

## Nevşehir Yöresindeki Yeni Doğan İshalli Buzağlarda Cryptosporidiosis'in Real Time PCR ve Nested PCR Yöntemleri ile Saptanması\*

Ahmet Tuncay ŞİMŞEK<sup>1</sup>, Abdullah İNCİ<sup>2</sup>, Alparslan YILDIRIM<sup>2</sup>, Arif ÇİLOĞLU<sup>2</sup>, Zuhâl BİŞKİN<sup>2</sup>, Önder DÜZLÜ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi Merkez Kampüsü, Kayseri-TÜRKİYE

<sup>2</sup> Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

**Özet:** Bu çalışma, Nevşehir yöresindeki ishallerli buzağlarda cryptosporidiosis'in real time PCR ve nested PCR teknikleri ile saptanması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 2010-2011 yılları arasında Nevşehir'in farklı ilçe ve köylerinden 150 ishallerli buzağıdan dışkı örneği tekniğine uygun olarak toplanmıştır. Toplanan örneklerden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar *Cryptosporidium* soy spesifik 18S rRNA parsiyel gen bölgesini amplifiye eden JVAF, JVAR primerleri ve JVAP TaqMan probuyla, *C. parvum* spesifik JVAGF, JVAGR primerleri ve JVAGP2 probu ile real time PCR analizine tabii tutulmuşlardır. Nested PCR analizlerinde de *Cryptosporidium* türlerinin 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler kullanılmıştır. Real time PCR analizleri sonucu 23'ü (%15.3) *C. parvum*, 8'i (%5.3) ise *Cryptosporidium* spp. olmak üzere toplam 31 (%20.7) örnekte cryptosporidiosis pozitifliği saptanmıştır. Örneklerin nested PCR analizleri sonucunda ise 29'u (%19.3) *Cryptosporidium* spp. pozitif bulunmuştur. Real time PCR tekniği altın standart test kabul edilerek nested PCR tekniğinin duyarlılığı %93.5 ve özgüllüğü ise %100 olarak belirlenmiş, iki teknik arasında %95.8 uyum saptanmıştır. Cryptosporidiosis'in en yüksek %23.2 ile 1-2 aylık buzağlarda belirlenmiş bunu sırasıyla %19.3 ve %16.7 ile 0-1 ve 2-3 aylık buzağlar izlemiştir. Enfeksiyonun erkek buzağlarda %21.5, dişilerde ise %19.7, Holştayn, Simental ve Montofon ırkında sırasıyla %32.6, %25 ve %11.1 yaygın olduğu görülmüştür. Bu çalışma Türkiye'de sığırlarda cryptosporidiosis'in real time PCR tekniği ile araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmada Türkiye'de ilk kez *Cryptosporidium* soy ve *C. parvum* pozitifliği eşzamanlı olarak ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, *Cryptosporidium* spp., ishal, nested PCR, real time PCR

### Detection of Cryptosporidiosis in Diarrhoeic Neonatal Calves in Nevşehir District by Real Time PCR and Nested PCR Techniques

**Summary:** The aim of this study was to detect cryptosporidiosis in calves with diarrhea in Nevşehir district by real time and nested PCR techniques. For this aim, between the 2010 and 2011 years, 150 fecal samples in total were technically collected from calves with diarrhea in different localities of Nevşehir province. After the genomic DNA extraction from the fecal samples, real time PCR analyses were carried out with *Cryptosporidium* spp. and *C. parvum*'s specific primer pairs (JVAF, JVAR primers, JVAP TaqMan prob and JVAGF, JVAGR primers, JVAGP2 prob, respectively) which amplifies to different size regions of partial 18S rRNA gene. Specific primers that amplifies 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* species were used in the nested PCR analyses. According to results detected by real time PCR analyses, *Cryptosporidium* spp. were found to be positive in 31 (20.7%) samples, which were 23 (15.3%) *C. parvum* and 8 (5.3%) *Cryptosporidium* spp. Whereas 29 (19.3%) out of examined samples were found to be positive by nested PCR analyses. Real time PCR was used as a gold test in the determination of the sensitivity and specificity of the tests. Sensitivity and specificity of nested PCR technique were determined as 93.5% and 100% when comparing with the gold test real time PCR and the compatibility between two techniques was found to be 95.8%. The highest rate of cryptosporidiosis was determined in 1-2 months old calves with a ratio of 23.2% and this was followed by 0-1 and 2-3 months old calves with the ratios of 19.3% and 16.7%, respectively. The infection was found as 21.5% in male and 19.7% in female calves. The occurrence of infection in Holstein, Simental and Montofon breeds was found as 32.6%, 25% and 11.1%, respectively. This study was the first investigation of bovine cryptosporidiosis by real time PCR technique in Turkey. Besides *Cryptosporidium* genus and *C. parvum* positivities were determined simultaneously for the first time in Turkey.

