

Van Yöresindeki Koyunlarda *Enterocytozoon bieneusi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu

Molecular Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Sheep in the Van Region

© Muhammet Hasan Apaydın, © Gamze Yetişmiş, © Faruk Karabulut, © Alparslan Yıldırım

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Cite this article as: Apaydın MH, Yetişmiş G, Karabulut F, Yıldırım A. Molecular Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Sheep in the Van Region. Türkiye Parazit Derg 2023;47(2):64-70.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Van yöresinde sağlıklı görünümlü koyunlarda *Enterocytozoon bieneusi*'nin yaygınlığının moleküler yöntemlerle araştırılması ve saptanan izolatların genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Mayıs-Eylül 2021 tarihleri arasında Van yöresindeki çeşitli işletmelerden 38'i erkek 162'si dişi, 32'si süt emen, 38'i süttten kesilmiş kuzu ve 130'u da ergin olmak üzere toplam 200 Akkaraman ırkı koyun çalışmaya dahil edilmiştir. Koyunlardan toplanan dışkı örneklerinden ticari kitler ile genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen gDNA izolatlarında *E. bieneusi* DNA'sı ITS rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler yardımıyla Nested polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi ile araştırılmıştır. Pozitif belirlenen izolatlarla ait PZR ürünleri *E. bieneusi*'nin genotiplendirmesi ve filogenetik analizleri için sekans analize tabii tutulmuştur.

Bulgular: İncelenen 200 koyuna ait dışkı gDNA örneklerinin toplam 16'sında (%8,0) Nested PZR ile *E. bieneusi* DNA'sı belirlenmiştir. *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %18,8 ile süt emen kuzularda saptanmış bunu %10,5 ile süttten kesilmiş kuzular ve %4,6 ile de ergin koyunlar takip etmiştir. Enfeksiyonun yaygınlığı erkeklerde %7,9 dişilerde ise %9,3 olarak tespit edilmiştir. Sekans ve filogenetik analizler çalışmada belirlenen izolatların BEB6 genotipine ait olduğunu, Türkiye ve çeşitli ülkelerde farklı konaklardaki BEB6 izolatlarıyla birlikte kümelenerek *E. bieneusi* genogrup 2'de yer aldığını ortaya koymuştur.

Sonuç: Bu çalışma ile Türkiye'de koyunlarda *E. bieneusi* enfeksiyonlarının yaygınlığı üzerine moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiş olup araştırma yöresinde yaygın genotipin BEB6 olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar *E. bieneusi*'nin koyunlarda moleküler epidemiyolojisi ve çeşitliliğine katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Enterocytozoon bieneusi*, moleküler prevalans, filogenetik karakterizasyon, koyun, Van

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to determine the prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in healthy sheep in Van province using molecular techniques and to reveal genotypes of the detected isolates.

Methods: A total of 200 healthy appearance sheep comprise 38 male and 162 female, 32 preweaned, 38 postweaned lamb and 130 adult sheep from several farms in the Van region were included in the study between May and September 2021. Genomic DNA (gDNA) extractions were utilized on fecal samples collected from sheep by commercial kits, and *E. bieneusi* DNA was investigated by Nested polymerase chain reaction (PCR) amplifying ITS rRNA in the gDNA isolates. PCR products of the positive isolates were subjected to sequence analyze for genotyping and phylogenetic analyses of *E. bieneusi*.

Results: *E. bieneusi* DNA was determined in 16 out of 200 examined sheep fecal gDNA samples (8.0%) by Nested PCR. The highest *E. bieneusi* prevalence was determined in preweaned lambs with a rate of 18.8%. This was followed by postweaned lambs and adult sheep with a prevalence of 10.5% and 4.6%, respectively. The prevalence of the infection in males and females was 7.9% and 9.3%, respectively. All the ITS rRNA amplicons from 16 positive isolates were subjected to sequence analyses for genotyping and phylogenetic analyses. Sequence analyses revealed that all the isolates determined in sheep belonged to the BEB6 genotype and clustered in genogroup 2 of *E. bieneusi* with the BEB6 isolates from different hosts in several countries.

Conclusion: Molecular epidemiological data on the prevalence of *E. bieneusi* in sheep in Turkey were obtained with this study and the common genotype was determined as BEB6 in the research area. The obtained data contribute to the molecular epidemiology and diversity of *E. bieneusi* in sheep.

Keywords: *Enterocytozoon bieneusi*, molecular prevalence, phylogenetic characterization, sheep, Van

Geliş Tarihi/Received: 15.07.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 17.10.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Alparslan Yıldırım, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Tel/Phone: +90 352 207 66 66 **E-Posta/E-mail:** yildirima@erciyes.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-9868-0363

©Telif hakkı 2023 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC-ND) 4.0 International License.

