

Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium parvum* Subtiplerinin Belirlenmesi ^[1]

Mükremin Özkan ARSLAN *  Ayşel İTİK EKİNCİ **

[1] TÜBİTAK-TOVAG 1100451 nolu projeden hazırlanmıştır

* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6565

Özet

Bu çalışma; Kars yöresindeki sığırlarda *Cryptosporidium parvum* subtiplerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Sığırlardan elde edilen 13 adet (10'u buzağı, 3'ü inek) *C. parvum* izolatının DNA ekstraksiyonu (DNA Stool Kit) yapılarak genomik DNA elde edilmiştir. Primer ve sekonder PCR ile 18S rRNA gen amplifikasyonu yapılmıştır. Sekonder PCR ürünü *SspI*, *VspI* ve *MbolI* restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP analizi gerçekleştirilmiştir. *Cryptosporidium parvum* izolatlarında GP60 gen amplifikasyonu sonucu sekonder PCR ürünü elde edilmiştir. PCR ürünleri Agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak saflaştırıldıktan sonra sekans analizi yapılmıştır. Çalışmada; *Cryptosporidium parvum*'un Ila (12/13) ve Ild (1/13) subtip familyası ile IlaA15G2R1 (10/13), IlaA16G3R1 (2/13) ve IldA15G1 (1/13) subtipleri tespit edilmiştir. Buzağılarda *C. parvum* IlaA15G2R1 (9/10), IlaA16G3R1 (1/10), ineklerde *C. parvum* IlaA16G3R1 (2/3) ve IldA15G1 (1/3) subtipleri belirlenmiştir. İshalli buzağılarda *C. parvum* Ila subtip familyası (8/8) ve IlaA15G2R1 (7/8) subtipi yaygın olarak saptanmıştır. Bu sonuç zoonotik *Cryptosporidium* potansiyeli nedeniyle bölgedeki buzağıların insanlar için önemli risk olduğunu göstermektedir. Türkiye'de sığırlarda *C. parvum* subtipleri ilk defa bu çalışma ile bildirilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Cryptosporidium parvum*, Sığır, Buzağı, İnek, 18S rRNA, GP60, Subtip, Kars, Türkiye

Determination of *Cryptosporidium parvum* Subtypes in Cattle in Kars Province of Turkey

Summary

The objective of this study was to determine the subtypes of *Cryptosporidium parvum* in cattle in Kars province of Turkey. *Cryptosporidium parvum* isolates (from 10 calves and 3 cows) were obtained from the samples positive for *Cryptosporidium* oocysts with a saline flotation method. Genomic DNA was obtained by DNA extraction (DNA Stool Kit). 18S rRNA gene amplification was performed by primary and secondary PCR techniques. The secondary PCR product was subjected to RFLP analyses using restriction enzymes *SspI*, *VspI* and *MbolI*. GP60 gene amplifications were done in *C. parvum* fecal isolates and secondary PCR products were obtained. PCR products were purified by agarose gel DNA extraction kit and then sequence analysis was performed. As a result, *Cryptosporidium parvum* Ila (12/13), Ild (1/13) subtype family and IlaA15G2R1 (10/13), IlaA16G3R1 (2/13), IldA15G1 (1/13) subtypes/subgenotypes were identified in cattle. *Cryptosporidium parvum* IlaA15G2R1 (9/10) and IlaA16G3R1 (1/10) were determined in calves. *Cryptosporidium parvum* IlaA16G3R1 (2/3) and IldA15G1 (1/3) were determined in cows. The subtype family of *C. parvum* Ila (8/8) and subtype of *C. parvum* IlaA15G2R1 (7/8) were common in diarrhoeic calves. This result shows that calves carry potential risk factors for humans in the region due to zoonotic *Cryptosporidium* spp. *Cryptosporidium parvum* subtypes were determined and reported for the first time in Turkey in this article.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, Cattle, Calves, Cow, 18S rRNA, GP60, Subtype, Kars, Turkey

GİRİŞ

Cryptosporidium türleri insan ve hayvanlarda gastro-intestinal sistemin mikrovillus kenar kısımlarında, intra-

cellüler-extrasitoplazmik olarak bulunan protozoon parazitlerdir. Apicomplexan parazitler olan *Cryptosporidium*



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426807/5096



ozkanarslan@gmail.com

etkenleri ilk defa Ernest Edward Tyzzer tarafından 1907'de saptanmış ve şimdiye kadar 20 tür tanımlanmıştır ¹.