**Key Words:** Calf, *Cryptosporidium* spp., diarrhea, nested PCR, real time PCR

Geliş Tarihi/Submission Date : 06.02.2012

Kabul Tarihi/Accepted Date : 23.05.2012

\* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSY-10-3337 kod numarası ile desteklenen "Nevşehir Yöresindeki İshallerli Buzağlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Karakterizasyonu" başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

### Giriş

Son yüzyılın en önemli hastalıklarından biri olan cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* soyuna bağlı protozoonlar tarafından oluşturulan ve genellikle ruminantların neonatal döneminde görülen zoonotik bir enfeksiyondur. *Cryptosporidium* türleri,

Apicomplexa kök altında yer alan zoonotik karakterli, monoxen parazitlerdir. İnsan dahil birçok memeli, kanatlı ve sürüngende sindirim sistemi epitel hücrelerinde lokalize olan bu parazitler özellikle genç ve immun sistemi baskılanmış hayvanlarda enfeksiyona neden olmaktadır (18, 21). Günümüze kadar yaklaşık 30 *Cryptosporidium* türü sınıflandırılmış olmasına karşın sığırlar, genellikle *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* ve önceden *Cryptosporidium* deer-like genotipi olarak bilinen *C. ryanae* ile enfekte olmaktadır (34). Bu türlerden *C. andersoni* her yaşta sığırlarda görülebilirken, *C. parvum* genellikle 2 aylıktan küçük buzağılarda, *C. bovis* ve *C. ryanae* ise 2-11 aylık buzağılarda enfeksiyona neden olmaktadır. *C. parvum*'un yol açtığı enfeksiyonlarda genellikle sulu ishal görülürken diğer 3 türde klinik semptomlar çok nadir görülmekte ya da görülmemektedir (10, 26).

Zoonotik karakterli olan cryptosporidiosis; Türkiye'nin de içinde bulunduğu tropik ve subtropik ülkelerde sığır yetiştiriciliğini tehdit eden ve büyük ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır. Bu hastalık, özellikle iki haftalık buzağılarda immun sistemin zayıf olması ile birlikte ölümcül seyredebilmektedir (6, 11).

Türkiye'de bu enfeksiyonun yaygınlığı üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel yöntemlerle yapıldığı, moleküler çalışmaların ise çok sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Hastalığın erken dönemde doğru teşhisi, meydana gelecek kayıpların önüne geçilmesinde oldukça önem arz etmektedir. Bu açıdan klasik yöntemlere göre daha özgül ve duyarlı olan moleküler tanı yöntemleri cryptosporidiosis'in spesifik teşhisinde ve tür, alttür veya suşların ortaya konmasında günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (21, 25, 30).

Bu çalışma, Nevşehir Yöresinde ishali buzağılarda cryptosporidiosis'in real time PCR ve nested PCR teknikleri ile karşılaştırılması olarak saptanması amacıyla yapılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Araştırma Sahası, Hayvanların Belirlenmesi ve Dışkı Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma, 2010-2011 yılları arasında Nevşehir'in farklı ilçe ve köylerindeki Holştayn, Montofon ve Simental ırklarına ait toplam 150 baş 1-3 aylık ishali buzağı üzerinde yürütülmüştür. Dışkıların toplanmasında büyük baş yetiştiriciliği yapılan barınaklarda yeni doğan veya 3 aya kadar olan buzağıların varlığı ve ishal görülüp görülmediği araştırılmıştır. Buzağılar arasında ishal belirtileri gösterenler araştırmaya dahil edilmiştir. Örneklenen

buzağıların rektumundan tekniğine uygun olarak dışkı örnekleri alınmış ve steril dışkı kaplarına konulmuştur. Örneklerin alımı sırasında herhangi bir kontaminasyona sebep vermemek için titiz ve tekniğine uygun olarak çalışılmış ve her örnek alımdan sonra eldivenler değiştirilmiştir. Dışkı kaplarına protokol numaraları verilmiş, örnek alınan buzağıların yaş, ırk ve cinsiyetleri kayıt altına alınmıştır. Toplanan örnekler laboratuvarında -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