GİRİŞ

Enterocytozoon bienersi (*E. bienersi*) insan ve hayvanlarda bağırsak hastalığına yol açan mikrosporlu bir organizmadır. Zorunlu hücre içi bir patojen olan *E. bienersi*, tipik olarak ağır veya kronik ishal, malabsorbsiyon ve halsizliğe yol açar. Güncel olarak *E. bienersi* mantarlar içinde sınıflandırılmakta olup, kesin sınıflandırılması halen tartışmalıdır (1). *E. bienersi* insandan insana ve/veya hayvanlardan insanlara bulaşabilmektedir. Bulaşma genellikle *E. bienersi* sporları ile kontamine su, çevre, gıdaların alınması veya enfekte bireylerle temas sonucu fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Buna ilaveten, *E. bienersi* ayrıca rekreasyonel ve şebeke sularıyla birlikte sanitasyona tabii doğal ve atık sularda da bulunmuştur (1). Epidemiyolojik araştırmalar, *E. bienersi*'nin ekosistemde oldukça yaygın olduğunu ve çevresel kaynaklar ile farklı konaklardan izole edilen jenerasyonlarının yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermiştir (1,2). *E. bienersi*'nin bu denli yaygın olması farklı konak spektrumuna sahip çeşitli genotiplerin evrimine ve yine çok çeşitli ekolojik ortamlara parazitin adaptasyonuna yol açmıştır. Bu durum özellikle parazitlerin ekosistemdeki kaynaklarının ve halk sağlığı açısından oluşturduğu riskin değerlendirilmesinde zorluklara yol açmaktadır. Bu açıdan farklı konaklarda yerleşim gösteren *E. bienersi*'nin genotipik yapısının belirlenmesi önem arz etmektedir (1). *E. bienersi* genotipleri, genellikle nükleer ribozomal DNA'nın internal transcribed spacer bölgesinin (ITS) polimeraz zincir reaksiyon (PZR)-sekans analizleriyle teşhis edilmekte ve sınıflandırılmaktadır (3). Günümüze kadar 40'in üzerinde ülkeden çeşitli memeli takımları, sürüngenler ve böcekler de dahil yaklaşık 170 hayvan türünde 600'e yakın farklı *E. bienersi* genotipi teşhis edilmiştir (1). Bu genotiplerin ITS gen bölgesi nükleotid sekans varyasyonlarına göre şu ana kadar 11 genogrup içerisinde kümelendiği tespit edilmiştir. Farklı gruplardaki *E. bienersi* genotiplerinin değişen derecelerde konak spesifitesi sergilediği bilinmektedir (4). Genogrup 1, insan dahil olmak üzere çeşitli konaklardan izole edilen genotiplerin büyük çoğunluğunu oluşturan en geniş genogrup olup zoonotik grup olarak da nitelenmektedir. Genogrup 2'nin ruminantlara özgü genotiplerden oluştuğu düşünülse de yapılan yeni çalışmalarda I, J, BEB4 ve BEB6 gibi genotiplerin insanlarda da bulunduğu bildirilmiştir (4,5). Genogrup 3-11'in konak spesifik gruplar olduğu ve ilgili konakların yanı sıra atık sularda da bulunabildiği kaydedilmiştir (4). Günümüze kadar koyunlarda tespit edilen tüm *E. bienersi* genotiplerinin genogrup 1, 2 ve 7'de bulunduğu tespit edilmiştir (4). Bu yönüyle de koyunların *E. bienersi*'nin zoonotik bulaşma dinamikleri içerisinde önemli bir konak olabileceği vurgulanmaktadır (3,4).

E. bienersi'nin rezervuar konakları, bazı omurgasız vektörler de dahil olmak üzere aynı veya farklı türlerin ekolojik olarak bağlantılı birkaç popülasyonundan oluşur. *E. bienersi* bu konaklar arasında birbirlerine bulaşma suretiyle sürekliliğini sağlayabilir. Hem evcil hem de vahşi hayvanlar *E. bienersi* için rezervuar konak olabilir ve birçok hayvan türü potansiyel olarak zoonotik ve konak spesifik *E. bienersi* genotipleri ile enfekte olabilir (1,2). *E. bienersi* enfeksiyonları araştırılan konak türlerinde sıklıkla asemptomatik seyrederek, ancak diyare ile karakterize klinik hastalıklar da ortaya çıkabilir. Rezervuar konaklardaki bu subklinik enfeksiyonlar, *E. bienersi*'nin diğer rezervuar ve duyarlı konaklara yayılmasına neden olabilir. *E. bienersi* için güvenli ve etkili bir terapötik ajan veya aşı bulunmamaktadır. Bu açıdan parazitle mücadelede, tek sağlık kapsamında, enfekte ve duyarlı konaklar arasındaki yakın teması azaltılması ve hayvan dışkıları ile insan kanalizasyonunda

yaygın olarak bulunan *E. bienersi* sporlarının su ve gıdalara kontaminasyonunun engellenmesinin en etkin yaklaşım tarzı olduğu bilinmektedir (1).

Son 10 yıl içerisinde *E. bienersi*'nin epidemiyolojisi ve genotip çeşitliliği üzerine araştırmaların yoğunlaştığı görülmekle birlikte insan ve hayvan konaklarda organizmanın prevalansı, genotiplerin dağılımı ve bulaşma dinamikleri ile ilgili risk faktörleri üzerine halen birçok coğrafyada araştırma açığı bulunmaktadır (6).

Ülkemizde de son yıllarda *E. bienersi* üzerine çalışmaların artış gösterdiği dikkat çekmekte olup insan ve farklı hayvan türlerinde etken izole ve teşhis edilmiştir (3,7-12). Dünyada farklı coğrafyalarda yürütülen araştırmalarda koyunların *E. bienersi*'nin epidemiyolojisinde önemli konaklardan biri olduğu görülmektedir (13). İnsanlarda olduğu gibi koyunlarda da *E. bienersi* bağırsak mukozasında patolojik bozukluklara yol açarak malabsorbsiyon ve ishale seyreden, önemli verim kayıplarına yol açan hastalık tablosu oluşturabilir (14). Türkiye'de günümüze kadar koyunlarla ilgili olarak yalnızca koyun sütlerinde yapılan bir araştırma mevcut olup *E. bienersi*'nin koyun sütlerinde varlığı, yaygınlığı ve genotip profilleri gösterilmiştir (9). Bu çalışmada, Van yöresinde çeşitli çiftliklerdeki sağlıklı görünen Akkaraman ırkı koyunlarında *E. bienersi*'nin varlığı ve farklı yaş grupları ile cinsiyet bazında yaygınlıklarının araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada ayrıca tespit edilen *E. bienersi* izolatlarının sekans analizleri ile genotipleri araştırılmış ve filogenetik yapıları belirlenmiştir.