Sığırlarda *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* olmak üzere dört tür bulunmaktadır. Bunlardan *C. parvum* türü konak spektrumu daha geniş olup, buzağılarda yaygındır ve ishal olgularında birinci derece sorumlu ajandır. İnsanlarda cryptosporidiosis etiyolojisinin %50'sini *C. hominis* ve %45'ini ise *C. parvum* oluşturmaktadır ¹⁻³.

Cryptosporidium parvum'un 11 suptip familyası (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, II f, IIg, IIh, Ili, IIk, III) bulunmaktadır. Bunlardan IIa, IIb ve IId zoonotik olup insan ve buzağılarda görüldüğü halde IIc ve IIe tipleri antropotiktir. İnsan ve hayvanlarda zoonotik tip *C. parvum* IIa suptip familyasıdır. Dünyada en yaygın olarak görülen zoonotik suptipler ise IIaA15G2R1 ve IIaA18G3R1'dir ^{2,4-6}.

Dünyada sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu çeşitli ülkelerde yapılmış ve *C. parvum* IIaA15G2R1, IIaA16G1R1, IIaA16G3R1, IIaA18G3R1 ve IIdA15G1 suptipleri belirlenmiştir ^{4,7-12}. Bunlardan *C. parvum* IIaA15G2R1 suptipi hem insan ve hemde sığırlarda bildirilmiştir ^{13,14}.

Türkiye'de insan ve hayvanlarda *Cryptosporidium* etkenleri görülmekte olup, bu konu ile ilgili çalışmaların asit-fast boyama teknikleri gibi konvansiyonel yöntemlerle olduğu bilinmektedir ¹⁵. *Cryptosporidium*'ların moleküler tanısıyla ilgili çalışmalar sınırlıdır. Ancak son yıllarda PCR-RFLP ile buzağılarda *C. parvum*, *C. ryanae* ve *C. bovis* türleri bildirilmiştir ^{16,17}. Sığır yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip Kars yöresinde buzağılarda enteritis ya da ishal vakalarının çiftliklerde yaygın olduğu ve etiyolojide *Cryptosporidium* etkenlerinin önemli rol oynadığı kaydedilmiştir ¹⁸. *Cryptosporidium* etkenleri ishali üç ayılığa kadar olan buzağılarda daha sık görülmekte ve klinik olgulara da rastlanmaktadır ^{15,19}. Kars yöresinde buzağılarda *C. parvum* tip II genotipi belirlenmiş ve çiftliklerde multilokuslu genotipler yüksek bulunmuştur ^{20,21}. Ancak bugüne kadar *C. parvum* türünün suptipleri ile ilgili ne Kars yöresinde ne de Türkiye'de bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışma ile Kars yöresindeki sığırlardan elde edilen *C. parvum* izolatlarının suptip familyaları ve suptipleri belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Cryptosporidium Ookist İzolatı Elde Edilmesi

Dışkı örnekleri Kars yöresindeki buzağı ve ineklerin rektumlarından alınmış ve modifiye asit fast yöntemi ile incelenmiştir. *Cryptosporidium* pozitif örneklerden tuzlu su flotasyon yöntemi ile *Cryptosporidium* ookist izolatları elde edilmiştir. Elde edilen 1 ml'lik *Cryptosporidium* ookist izolatı üzerine 500 µl distile su ilave edilerek 1.5 ml'lik

ependorflara alınmış ve DNA ekstraksiyonu yapılabildiği kadar -20°C saklanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu

Cryptosporidium ookistleri içeren dışkı sedimentinden kolon purifikasyon dışkı kiti (DNA Stool Kiti, DNA ekstraksiyon kiti) kullanılarak total DNA elde edilmiştir. DNA ekstraksiyonu kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır ⁶.

Cryptosporidium Türlerinin Belirlenmesi (PCR-RFLP, SSU rRNA Gen Amplifikasyonu ve RFLP Analizi)

Cryptosporidium izolatlarında SSU rRNA gen amplifikasyonu (yaklaşık 840 bp) için primer ve sekonder PCR olmak üzere iki PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin ilk aşamasında uygulanan primer PCR'da SSU-F2 primer (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') ile SSU-R2 primer (5'-CCCATTTCCTCGAAACAGGA-3'); ikinci aşamasındaki sekonder PCR'da ise SSU-F3 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') ve SSU-R4 (5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3') primerleri kullanılmıştır. Kontrol için 20 µl'lik PCR ürünü %1.5'lik agaroz jel de 100-bp DNA marker'ı (DNA ladder) kullanılarak elektroforeze tabi tutulmuş ve PCR ürünü pozitiflik yönünden kontrol edilmiştir ^{6,22,23}.