### Genomik DNA İzolasyonu

Dışkı örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden genomik DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazında (Bioneer Exiprep™ 16) yapılmıştır. Final elüsyon 50 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüş ve en uygun konsantrasyonlar moleküler analizler öncesi hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Genomik DNA ekstraktları, *Cryptosporidium* soy ve *C. parvum* tür spesifik primer ve prob olarak real time PCR'da eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. Bu amaçla TaqMan prob bazlı QPCR'da Brilliant II Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, CA) kullanılmıştır. Real time PCR analizinde 18S rRNA (ribozomal RNA) gen bölgesini amplifiye eden ve bağlanan spesifik primer ve prob olarak seçilmiştir (Tablo 1) (15).

### Nested PCR

Nested PCR tekniğinin birinci basamağında genomik DNA ekstraktları, *Cryptosporidium* türlerinin 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden 18SiCF2 (5'- GAC ATA TCA TTC AAG TTT CTG ACC-3') ve 18SiCR2 (5'-CTG AAG GAG TAA GGA ACA ACC- 3') primerleri ile analize tabi tutulmuştur. İkinci PCR basamağında ise 18SiCF1 (5'- CCT ATC AGC TTT AGA CGG TAG G- 3') ve 18 SiCR1 (5'- TCT AAG AAT TTC ACC TCT GAC TG- 3') primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12.5 pmol her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 0.5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. Birinci PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, ikinci PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR için de initial denaturation: 94 °C'de 5 dk; 45

**Tablo 1:** *Cryptosporidium* soy ve *C. parvum* için real time PCR'da kullanılan primer ve problar

Primer Adı	Primer Dizilimi (5'---3')	TM* (°C)
<i>Cryptosporidium</i> spp.		
JVAF	ATGACGGGTAACGGGGAAT	56.7
JVAR	CCAATTACAAAACCAAAAAGTCC	55.3
JVAP18S	Cy5- CGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATG –BHQ2	67.8
<i>C. parvum</i>		
JVAGF	ACTTTTTGTTTGTTCACGCCG	54.7
JVAGR	AATGTGGTAGTTGCGGTTGAA	55.9
JVAGP2	FAM-ATTTATCTCTTCGTAGCGGCG-BHQ	57.9

\* Erime sıcaklığı

siklus, denaturation: 94 °C'de 30s, annealing: 58 °C'de 30s, extension: 72 °C'de 30 s; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (23).

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.

### **İstatistiksel Analiz**

Araştırmada kullanılan nested PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllük değerleri real time PCR testi, altın standart test alınarak ilgili formüllere göre hesaplanmıştır (16). Buzağılarda cryptosporidiosis'in yayılışında cinsiyet, yaş ve ırkın etkisi Ki-Kare (Pearson's Chi Square) testi ile değerlendirilmiştir.

### **Bulgular**

Real time PCR ile moleküler analizi yapılan 150 buzağıdan 31'i (%20.7) cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin 23'ünde (%15.3) *C. parvum*, 8'inde (%5.3) ise *Cryptosporidium* spp. pozitifliği belirlenmiştir. *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. belirlenen bazı örneklerin TaqMan prob tabanlı real time PCR'da 18S rRNA genini amplifiye eden spesifik primer ve problarla analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 1'de verilmiştir. Nested PCR sonuçlarına göre ise örneklerin 29'unda (%19.3) *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonu saptanmıştır. Nested PCR'da pozitif saptanan tüm örnekler real time

PCR'da da pozitif bulunmuştur. Nested PCR analizi sonucu pozitif belirlenen örnekler için amplikonların agaroz jeldeki görünüşleri Şekil 2'de verilmiştir. Real time PCR tekniği altın standart test kabul edilerek nested PCR tekniğinin duyarlılığı % 93.5 ve özgüllüğü ise %100 olarak belirlenmiş, iki teknik arasında Kappa uyumluluk testine göre % 95.8 uyum bulunmuştur (Tablo 2).