YÖNTEMLER

Araştırma Bölgesi, Hayvan Materyali ve Dışkı Örneklerinin Toplanması

Çalışma kapsamında, Mayıs-Eylül 2021 tarihleri arasında Van yöresinde Saray ilçesindeki üç, Özalp ilçesindeki iki ve Gürpınar, Gevaş ve Erciş ilçelerindeki birer işletme olmak üzere toplam sekiz koyunculuk işletmesinden 200 Akkaraman ırkı koyun (işletme başına 25 koyun) örneklenmiştir. Araştırmaya dahil edilen koyunların yaş ve cinsiyete göre dağılımları da Tablo 1'de verilmiştir. Örneklem yapılan işletmelerin yapısı genel özellikleri itibarıyla birbirine benzediği görülmüş olup, çiftliklerde aynı zamanda köpek ve kedilerle birlikte kümes hayvanlarının da bulunduğu ve merayı yöredeki büyükbaş hayvanlarla ortak kullandıkları dikkati çekmiştir. Diğer yandan işletmelerin organize olmuş su ve atık sistemlerinin bulunmadığı da görülmüştür.

Her bir koyundan dışkı örnekleri dışkılamayı takiben yere temas etmeyen yüzeyinden alınmış ve 15 mL'lik steril numune tüplerine aktarılmıştır. Dışkı örnekleri normal kıvamlı belirlenmiştir. Tüplere protokol numarası verilmiş ve hayvanlara ait bilgilerle birlikte kayıtları sağlanmıştır. Örnekler buz aküleri ile soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Örneklemeye dahil edilen koyunlarla ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Koyunlardan toplanan dışkı örneklerinden genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonu, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) ile kitin önerdiği protokol çerçevesinde yapılmıştır. Son basamakta 50 µL elüsyon buffer AE içerisinde gDNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA örnekleri, Qubit® Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazında işlenerek total gDNA miktarları (ng/µL) belirlenmiştir.

Tablo 1. Koyunlarda *E. bieneusi* pozitif örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımları ve istatistiksel analizleri

| Faktör | İncelenen hayvan sayısı | Pozitif hayvan | | χ^2 | P | |
|----------|---------------------------|----------------|----|-------------------|-------|-------|
| | | Sayı | % | | | |
| Yaş | Süt emen (≤ 3 ay) | 32 | 6 | 18,8 ^a | 7,377 | 0,025 |
| | Sütten kesilmiş (4-12 ay) | 38 | 4 | 10,5 ^a | | |
| | Ergin (> 12 ay) | 130 | 6 | 4,6 ^b | | |
| Cinsiyet | Erkek | 38 | 3 | 7,9 | 1,000 | 0,542 |
| | Dişi | 162 | 15 | 9,3 | | |

^{a,b}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir ($p < 0,05$)

Ribozomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Dışkı örneklerinden DNA izolasyonunu takiben elde edilen gDNA izolatları *E. bieneusi* DNA'sının ITS gen bölgesini spesifik olarak çoğaltan primerlerle Nested PZR ile analiz edilmiştir. Birinci PZR'de EBITS3 ve EBITS4, ikinci PZR'de ise EBITS1 ve EBITS2.4 primerleri (11) ile ITS bölgesini kapsayan yaklaşık 390 bp ribozomal bölge çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonları 25 μ L final konsantrasyon içinde 12,5 μ L hazır kullanımlık DreamTaq Green PZR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,4 μ M her bir primer ve 10-20 ng kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. İkinci PZR'de ilk PZR ürününden 1 μ L alınarak kalıp olarak kullanılmıştır. PZR protokolü, ilk PZR basamağı için 95 °C'de 4 dk; 35 siklus 95 °C'de 30 sn, 57 °C'de 30 sn, ve 72 °C'de 1 dk; 72 °C'de 10 dk; ikinci PZR basamağı için de 95 °C'de 4 dk; 30 siklus 95 °C'de 30 sn, 55 °C'de 30 sn, ve 72 °C'de 1 dk; 72 °C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır. PZR analizlerinde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı'ndaki referans microsporidia gDNA'ları pozitif kontrol, sterilize edilmiş deiyonize su ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. PZR analizleri sonrasında ürünlerin görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (BioRad, USA) kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin her birinden 10 μ L alınıp %5 SafeView™ Classic (Applied Biological Materials Inc., Canada) içeren %1,5'lik agaroz jele yüklenerek, yatay elektroforez sisteminde 90 V'de 50 dk yürütülmüştür. Elektroforezden sonra PZR ürünleri CLP Jel Dokümantasyon Sisteminde (UVP INC Upland, CA, USA) görüntülenmiş ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA, USA) ile analiz edilmiştir.

Ribozomal ITS Gen Bölgesinin Sekans Analizleri

E. bieneusi pozitif örnekler için izolatların PZR analizleri sonrası ribozomal ITS ampikonları jelden pürifiye edilerek (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, USA) sekans analizleri için hazır hale getirilmiştir. Sekans analizleri, ikinci PZR'de kullanılan primer dizileri ile çift yönlü olarak yapılmıştır (Macrogen Europe). Sekanslama sonrası elde edilen kromatogramlar dikkatli bir şekilde analiz edildikten sonra Geneious Prime 2022.0.2 (<https://www.geneious.com>) yazılımında *de novo* Assamble ile ileri ve geri yönlü okumalar işlenmiş ve kalite skoru yüksek konsensüs dizilimler elde edilmiştir. Konsensüs sekanslardan PZR primerleri kesilerek hedef bölge sekansları (390 bp) sağlanmıştır. *E. bieneusi* izolatlarına ait sekanslar BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması üzerinden GenBank'ta kayıtlı izolatların sekanslarıyla hizalamaları yapılmış ve moleküler karakterizasyonları sağlanmıştır. Belirlenen genotiplerin GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Genotiplendirme ve Filogenetik Analizler

Çalışmada tespit edilen *E. bieneusi* izolatlarının 243 bp uzunluğundaki komple ITS sekansları GenBank'ta mevcut ilgili sekanslarla birlikte değerlendirilerek veri seti oluşturulmuştur. Veri setindeki genotiplere ait sekanslar arasındaki genetik farklılıklar Kimura two-parameter (K2P) modeli (15,16) ile MEGA X yazılımında (17) araştırılmıştır. Filogenetik ağaç Maximum Likelihood (ML) modeli ile oluşturulmuştur. Sekans evrimi için en uygun nükleotid değişim modelinin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (18) kullanılmış ve en düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) skoruna sahip olan model ML ağacının oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizleri Geneious Prime yazılımı üzerinden PhyML (19) eklentisi kullanılarak yapılmıştır. ML analizinde oluşturulan ağacın olasılıklarının analizi için 1,000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

E. bieneusi grup ve alt gruplarının teşekkül ettirilmesinde standart sınıflandırma sistemi kullanılmıştır (20-25).

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20.0 yazılımı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İncelenen koyunlarda *E. bieneusi* moleküler prevalansı ile yaş gruplarının ilişkisi Pearson's ki-kare, cinsiyetin ilişkisi ise Fisher'in kesin testi ile araştırılmıştır.