Sekonder PCR ürünlerinin RFLP ile analizinde *SspI*, *VspI* ve *MbolI* restriksiyon enzimleri kullanılmış ve restriksiyon işleminden sonra elde edilen üründen 40 µl %1.2'lik agaroz jel de 100-bp DNA marker'ı kullanılarak elektroforeze tabi tutulmuştur. *Cryptosporidium* türleri RFLP bant modelleri dikkate alınarak identifiye edilmiştir. Ayrıca sekans analizi yapılarak türlerin konfirmasyonu yapılmıştır ^{6,24}.

Cryptosporidium parvum Subtiplerinin Belirlenmesi (GP60 genin PCR ve Sekans Analizi)

Cryptosporidium parvum tanısı koyulan izolatlarda GP60 gen amplifikasyonu (800-850 bp) yapılmıştır. Bunun için ilk PCR'da GP60-F1 primer (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3') ile GP60-R1 primer (5'-GGAAGGAACGATGTATCT-3'); sekonder PCR'da ise GP60-F2 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3') ve GP60-R2 (5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3') primerleri kullanılmıştır. Kontrol için 15 µl'lik sekonder PCR ürünü %1.5'lik agaroz jel de 100-bp DNA marker'ı kullanılarak elektroforeze tabi tutularak sekonder PCR ürünü tespiti yapılmıştır ⁶.

Sekans Analizi (Dizi Analizi)

PCR-RFLP ile *C. parvum* saptanan 13 adet örneğe suptiplerin belirlenmesi için sekans analizi yapılmıştır. Pozitif sekonder PCR ürünü agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak temizlenmiştir. Safılaştırılan PCR ürünü -20°C'de saklanmıştır. Temizlenen PCR ürünü; forward ve reverse PCR primerleri ve intermitten (intermediar) primer R3 (5'-GAGATATATCTTGTTGCG-3') kullanılarak sekans analizi yapılmıştır ⁶.

DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizi, Beckman Coulter CEQ 8000 8 kapillerli sisteme sahip tam otomatize cihaz ile yapılmıştır. Dizi analiz sonucunda cihaz tarafından okunan veriler bir metin belgesine kaydedilmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen dizi değişik biyoinformatik programlarla (GeneTool, PepTool ve Interproscan) ile GenBankasında BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:BLAST>) analiz edilmiştir ²⁵.

BULGULAR

Kars yöresindeki sığırlarda *Cryptosporidium parvum*'un Ila (12/13) ve Ild (1/13) olmak üzere iki adet subtip familyası belirlenmiştir. Bu subtip familyalarına bağlı olarak ise *C. parvum* IlaA15G2R1 (10/13), IlaA16G3R1 (2/13) ve IldA15G1 (1/13) olan üç adet subtip tespit edilmiştir. Yaş grupları dikkate alındığında ise buzağılarda *C. parvum* IlaA15G2R1 (9/10) ile IlaA16G3R1 (1/10) ve ineklerde *C. parvum* IlaA16G3R1 (2/3) ile IldA15G1 (1/3) subtipleri belirlenmiştir.

Kars çevresindeki sütçü işletmelerde bulunan buzağı ve ineklerde saptanan *C. parvum* subtipleri **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1'den de izleneceği gibi, Kars çevresindeki sığırlarda *C. parvum*'un zoonotik subtip familyası olan *C. parvum* Ila daha sıklıkla (12/13) görülmüş olup, bu familyaya bağlı olan *C. parvum* IlaA15G2R1 de zoonotik potansiyeli olan subtip olması açısından bu çalışma bulguları yönünden önemli bulunmuştur.

Hayvanların klinik durumlarına göre *C. parvum* moleküler karakterizasyonu sonuçları da **Tablo 1**'de görülmektedir. Klinik olarak ishalleri buzağılarda *C. parvum*

Ila subtip familyası bulunmuştur. Diyarli buzağılarda *C. parvum* Ila subtip familyası (8/8) ve *C. parvum* IlaA15G2R1 (7/8) subtipi daha yaygın olarak tespit edilmiştir. *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipinin ishalleri buzağılarda daha sıklıkla görülmesi nedeniyle *C. parvum* IlaA15G2R1'in daha patojen olabileceği bulgusu elde edilmiştir. Ayrıca bu sonuç zoonotik *Cryptosporidium* potansiyeli nedeniyle bölgedeki buzağılarda insanlar için önemli risk olduğunu göstermektedir.

