996. "Immunisation of calves against *Eimeria alabamensis* coccidiosis", *Appl Parasitol* 37, 209-216.
- Svensson, C., Uggla, A., Pehrson, B., 1994. "*Eimeria alabamensis* infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture", *Vet Parasitol* 53, 33-43.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0", *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Taylor, M.A., Catchpole, J., 1994. "Review article: coccidiosis of domestic ruminants", *Appl Parasitol* 35, 73-86.
- Tomczuk, K., Grzybek, M., Szczepaniak, K., Studzinska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczen-Karczmarz, M., Klockiewicz, M., 2015. "Analysis of intrinsic and extrinsic factors influencing the dynamics of bovine *Eimeria* spp. from central-eastern Poland", *Vet Parasitol*.
- Varga, A., James, D., 2005. "Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing", *J Virol Methods* 123, 213-220.
- Velkers, F.C., Blake, D.P., Graat, E.A., Vernooij, J.C., Bouma, A., de Jong, M.C., Stegeman, J.A., 2010. "Quantification of *Eimeria acervulina* in faeces of broilers: comparison of McMaster oocyst counts from 24h faecal collections and single droppings to real-time PCR from cloacal swabs", *Vet Parasitol* 169, 1-7.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Epe, C., Wirtherle, N., von der Heyden, V., Welz, C., Radeloff, I., Beening, J., Carr, D., Hellmann, K., Schnieder, T., Krieger, K., 2006. "Clinical and epidemiological characteristics of *Eimeria* infections in first-year grazing cattle", *Vet Parasitol* 136, 215-221.

- Vrba, V., Blake, D.P., Poplstein, M., 2010. "Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken", *Vet Parasitol* 174, 183-190.
- Wang, Y., Tao, G., Cui, Y., Lv, Q., Xie, L., Li, Y., Suo, X., Qin, Y., Xiao, L., Liu, X., 2014. "Molecular analysis of single oocyst of *Eimeria* by whole genome amplification (WGA) based nested PCR", *Exp Parasitol* 144, 96-99.
- Webb, T., Bartlein, P.J., 1992. "Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses", *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 141–173.
- Woods, W.G., Richards, G., Whithear, K.G., Anderson, G.R., Jorgensen, W.K., Gasser, R.B., 2000. "High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation", *Electrophoresis* 21, 3558-3563.
- Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R., Lal, A.A., 2002. "Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health", *Int J Parasitol* 32, 1773-1785.
- Yang, R., Fenwick, S., Potter, A., Elliot, A., Power, M., Beveridge, I., Ryan, U., 2012. "Molecular characterization of *Eimeria* species in macropods", *Exp Parasitol* 132, 216-221.
- Zhang, L., Ning, C., He, Q., Wang, Y., Song, T., Yuan, Y., 2000. "Survey of the epidemiology of dairy cow coccidiosis in Zhengzhou, Henan Province, China and identification of coccidia species", *Journal of Henan Agricultural University* 34, 88-93.
- Zhao, X., Duszynski, D.W., 2001. "Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences", *Int J Parasitol* 31, 715-719.
- Zhou, L., Myers, A.N., Vandersteen, J.G., Wang, L., Wittwer, C.T., 2004. "Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye", *Clin Chem* 50, 1328-1335.