BULGULAR

E. bieneusi'nin Moleküler Prevalansı

İncelenen 200 Akkaraman ırkı koyuna ait dışkı örneğinden elde edilen gDNA izolatlarının 16'sı (%8,0) ITS Nested PZR analizleriyle *E. bieneusi* DNA'sı yönünden pozitif saptanmıştır. Saray ilçesinde incelenen üç işletmedeki 25'er koyunun sırasıyla üç, üç ve biri, Özalp ilçesinde incelenen iki işletmedeki 25'er koyunun sırasıyla üçü ve biri, Gürpınar, Gevaş ve Erciş ilçelerinde incelenen birer işletmedeki 25'er koyunun sırasıyla iki, bir ve ikisi *E. bieneusi* ile enfekte belirlenmiştir. Pozitif örneklerin koyunların yaş grupları ve cinsiyetine göre dağılımı ve istatistiksel analizleri Tablo 1'de verilmiştir. Yaş gruplarına göre *E. bieneusi* prevalansında istatistiksel açıdan süt emen ve sütten kesilmiş kuzular ile ergin koyunlar arasındaki farklılık önemli ($p < 0,05$) bulunurken süt emen ve sütten kesilmiş kuzular arasındaki farklılık önemsiz tespit edilmiştir. Cinsiyete göre *E. bieneusi* pozitifliğinde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Sekans Analizi ve Genotiplendirme Sonuçları

Çalışmada pozitif saptanan 16 izolatın tamamının ribozomal ITS gen bölgesi sekanslanmıştır. İleri ve geri yönlü okumalara ait

dizilimlerin *de novo* analizleri ile eşleştirilmesi sonucu her bir izolat için yüksek kalitede konsensüs final nükleotid dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Toplam 16 *E. bieneusi* izolatının genotiplendirmede referans olan 243 bp uzunluğundaki ITS sekanslarının hizalama analizlerinde %100 benzer ve tek bir genotipe ait oldukları belirlenmiştir. Karakterize edilen ITS sekansının GenBank veri tabanındaki referans izolatlarla ait sekanslarla hizalama analizleri çalışmada tespit edilen izolatların BEB6 genotipine ait olduklarını ortaya koymuştur. İlgili tüm izolatların homolog olması yönüyle karakterize edilen *E. bieneusi* ribozomal ITS sekansı tek bir izolat adı altında TREbienVan1 olarak GenBank'a kaydedilmiştir (GenBank erişim: ON390931).

BEB6 genotipinde belirlenen TREbienVan1 izolatı ile koyunlarda yaygın görülen diğer *E. bieneusi* genotiplerine ait çeşitli izolatların nükleotid ITS rDNA sekanslarının çoklu hizalama analiz sonucu Şekil 1'de verilmiştir. Ribozomal ITS nükleotid sekansının 32., 58., 76., 105., 149. ve 189. bazlarında genotipleri birbirinden ayıran nükleotid varyasyonları gösterilmiştir.

Filogenetik Analiz Sonuçları

TREbienVan1 izolatının Dünyanın çeşitli bölgeleri ile Türkiye'de farklı konaklardan bildirilen *E. bieneusi* genotiplerine ait izolatlarla ilişkileri filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 2) verilmiştir. Maximum Likelihood (ML) filogenisine göre oluşturulan ağacın çözünürlüğü genogruplar bazında yüksek bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Koyunlarda belirlenen TREbienVan1 izolatının Türkiye'de koyun (süt örneği) ve sığırlar (süt örneği ve dışkı) ile çeşitli ülkelerde insan, koyun, sığır, domuz geyiği, keçi, çinçilla, altın maymunu, Hint şebegi, kedi, sika geyiği ve kızıl geyik gibi farklı konaklardan bildirilmiş BEB6 izolatlarıyla birlikte kümelenecek *E. bieneusi* genogrup 2'de yer aldığı belirlenmiştir.