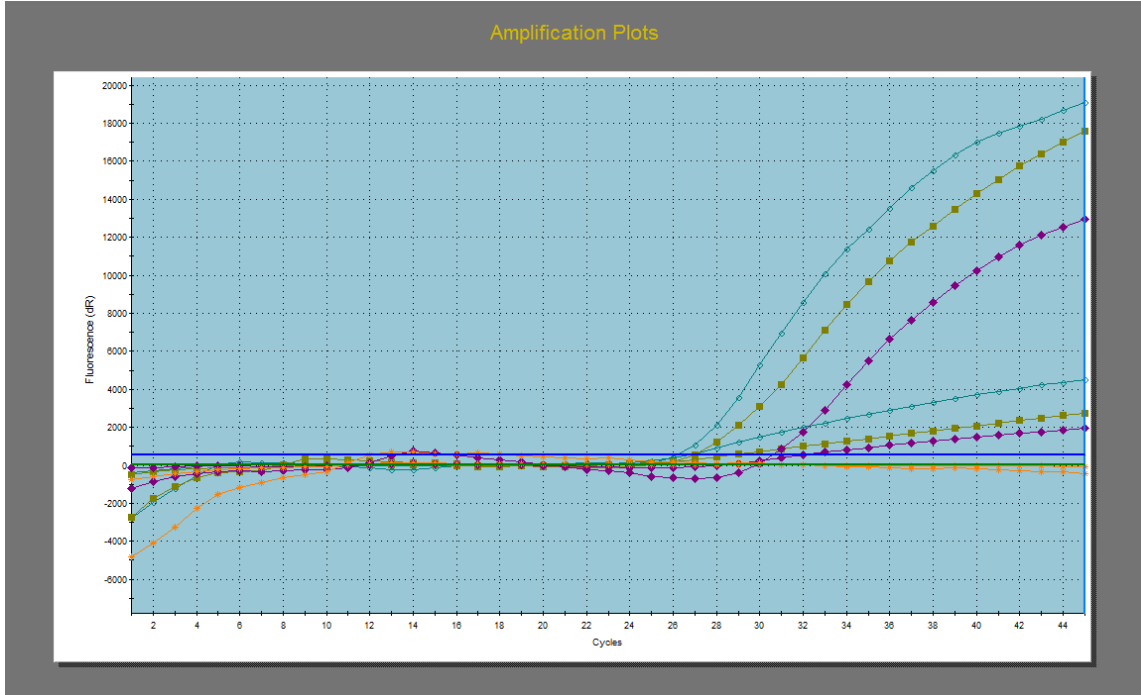
İncelemesi yapılan buzağılarda cryptosporidiosis insidensinin yaş, cinsiyet ve ırka göre dağılımı Tablo 3'de verilmiştir. Cryptosporidiosis'in yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde en yüksek %23.2 ile 1-2 aylık buzağılarda olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla %19.3 ve %16.7 ile 0-1 ve 2-3 aylık buzağılar izlemiştir. Yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Enfeksiyonun erkek buzağılarda %21.5, dişilerde ise %19.7 olduğu görülmüş olup farklılık, istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Cryptosporidiosis'in Holştayn, Simental ve Montofon ırklarında sırasıyla %32.6, %25 ve %11.1 yaygın olduğu görülmüştür. Montofon ile Holştayn ırkları arasındaki istatistiksel farklılık önemli bulunurken ( $p<0.05$ ), Simental ve diğer iki ırk arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

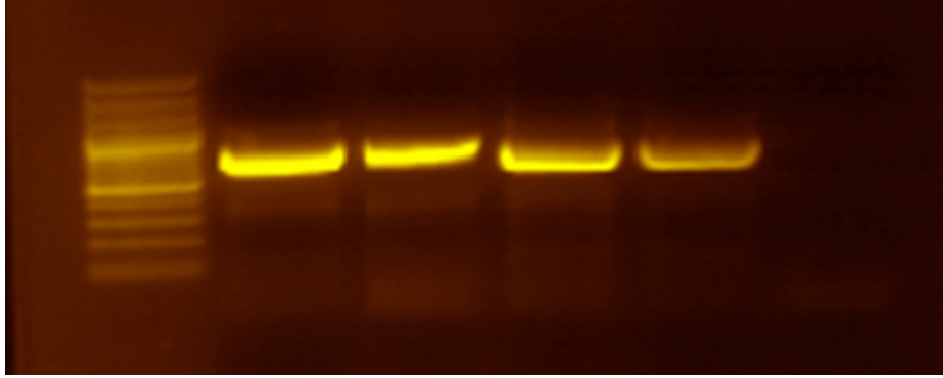
### **Tartışma ve Sonuç**

Yapılan moleküler çalışmalar, cryptosporidiosis'in sığırlarda oldukça yaygın olduğunu göstermektedir (35). Dünya'da buzağılarda cryptosporidiosis ile ilgili çalışmalara 1970'li yıllarda başlanmasına karşın (11) Türkiye'de bu protozoonun ookistleri buzağılarda ilk olarak 1984 yılında bildirilmiştir (3).