Çalışmada saptanan *C. parvum* subtiplerine ait dizi analizi bilgileri **Şekil 1-3**'te belirtilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., rotavirus, coronavirus, parvovirus, *Eimeria* sp. enfeksiyöz etkenlerdir. Buzağılarda özellikle neonatal buzağı diyare etiolojilerinde *Cryptosporidium* türleri ilk sırada gelmektedir. Bu nedenle *cryptosporidiosis* bağlı buzağı verim kayıpları katma değer yönünden önemlidir ^{18,26}.

Kars yöresinde ishalleri buzağılarda yıllara göre değişmekle beraber %5.6-%40 arasında *Cryptosporidium* etkenlerine rastlanmaktadır ^{15,19}. Ayrıca neonatal kuzu ishalleri etiolojisinde diğer enteropatojenler arasında *C. parvum* önemli bir yer tutmaktadır ²⁷.

Sığırlarda *cryptosporidiosis* *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* türleri neden olmaktadır. Bu türlerden *C. parvum* dünyada en yaygın olanıdır. Hem buzağılarda ciddi boyutlarda hastalığa neden olması, hemde insanlardaki *cryptosporidiosis* olgularında *C. parvum*'un %45'ler düzeyinde görülmesi bu türün önemini ortaya

Tablo 1. Kars yöresindeki sığırlarda saptanan *Cryptosporidium parvum* subtiplerinin dağılımı
Table 1. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in cattle in Kars province of Turkey

Protokol No	Klinik Durum	Yaş	<i>C. parvum</i> Subtip Familyası	<i>C. parvum</i> Subtipi	Genbank No
CAG4	İshalleri Buzağı	1 ay	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
AKB17	İshalleri Buzağı	20 gün	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
SGK70	İshalleri Buzağı	5 gün	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
KUM40	İshalleri Buzağı	1 ay	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
BGD14	İshalleri Buzağı	1 ay	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
ALC4	İshalleri Buzağı	20 gün	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
ALC7	İshalleri Buzağı	1.5 ay	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
AYD2	İshalleri Buzağı	2 ay	Ila	IlaA16G3R1	AB560739.1
KUM30	Sağlıklı Buzağı	3 ay	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
AKB30	Sağlıklı Buzağı	2 ay	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
AKB16	Sağlıklı İnek	>3 yaş	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
DIK16	Sağlıklı İnek	>3 yaş	Ila	IlaA16G3R1	AB560739.1
KRK17	Sağlıklı İnek	>3 yaş	Ild	IldA15G1	AB560740.1

```
>gi|296067697|dbj|AB560741.1| Cryptosporidium parvum GP60 gene for 60 kDa glycoprotein, partial cds, isolate: Cp(C)198-IR  
GGAACITTTAAAGGATGTTCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAT  
CATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAAGTGGAGAAGACGCAGAAAGGCAGTCAAGAT  
TCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGCTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGAAGTGAAGACGATGGCCAAACTAG  
TGCTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAA  
AGAAGAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTTCGGAGAAGGTACCCACAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTG  
CCTACTACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCAGCA
```

Şekil 1. *Cryptosporidium parvum* IlaA15G2R1 subtipi sekans analizi

Fig 1. Sequence analysis of *Cryptosporidium parvum* IlaA15G2R1 subtype

```
>gi|296067693|dbj|AB560739.1| Cryptosporidium parvum GP60 gene for 60 kDa glycoprotein, partial cds, isolate: Cp(C)63-IR  
GAGGAACITTTAAAGGATGTTCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCAAC  
ATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAAGTGGAGAAGACGCAGAAAGGCA  
GTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGC  
CAAAGTACTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCT  
ACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTTCGGAGAAGGTACCCACAGCTGCGACATTGAAG  
TGTGGTGCCTACTACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCAGCACAA
```