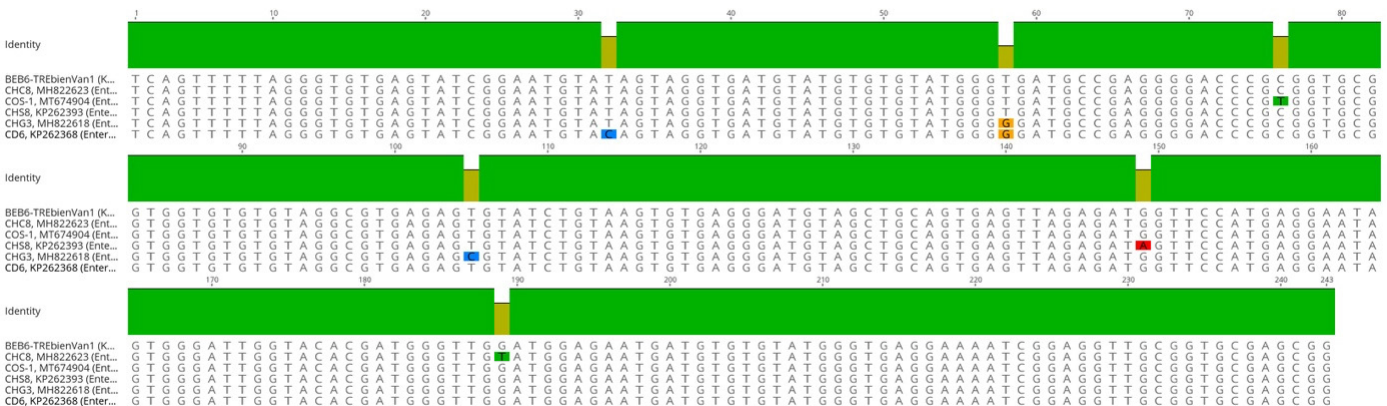
TARTIŞMA

E. bieneusi insanlar ile evcil ve vahşi hayvanlarda enfeksiyona yol açan 17 microsporidia türünün içerisinde en yaygın tür olarak bilinmektedir (1). Türkiye'de son yıllarda çeşitli hayvan türleri üzerinde yapılan araştırmalar da *E. bieneusi*'nin değişen oranlarda yaygınlık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalardan, Bilgin ve ark. (10) Sivas yöresinde incelenen 150 sığırdaki *E. bieneusi* moleküler prevalansını %19,3 olarak tespit etmişlerdir. Yıldırım ve ark. (8) İç Anadolu yöresinde örneklenen 300 atta *E. bieneusi*

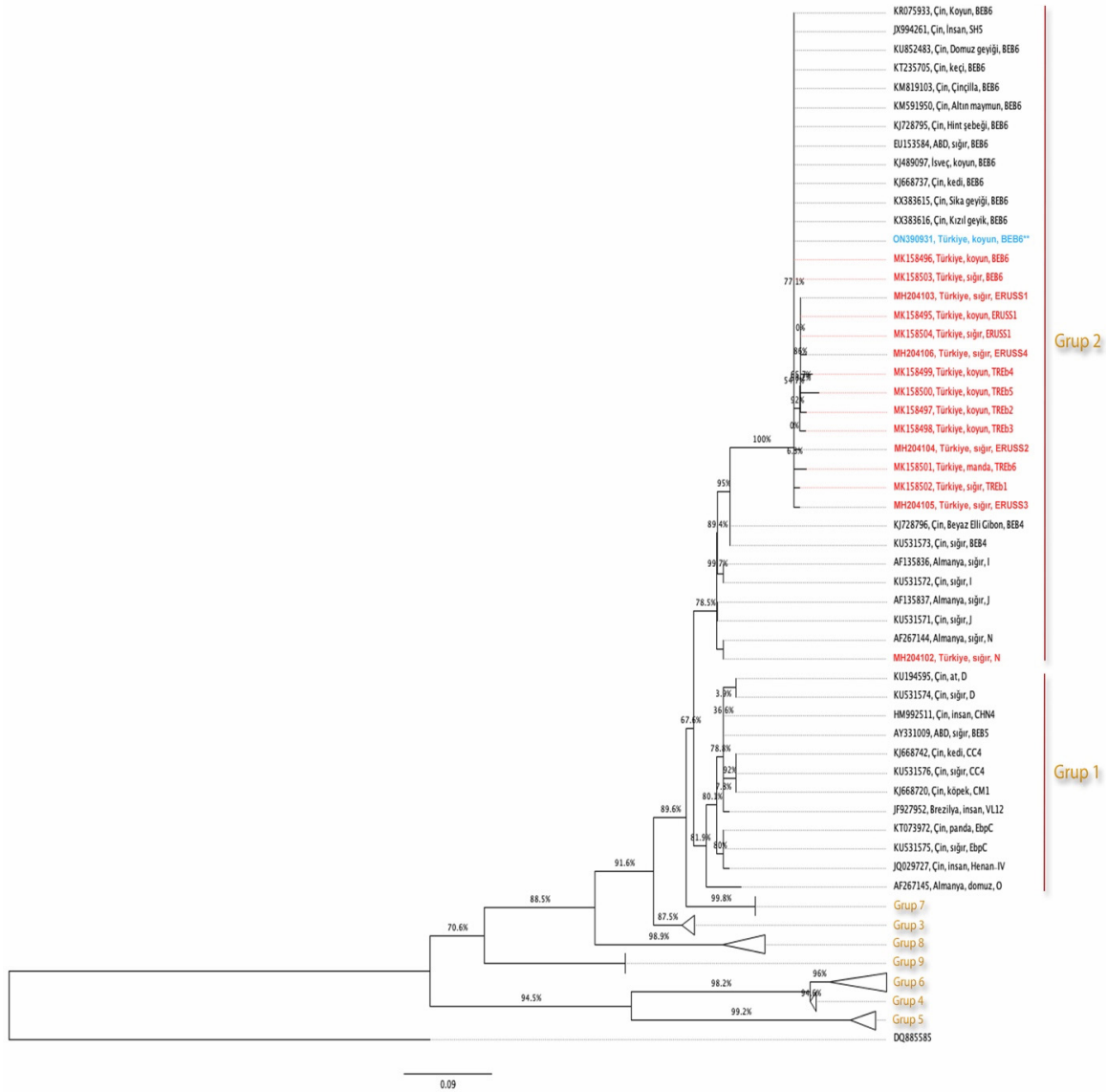
moleküler prevalansını %18,7 olarak bildirmişlerdir. Ercan ve ark. (26), İç Anadolu yöresinde örneklenen ve organik yetiştiriciliği yapılan toplam 300 tavukta *E. bieneusi*'yi moleküler olarak %7,3 yaygın bulmuşlardır. Yıldırım ve ark. (9), çiftlik hayvanlarının çiğ süt örnekleri üzerinde yürüttükleri araştırmada *E. bieneusi*'nin koyun, sığır ve manda sütlerinde sırasıyla %18,0, %4,5 ve %2,0 oranında bulunduğunu raporlamışlardır. Ayrıca *E. bieneusi* Türkiye'de farklı bölgelerdeki köpek, kedi, güvercin ve muhabbet kuşlarında da bildirilmiştir (7,11,12). Yapılan bu çalışmada Van yöresinde incelenen Akkaraman ırkı koyunlarda *E. bieneusi*'nin yaygınlığı %8,0 belirlenmiş olup Türkiye'de daha önce sığır ve at dışkıları ile koyun sütlerinde belirlenen oranlardan prevalansın daha düşük olduğu dikkati çekmiştir.