**Tablo 2:** . Nested PCR tekniğinin altın standart real time PCR tekniğine göre duyarlılığı ve özgüllüğü ile iki teknik arasındaki Kappa uyumluluk oranı

Real Time PCR (Altın Standart)			Özgün Oranlar	Özgün Oranlara Ait %95 Güven Aralığı
Nested PCR	Pozitif (+)	29	Duyarlılık: 0.93	(0.79-0.98)
	Negatif (-)	2	Özgüllük: 1.00	(0.97-1.00)
			Kappa Değeri (K): 0.958	

**Şekil 1:** *Cryptosporidium* spp. ve *C. parvum* pozitif saptanan örneklerin TaqMan real time PCR da eş zamanlı analizleri sonucu belirlenen amplifikasyon grafikleri a,b,c: *C. parvum* , a<sup>1</sup>,b<sup>1</sup>,c<sup>1</sup>, *Cryptosporidium* spp.



**Şekil 2:** *Cryptosporidium* türlerinin parsiyel 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden 18SiCF2 ve 18SiCR2 primerleri ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1,2,3: Pozitif örnekler; 4: Pozitif kontrol; 5: Negatif kontrol

**Tablo 3:** Buzağılarda cryptosporidiosis prevalansının yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte sığır		P
		Sayısı	%'si	
<b>Yaş grupları (ay)</b>				
0-1	88	17	19.3	p>0.05
1-2	56	13	23.2	
2-3	6	1	16.7	
<b>Cinsiyet</b>				
Erkek	79	17	21.5	p>0.05
Dişi	71	14	19.7	
<b>İrk</b>				
Simental	32	8	25.0 <sup>ab</sup>	p<0.05
Holştayn	46	15	32.6 <sup>a</sup>	
Montofon	72	8	11.1 <sup>b</sup>	
Toplam	150	31	20.7	

<sup>a,b</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemlidir.

Daha sonra yapılan çalışmalarda (5, 11, 22, 33) cryptosporidiosis'in buzağı, kuzu ve oğlak gibi genç hayvanlarda ciddi sorunlara neden olduğu kaydedilmiş ve bu hastalığın görülmesinde sürü büyüklüğü, yetiştirme tipi, doğum zamanı ve süttten kesme gibi risk faktörlerinin etkili olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de günümüze kadar sığırlarda cryptosporidiosis üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel parazitolojik yöntemlerle yapıldığı görülmekte olup moleküler çalışmaların sayısının çok sınırlıdır. Değişik coğrafi yapı ve mevsime ait farklı bölgelerde konvansiyonel yöntemlerle yapılan mikroskopik çalışmalarda buzağılarda *Cryptosporidium* spp. ookitlerine Karacabey harasında %26.7 (3), Elazığ'da %7.2 (19), Aydın'da %10.7 (20), Kars'ta %25.7-%38.8 (2, 28), %32.9 (1); Konya'da %27.33 (6); Sivas'ta %70.3 (8), Ankara'da %35.8 (24), Hakkari'de %22.14 (12); Van'da %13.2 (13) ve Erzurum'da %22.8 (27) oranında rastlanılmıştır.

Türkiye'de sığırlarda yapılan sınırlı bazı moleküler çalışmalarda (9) nested PCR ile *Cryptosporidium* spp. varlığı belirlenmiş ancak tür ve/veya genotip ayrımı yapılmamıştır. Diğer yandan *C. parvum* tip 1 ve tip 2 genotiplerinin, spesifik real time PCR ve PCR-RFLP teknikleri ile dünyanın farklı bölgelerinden insan ve buzağılardan elde edilmiş izolatlar ile deneysel laboratuvar izolatlarında araştırıldığı bir çalışmada (31), Kars ilindeki buzağılardan elde edilmiş 15 izolatin her iki teknik ile de tip 2 genotipi olduğu ortaya konmuştur. *C. parvum*'un Kars'ta buzağılardan izole edilmiş 15 izolat ile İsrail'de yine buzağılardan izole edilmiş 61 izolatta multiple polymorphic genetik markerlar kullanarak genotiplerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada (32), iki popülasyon sığır yetiştiriciliğinin parazit popülasyonunun yapısı üzerine etkisi yönünden karşılaştırılmıştır. Kars yöresinde daha çok ticarete dayalı olarak çiftlikler arasında sık hayvan nakilleri olmasının parazit popülasyonlarının yayılmasına yol açtığı, bu durumun İsrail'de ise bulunmadığı kaydedilmiştir. Aynı çalışmada (32), her iki ülke için farklı multilokus genotiplerinin bireysel olarak işletmelerle sınırlı kaldığı belirlenmiş, çiftlik başına düşen genotip ve mikst izolat sayısının Türkiye'de daha yaygın olduğu saptanmıştır.

Türkiye'de cryptosporidiosis üzerine yapılan diğer bazı moleküler çalışmalarda Sungur ve ark. (30), hastanelere ishal şikayeti ile başvuran 18 çocuk ve yine ishal tablosuna sahip olan 27 buzağı dışkı örnekleri üzerine toplam 45 örneği nested PCR ile incelemişler, buzağı dışkılarının 8'inde (%29.7), çocuk dışkılarının 1'inde (%5.6) olmak üzere toplam 9 (%20) örnekte *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptamışlardır. Cryptosporidiosis tanısında taze ve formaldehitte saklanmış dışkı örneklerinde PCR

yönteminin etkinliğini araştırmak amacıyla yapılan diğer bir çalışmada (9) Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniğine başvuran ve dışkı incelemeleri sonucunda, *Cryptosporidium* spp. ookitleri saptanan 22 hastaya ait 23'ü taze, 10 tanesi ise %10 formaldehit içinde saklanmış toplam 33 dışkı örneği nested PCR yöntemi ile incelenmiş ve bu yöntemin taze dışkılarda duyarlılık ve özgüllüğü %100, formaldehitli dışkılarda ise duyarlılık %50 olarak belirlenmiştir. Ankara'nın değişik hastanelerine ishal şikayeti ile başvuran 98 hastadan ve yine Ankara'da bulunan değişik sığırcılık işletmelerindeki 32 buzağıdan alınan toplam 130 dışkı örneğinin nested PCR ile incelendiği bir çalışmada (25) sonucu, buzağılarda %37.5 insanlarda ise %1.02 oranında *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptanmıştır. Mevcut çalışmada ise moleküler inceleme yapılan 150 buzağının %20.7'si cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur. Real time PCR tekniği ile pozitif belirlenen örneklerde *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisi yapılmıştır. *C. parvum* oranı %15.3, *Cryptosporidium* spp. oranı ise %5.3 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar araştırma yöresinde yaygınlık gösteren türün *C. parvum* olduğunu ortaya koymuştur. Cryptosporidiosis için saptanan bu oran, Sungur ve ark.'nın (30) sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Son yıllarda cryptosporidiosis'in tür spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlayan ribozomal ve mitokondriyal çeşitli gen bölgelerini hedef alarak spesifik primer ve proplar ile real time PCR araştırmaları yapılmaktadır. Real time PCR tekniği; hızı, yüksek duyarlılık ve özgüllük, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi dolayısıyla paraziteminin ortaya konması ve buna bağlı tedavi etkinliğinin takibine olanak sağlaması gibi üstün özelliklere sahiptir. Ayrıca özellikle miks enfeksiyonlarda farklı türlerin eş zamanlı teşhisine olanak sağlaması, otomasyona uygun olması ve kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması gibi avantajlarla da konvansiyonel PCR, nested PCR ve antijen veya monoklonal antikor tabanlı ELISA gibi çeşitli tekniklere göre üstün bir teknik olarak kullanılmaktadır (4, 14, 15).