Diğer yandan günümüze kadar dünyada koyun ve keçilerde dışkı örnekleri üzerinde yürütülmüş olan toplam 21 çalışmanın sonuçları dikkate alındığında (13), farklı ülkelerde *E. bieneusi* enfeksiyonlarının koyunlarda %3,4 ila %62,9; keçilerde ise %4,1 ila %29,7 arasında prevalans gösterdiği kaydedilmiştir. Yapılan bu çalışmada tespit edilen moleküler prevalans daha önce koyunlarda yapılan çalışmalarda bildirilen oranlar ile paralellik göstermiştir. Çeşitli coğrafyalardan bildirilen *E. bieneusi* prevalans farklılıklarının, Qi ve ark.'nın (27) da vurguladığı gibi kullanılan teşhis yöntemi, çalışma tasarımı, örnekleme bölgesinin ekosistemi, hayvanların yaşları, çiftlik yönetimi ve mevsimsel varyasyonlar gibi çeşitli faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada yaş grupları ve *E. bieneusi* enfeksiyonunun prevalansı arasındaki ilişki incelendiğinde süt emen kuzular ve süttan kesilmiş kuzulardaki prevalansın erginlerdekine oranla istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0,05$) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak çeşitli araştırmalarda da (28-32) kuzu ve oğlaklarda *E. bieneusi* yaygınlığı erginlere oranla önemli düzeyde yüksek belirlenmiştir. Diğer yandan birkaç çalışmada ise yaşa bağlı enfeksiyonun prevalansında önemli bir farklılık bulunmamıştır (33-35). Sonuç olarak kuzuların koyunlara oranla *E. bieneusi* enfeksiyonları için daha duyarlı olduğu ve muhtemel olarak da bu durumun bağışıklık sistemi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan yaşa bağlı duyarlılık düzeyi üzerine daha kesin sonuçlar elde edilmesi için deneysel çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bunun yanında yapılan çalışmada dişi ve erkek koyunlar arasında *E. bieneusi* enfeksiyonunun prevalansında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir. Cinsiyetin *E. bieneusi* enfeksiyonu üzerine etkisinin olmadığı ayrıca sığırlar (36) ve atlar



Şekil 1. BEB6 genotipindeki TREbienVan1 ile koyunlardan bildirilen yaygın *E. bieneusi* genotiplerine ait izolatların ITS rDNA nükleotid sekanslarının çoklu hizalaması. Sekanslar içerisindeki nükleotid varyasyonları çeşitli renklerle işaretlenerek gösterilmiştir



Şekil 2. *E. bieneusi* izolatlarının ITS rRNA gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Node'ların önündeki rakamlar ML bootstrap desteğini göstermektedir. Çalışmada belirlenen TREbienVan1 izolatı mavi, Türkiye'den bildirilmiş diğer izolatlar ise kırmızı karakterde gösterilmiştir. Dış grup olarak *E. bieneusi* PtEb IX köpek izolatı (DQ885585) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir

(37) üzerinde yürütülen bazı araştırmalarda da gösterilmiştir. Diğer yandan köpek, kedi ve yabani memeliler üzerinde yürütülen birkaç çalışmada (38-40) erkeklerde dişilere oranla daha yüksek prevalans bildirilmiştir.

Çiftlik hayvanlarında *E. bieneusi* enfeksiyonlarının prevalansının yetiştirme ve besleme koşulları ile ilişkili olduğu yoğun yetiştirme yapılan ve su ve atık sistemleri yeterli olmayan çiftliklerde enfeksiyon oranlarının yüksek olduğu bildirilmiştir (34,41). Aynı zamanda farklı çiftlik hayvanları ve köpek ve kedi gibi karnivor hayvanların birlikte bulunmasının farklı konaklara adaptasyon yeteneği olan genotiplerin yayılışını kolaylaştırdığı da bilinmektedir (41). Bu yönüyle araştırma kapsamında incelenen çiftliklerdeki koyunlarda belirlenen prevalans oranının örneklem sayısının artırılması veya benzer karakterdeki çiftliklerin de araştırılması sonucu daha yüksek oranlara ulaşabileceği düşünülmüştür.

Yapılan araştırmada ribozomal ITS sekans analizleri sonucu tüm izolatların BEB6 genotipine (sinonimler: SH5, CHS4, CHC9, CHHLJS1 ve JSS1) ait olduğu görülmüştür. Bu sonuç koyunlarla birlikte diğer ruminantlarda yapılan araştırma sonuçları (29) ile paralellik göstermiş olup BEB6 genotipinin ruminant hayvanlarda baskın genotip olduğuna dair destekleyici kanıt sağlamıştır. Diğer yandan koyun ve keçilerde CD6, CHG1, CHG3, CHG5, CHS8, CM7 ve SX1'in de yaygın genotipler olduğu ve aynı zamanda bu genotiplerin kuşlar, sığır, geyik, köpek, at, domuz, maymun ve yak gibi hayvanlarda da görüldüğü sınırlı sayıda araştırma ile gösterilmiştir (31). Günümüze kadar yapılan araştırmaların sonuçları dikkate alındığında Zhang ve ark.'nın (13) da vurguladığı gibi başta BEB6 olmak üzere yukarıda bahsi geçen genotiplerin ruminantlar arasında yayıldığı ve diğer konaklara geçiş gösterdiği söylenebilir.