Bunun birlikte Real time PCR tekniğinin, sahip olduğu yüksek duyarlılık ve özgüllük yanında, eş zamanlı hızlı teşhise ve kantitasyona olanak sağlaması ve paraziteminin belirlenebilmesi, dolayısıyla tedavi etkinliğinin takibi ve kontaminasyon riskinin minimize olması gibi avantajlara sahip olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada da söz konusu avantajları nedeniyle araştırma yöresinde ishalleri buzağılarda cryptosporidiosis durumunu net olarak ortaya koyabilmek amacıyla *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. için 18S rRNA gen bölgesini hedef alan spesifik primer ve probler kullanılmış ve real time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu teknik ile eş zamanlı olarak *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. pozitiflikleri spesifik bir şekilde ortaya konmuştur. Ct (dR) değerleri de belirlenerek örneklerdeki parazitemi hakkında veriler elde edilmiştir. Bununla beraber real time PCR'da pozitif belirlenen ve Ct (dR) değerleri yüksek olan ( $\geq 40$ ) iki örneğin nested PCR analizleri sonrası, agaroz jel üzerinde amplifikasyonu tespit edilememiştir. Her iki tekniğin de cryptosporidiosis'in teşhisinde %100 özgüllüğe sahip olduğu belirlenmesine karşın özellikle parazitemisi düşük olan rezervuarların ortaya konabilmesinde real time PCR tekniğinin çok daha duyarlı bir yöntem olduğu görülmüştür.

Cryptosporidiosis'in epidemiyolojisinde risk faktörlerinin başında konak yaşı gelmektedir. Cryptosporidiosis'in görülme sıklığının buzağı, kuzu ve oğlakların kalabalık olarak barındırıldığı işletmelerde yüksektir. Özellikle bir ayla kadar olan buzağılarda klinik tablo şekillenmektedir. Cryptosporidiosis'e en yaygın olarak 1-3 haftalık genç hayvanlarda rastlanıldığı daha sonraki yaşlarda *Cryptosporidium* spp. oocistlerine rastlanma oranının yaşla ters orantılı olarak düştüğü rapor edilmiştir (2, 7, 17, 29). Bu çalışmada ise en yüksek oran %23.2 ile 1-2 aylık buzağılarda belirlenmiş olup bunu sırasıyla %19.3 ve %16.7 ile 0-1 ve 2-3 aylık buzağılar izlemiştir. Yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Bunun yanında enfeksiyonun erkek buzağılarda %21.5, dişilerde ise %19.7 olduğu görülmüş ancak bu farklılığın da istatistiksel açıdan önemsiz olduğu saptanmıştır ( $p>0.05$ ). Cryptosporidiosis'in ırka göre dağılımında en yüksek oran %32.6 ile Holştayn ırkında belirlenmiştir. Bunu %25 ile Simental ve %11.1 ile Montofon ırkları izlemiştir. Montofon ile Holştayn ırkı arasındaki istatistiksel farklılık önemi bulunurken ( $p<0.05$ ), Simental ve diğer iki ırk arasında enfeksiyonun görülmesi açısından istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ortaya çıkan bu durum, işletme yönetiminden ve örnekleme dağılımından ileri gelmiş olabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada, Türkiye'de sığırlarda cryptosporidiosis real time PCR tekniği ile ilk kez araştırılmış ve Nevşehir yöresinde ishalleri buzağılarda cryptosporidiosis'in görülme sıklığı moleküler olarak saptanmıştır. Araştırmada Türkiye'de ilk kez

*Cryptosporidium* soy ve *C. parvum* pozitifliği eş zamanlı olarak ortaya konmuştur. Real time PCR tekniğinin özellikle moleküler epidemiyolojik çalışmalarda ve rezervuarların belirlenmesinde sahip olduğu avantajlarla öne çıktığı görülmüştür. Bu çalışma, Türkiye'de sığır cryptosporidiosis'inin moleküler epidemiyolojisi ve hastalıktan sorumlu türler ve genotipler üzerine yapılacak diğer çalışmalara da model oluşturacaktır.

### Teşekkür

Araştırmacılar, bu çalışmaya, TSY-10-3337 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder.

### Kaynaklar

1. Arslan MÖ, Erdoğan HM, Tanrıverdi S. Neonatal buzağılarda cryptosporidiosis'in epidemiyolojisi. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı, SB6-01, Konya 2003; s. 186.
2. Arslan MÖ, Gıcık Y, Erdoğan HM, Sarı B. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in diarrhoeic calves in Kars province Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2001; 25: 161-64.
3. Burgu A. Türkiye'de buzağılarda *Cryptosporidium*'ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1984; 31(3): 573-85.
4. Calderaro A, Montecchini S, Gorrini C, Dettori G, Chezzi C. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of *Cryptosporidium* spp. in a low-prevalence setting. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70 (1):72-7.
5. Castro-Hermida JA, Gonzales-Losada YA, Ares-Mazas E. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet Parasitol 2002; 106: 1-10.
6. Çeliksöz A, Çelik S. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde gastroenteritli ve malnütrisyonlu hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırması. T Parazitol Derg 2003; 27: 85-8.
7. Çitil M, Arslan MÖ, Güneş V, Erdoğan HM. Neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria* enfeksiyonlarının rolü. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2004; 10(1): 59-64.
8. Değerli S, Çeliksöz A, Kalkan K, Özçelik S. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves in Sivas. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 995-9.

9. Dirim Erdoğan D, Dağci H, Turgay N, Akarca US, Alkan MZ. The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples. *Turkiye Parazitol Derg* 2009; 33(2): 120-4.
10. Fayer R, Santín M, Trout JM: *Cryptosporidium ryanaen* sp. (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol* 2008; 156: 191-8.
11. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004; 126: 37-56.
12. Göz Y, Gül A, Aydın A. Hakkari yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium* sp.'nin yaygınlığı. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007; 18 (2): 37-40.
13. Gül A, Çiçek M, Kılıncı Ö. Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van Province. *T Parazitol Derg* 2008; 32(3): 202-4.
14. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR *J Clin Microbiol* 2011; 49(3): 918-24.
15. Jothikumar N, da Silva AJ, Moura I, Qvarnstrom Y, Hill VR. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 9):1099-105.
16. Lalkhen AG, McCluskey A. Clinical tests: sensitivity and specificity. *Critical Care & Pain* 2008; 8(6): 221-3
17. Maldonado-Camargo S, Atwill ER, Saltijeral-Oaxaca JA, Herrera-Alonso LC. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holştayn Freisian dairy calves in central Mexico. *Prev Vet Med* 1998; 36: 95-107.
18. Ondrácková Z, Kvác M, Sak B, Kvetonová D, Rost M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2): 141-4.
19. Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E. Elazığ yöresinde buzağı ve kuzularda bulunan *Cryptosporidium*'un yayılışı üzerinde araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci* 1990; 14: 439-45.
20. Özlem MB, Eren H, Kaya O. Aydın yöresi buzağılarda *Cryptosporidium*'ların varlığının araştırılması. *Bornova Vet Kont Araş Enst Derg* 1997; 22: 15-22.
21. Paul S, Chandra D, Tewari AK, Banerjee PS, Ray DD, Boral R, Rao JR. Comparative evaluation and economic assessment of coprological diagnostic methods and PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in bovines. *Vet Parasitol* 2009; 164(2-4): 291-5.
22. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. Review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection* 2004; 6: 773-85.
23. Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69 (7): 4302-7.
24. Sahal M, Karaer Z, Yasa Duru S, Cizmeci S, Tanyel B. Cryptosporidiosis in newborn calves in Ankara region: clinical, haematological findings and treatment with Lasalocid-NA. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2005; 112 (6): 203-8.
25. Sakarya Y, Kar S, Tanyuksel M. Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and calves through Nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16 (6): 977-80.
26. Santín M, Trout JM. *Livestock*. In: Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton FL, CRC Press 2007; 451- 83.
27. Sari B, Aktaş MS, Arslan MO. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in calves in Erzurum province. *T Parazitol Derg* 2008; 32(2): 116-9.
28. Sari B, Arslan MO, Gıcık Y, Kara M, Taşçı GT. The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(5): 819-26.
29. Sevinç F, Irmak K, Sevinç M. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoeic and nondiarrhoeic calves. *Revue Med Vet* 2003; 154(5): 357-61.
30. Sungur T, Kar S, Güven E, Aktaş M, Karaer Z, Vatansever Z. Detection of *Cryptosporidium* spp. in feces with nested PCR and carbol fuchsin staining method. *T Parazitol Derg* 2008; 32(4): 305-8.



31. Tanrıverdi S, Arslan MÖ, Akiyoshi DE, Tzipori S, Widmer G. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. Mol Biochem Parasitol 2003; 130(1): 13-22.
32. Tanrıverdi S, Markovics A, Arslan MÖ, Gök A, Shkap V, Widmer G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. Appl Environ Microbiol 2006; 72(4): 2507-13.
33. Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijawi NS. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Adv Parasitol 2005; 59: 77-158.
34. Xiao L, Feng Y: Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS Immunol. Med Microbiol 2008; 52: 309-23.
35. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp Parasitol 2010; 124: 80-9.

**Yazışma Adresi :**

Prof. Dr. Abdullah İNCİ  
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Parazitoloji Anabilim Dalı  
Tel: 0352 2076666/29940  
E-mail: ainci@erciyes.edu.tr