Şu ana kadar koyunlarda belirlenen diğer genotiplerin aksine BEB6'nın daha geniş bir hayvan konak spektrumuna sahip

olduğu görülmektedir. BEB6'nın rölative olarak geniş konak çeşitliliği göstermesi türler arasında bulaşmanın yüksek olduğunun bir göstergesidir (13). Ayrıca BEB6 insanlarda da identifiye edilmiş olup (42), Zhang ve ark. (13) koyun ve keçilerde elde ettikleri sonuçlarla bu hayvanların insan enfeksiyonları için potansiyel bir kaynak oluşturduklarına dikkat çekmiştir. Yapılan çalışmada koyunlarda yaygın ve tek genotip olarak belirlenen BEB6'nın araştırma yöresinde farklı konaklar arasında yayılış gösterebileceği literatür bilgi ışığında yüksek olasılıktadır. Ayrıca BEB6 genotipi doğal su kaynaklarında da tespit edilmiştir (43). Bu yönüyle başta insanlar olmak üzere araştırma yöresinde ilgili genotipin dağılımı ve oluşturduğu risk faktörleri üzerine ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Filogenetik analizler sonucunda çalışmada koyunlarda karakterize edilen BEB6 genotipinin diğer hayvanlardan izole edilen sinonimleri ile birlikte *E. bienersi* genogrup 2'de yer aldığı belirlenmiştir. Ülkemizde farklı hayvan konaklarda yapılan araştırmalarda BEB6 genotipinin yaygınlığı sığır ve koyun (süt örnekleri) (9) ile at (8) ve tavuklarda (26) da gösterilmiştir. Önceki yapılan birçok araştırmada grup 2'deki bazı genotiplerin (örneğin; BEB1, BEB2 ve BEB4) sığırlara özgü olduğu belirtilmiş olmasına karşın sonraki araştırmalarda bu genotiplerin bazılarının insanlarda da belirlenmiş olması (13) bu grupta yer alan genotiplerin ruminantlara özgü olmasından ziyade zoonotik bir grup olduğuna dair kanıtlar ortaya koymuştur. Ülkemizde şu ana kadar farklı hayvan konaklarda yapılan araştırma sonuçları da dikkate alındığında BEB6 genotipinin zoonotik risk potansiyeli taşıdığı ve koyunların da bu noktada bulaşma açısından önemli rezervuarlardan birisi olduğu çalışma ile ortaya konulmuştur.

SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışma ile önemli zoonotik microsporidialardan biri olan *E. bienersi*'nin Van yöresindeki koyunlarda varlığı ve moleküler yaygınlığı ortaya çıkarılmıştır. Türkiye'de farklı hayvan konaklarda yürütülen araştırmaların sonuçları ile paralel olarak bu çalışmada elde edilen veriler BEB6 genotipinin Türkiye'deki baskın genotiplerden birisi olduğuna dair destekleyici kanıtlar sağlamıştır. Zoonotik karakterli olduğu bilinen BEB6 genotipinin yaygın tek genotip olarak tespit edilmesi, araştırma yöresinde *E. bienersi*'nin insanlara bulaşma açısından koyunların önemli bir rezervuar olduğunu ve risk potansiyeli taşıdığını göstermiştir. Türkiye'de *E. bienersi*'nin epidemiyolojisi ve bulaşma dinamikleri üzerine tek sağlık çerçevesinde insanlar, hayvanlar, su ve diğer çevresel kaynaklar üzerinde ileri araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

* Teşekkür

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2021-11003 kodla Yüksek Lisans Tez Projesi olarak desteklenmiştir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Dışkı materyali hayvanların dışkılamalarını takiben hayvana temas edilmeden yerden alınmış olması nedeniyle etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onayı: Koyun dışkı örneklerinde çalışılması nedeniyle hasta onamı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: M.H.A., A.Y., Dizayn: M.H.A., A.Y., Veri Toplama veya İşleme: M.H.A., G.Y., F.K., Analiz veya Yorumlama: M.H.A., A.Y., F.K., Literatür Arama: M.H.A., G.Y., Yazan: M.H.A., A.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2021-11003 no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Li W, Xiao L. Ecological and public health significance of *Enterocytozoon bienersi*. One Health 2020; 12: 100209.
- Deng L, Yue CJ, Chai YJ, Wang WY, Su XY, Zhou ZY, et al. New genotypes and molecular characterization of *Enterocytozoon bienersi* in pet birds in Southwestern China. Int J Parasitol Parasites Wildl 2019; 10: 164-9.
- Pekmezci D, Pekmezci GZ, Yildirim A, Duzlu O, Inci A. Molecular Detection of Zoonotic Microsporidia in Domestic Cats in Turkey: A Preliminary Study. Acta Parasitol 2019; 64: 13-8.
- Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, Peng S, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in China. J Clin Microbiol 2011; 49: 2006-8.
- Qin RL, Liu YY, Mei JJ, Zou Y, Zhang ZH, Zheng WB, et al. Molecular Identification and Genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in Sheep in Shanxi Province, North China. Animals (Basel) 2022; 12: 993.
- Li J, Luo N, Wang C, Qi M, Cao J, Cui Z. Occurrence, molecular characterization and predominant genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle in Henan and Ningxia, China. Parasit Vectors 2016; 9: 142.
- Pekmezci D, Yetismis G, Esin C, Duzlu O, Colak ZN, Inci A, et al. Occurrence and molecular identification of zoonotic microsporidia in pet budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in Turkey. Med Mycol 2020; myaa088.
- Yildirim A, Okur M, Uslu S, Onder Z, Yetismis G, Duzlu O, et al. First report on the molecular prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in horses in Turkey: genotype distributions and zoonotic potential. Parasitol Res 2020; 119: 2821-8.
- Yildirim Y, Al S, Duzlu O, Onmaz NE, Onder Z, Yetismis G, et al. *Enterocytozoon bienersi* in raw milk of cattle, sheep and water buffalo in Turkey: Genotype distributions and zoonotic concerns. Int J Food Microbiol 2020; 334: 108828.
- Bilgin T, Uslu S, Karademir GK, Okur M, Yetişmiş G, Yıldırım A. Molecular Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Enterocytozoon bienersi* in Healthy Cattle. Türkiye Parazit Derg 2020; 44: 36-42.
- Pekmezci D, Yetismis G, Colak ZN, Duzlu O, Ozkılıc GN, Inci A, et al. First report and molecular prevalence of potential zoonotic *Enterocytozoon bienersi* in Turkish tumbler pigeons (*Columba livia domestica*). Med Mycol 2021; 59: 864-8.
- Duzlu O, Yildirim A, Onder Z, Ciloglu A, Yetismis G, Inci A. Prevalence and Genotyping of Microsporidian Parasites in Dogs in Turkey: Zoonotic Concerns. J Eukaryot Microbiol 2019; 66: 771-7.
- Zhang Y, Mi R, Yang J, Wang J, Gong H, Huang Y, et al. *Enterocytozoon bienersi* genotypes in farmed goats and sheep in Ningxia, China. Infect Genet Evol 2020; 85: 104559.
- Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 2595-9.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980; 16: 111-20.
- Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. Annu Rev Genet 1996; 30: 371-403.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 2016; 33: 1870-4.

18. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25: 1253-6.
19. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52: 696-704.
20. Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, et al. Predominance and new genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in captive nonhuman primates in zoos in China: high genetic diversity and zoonotic significance. *PLoS One* 2015; 10: e0117991.
21. Karim MR, Rume FI, Rahman ANMA, Zhang Z, Li J, Zhang L. Evidence for Zoonotic Potential of *Enterocytozoon bienersi* in Its First Molecular Characterization in Captive Mammals at Bangladesh National Zoo. *J Eukaryot Microbiol* 2020; 67: 427-35.
22. Li J, Qi M, Chang Y, Wang R, Li T, Dong H, et al. Molecular Characterization of Cryptosporidium spp., Giardia duodenalis, and *Enterocytozoon bienersi* in Captive Wildlife at Zhengzhou Zoo, China. *J Eukaryot Microbiol* 2015; 62: 833-9.
23. Li W, Xiao L. Multilocus Sequence Typing and Population Genetic Analysis of *Enterocytozoon bienersi*: Host Specificity and Its Impacts on Public Health. *Front Genet* 2019; 10: 307.
24. Li W, Feng Y, Santin M. Host Specificity of *Enterocytozoon bienersi* and Public Health Implications. *Trends Parasitol* 2019; 35: 436-51.
25. Ding H, Zhao A, Wang L, Gao N, Sun Y, Li J, et al. Genotypes and zoonotic potential of *Enterocytozoon bienersi* in edible bullfrogs (*Lithobates catesbeiana*) in China. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2020; 11: 103-7.
26. Ercan N, Duzlu O, Yildirim A. Molecular detection and genotyping of microsporidia species in chickens in Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2020; 72: 101516.
27. Qi M, Jing B, Jian F, Wang R, Zhang S, Wang H, et al. Dominance of *Enterocytozoon bienersi* genotype J in dairy calves in Xinjiang, Northwest China. *Parasitol Int* 2017; 66: 960-3.
28. Fiuza VRDS, Lopes CWG, Cosendey RLJ, de Oliveira FCR, Fayer R, Santin M. Zoonotic *Enterocytozoon bienersi* genotypes found in Brazilian sheep. *Res Vet Sci* 2016; 107: 196-201.
29. Chen D, Wang SS, Zou Y, Li Z, Xie SC, Shi LQ, et al. Prevalence and multi-locus genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in black-boned sheep and goats in Yunnan Province, southwestern China. *Infect Genet Evol* 2018; 65: 385-91.
30. Yang H, Mi R, Cheng L, Huang Y, An R, Zhang Y, et al. Prevalence and genetic diversity of *Enterocytozoon bienersi* in sheep in China. *Parasit Vectors* 2018; 11: 587.
31. Zhang Q, Cai J, Li P, Wang L, Guo Y, Li C, et al. *Enterocytozoon bienersi* genotypes in Tibetan sheep and yaks. *Parasitol Res* 2018; 117: 721-7.
32. Peng JJ, Zou Y, Li ZX, Liang QL, Song HY, Li TS, et al. Occurrence of *Enterocytozoon bienersi* in Chinese Tan sheep in the Ningxia Hui Autonomous Region, China. *Parasitol Res* 2019; 118: 2729-34.
33. Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, et al. Zoonotic and Potentially Host-Adapted *Enterocytozoon bienersi* Genotypes in Sheep and Cattle in Northeast China and an Increasing Concern about the Zoonotic Importance of Previously Considered Ruminant-Adapted Genotypes. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81: 3326-35.
34. Shi K, Li M, Wang X, Li J, Karim MR, Wang R, et al. Molecular survey of *Enterocytozoon bienersi* in sheep and goats in China. *Parasit Vectors* 2016; 9: 23.
35. Wegayehu T, Li J, Karim MR, Zhang L. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Enterocytozoon bienersi* in Lambs in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *Front Vet Sci* 2020; 7: 6.
36. Fiuza VRDS, Lopes CWG, Cosendey RLJ, de Oliveira FCR, Fayer R, Santin M. Zoonotic *Enterocytozoon bienersi* genotypes found in Brazilian sheep. *Res Vet Sci* 2016; 107: 196-201.
37. Santin M, Vecino JA, Fayer R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bienersi* in horses. *J Parasitol* 2010; 96: 157-61.
38. Sak B, Salát J, Horká H, Saková K, Ditrich O. Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol* 2006; 28: 95-9.
39. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4495-501.
40. Santin M, Cortés Vecino JA, Fayer R. *Enterocytozoon bienersi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 215-7.
41. Dong H, Zhao Z, Zhao J, Fu Y, Lang J, Zhang J, et al. Molecular characterization and zoonotic potential of *Enterocytozoon bienersi* in ruminants in northwest China. *Acta Trop* 2022; 234: 106622.
42. Wang L, Xiao L, Duan L, Ye J, Guo Y, Guo M, et al. Concurrent infections of *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi*, and *Clostridium difficile* in children during a cryptosporidiosis outbreak in a pediatric hospital in China. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2437.
43. Ye J, Ji Y, Xu J, Ma K, Yang X. Zoonotic *Enterocytozoon bienersi* in raw wastewater in Zhengzhou, China. *Folia Parasitol (Praha)* 2017; 64: 2017.002.