Şekil 2. *Cryptosporidium parvum* IlaA16G3R1 subtipi dizi analizi

Fig 2. Sequence analysis of *Cryptosporidium parvum* IlaA16G3R1 subtype

```
>gi|296067695|dbj|AB560740.1| Cryptosporidium parvum GP60 gene for 60 kDa glycoprotein, partial cds, isolate: Cp(C)112-IR  
CACTTTAAAGGATGTTTCTGTTGAGGGTTCATCATCATCATCATCATCATCATCGTCATCATCATCATCAT  
CATCATCGACTGTAGCACCAACTCCAAAGAAAGAAAGAAAGTGGAGAGGAAGTAGCTAATCCAGGTCTGAAG  
GTCAGGACGGTAAAGGAGACTGAAGAAACAGAAGACAATCAGACCCAGAGTACTGTTTCTCAAATACTC  
CAGCTCAAAGTGAAGGCACAACCTACCGAAACCACAGAAAGCTGCTCCAAAGAAAGAGTGCGGTACTTCATTTG  
TTATGTGGTTTCGGAGAGGGTGTTCAGTTGCATCTTTGAAGTGTGGGCACTATACTATGGTCTATGCACCAG  
AAAAGGACAAACAGATCCCAGCACAA
```

Şekil 3. *Cryptosporidium parvum* IlaA15G1 subtipi dizi analizi

Fig 3. Sequence analysis of *Cryptosporidium parvum* IlaA15G1 subtype

koymaktadır ^{1,15}. *Cryptosporidium parvum*'un ruminantlarda yaygın olması ^{15,27} ve zoonotik özelliğinden dolayı son 30 yıldır araştırmaların genç hayvanlarda yapılmasına vesile olmuştur. Buzağular doğum sonrası 3-5 gün sonra dışkıları ile fazla sayıda ookist atmaya başlarlar. Klinik olgularda buzağularda belirgin olarak görülür. Özellikle neonatal buzağular insanlara bulaşımında ve salgınlarda

etkili olabilecek hayvanlardır ^{4,26}. Çünkü ishali buzağular dışkıları ile daha fazla ookist çıkarırlar. Özellikle süt kesim öncesi yani iki ayliğa kadar olan buzağular *Cryptosporidium* ookist kontaminasyonunda önemli rol oynarlar ¹¹.

Türkiye'de sahip olduğu hayvan popülasyonu ile bölge ve ülkeye önemli düzeyde katkı sağlayan Kars ilinde

sığır yetiştiriciliği hayvancılık içerisinde ilk sırada gelmektedir. Mayıs-Ekim döneminde mera, Kasım-Nisan süresince kapalı yetiştirme biçiminde sığır yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bölgede doğumlar Ocak ayı ile başlamakta Şubat ve Mart aylarında yoğunlaşmaktadır. Bahar ayları genç sığırların ve buzağuların sayıca yaygın olduğu periyoddur. Ancak son yıllarda buzağı doğumlarının yıla yayılmaya çalışıldığı da görülmektedir. İşte buzağı sayısının fazla olduğu bahar mevsiminde buzağı ishallerine en yaygın olarak rastlanmaktadır. Bazı yıllarda ishalleri buzağular da %30'lar düzeyinde *Cryptosporidium* türleri görülmektedir. Klinikal cryptosporidiosis olgularında dikkati çeker boyutta olmaktadır. Ancak son yıllarda ise hastalığın oldukça azaldığı da dikkati çekmektedir. *Cryptosporidium* izolatu elde etmek amacıyla yapılan saha çalışmalarında 2011 yılında buzağularda bu protozoonun %5'ler düzeyine kadar düştüğü görülmüştür^{15,19}. Kars'ta ishalleri buzağularda *C. parvum* tip II saptanmıştır^{20,21}. Yapılan bu çalışma ile bölgede ishalleri ve sağlıklı buzağularda ve ineklerde *C. parvum*'un subtipleri tespit edilmiştir.

Türkiye'de buzağularda *Cryptosporidium*'ların varlığı ilk olarak 1984'te buzağularda bildirilmiştir²⁸. Daha sonra genellikle mikroskopik tanı yöntemleri olan asit-fast boyama teknikleriyle bu protozoonun yaygınlığı araştırılmıştır¹⁵. Hatta Giemsa ve Hematoksilin-Eozin boyamalar ile *C. parvum*'un hücre kültüründeki gelişme dönemleri incelenmiştir²⁹. Bugüne kadar hayvanlarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler prevalansı ve karakterizasyonu ile ilgili Nevşehir ve Aydın illerindeki ishalleri buzağularda araştırmalar yapılmıştır^{16,17}. Aydın'da ishalleri buzağularda PCR-RFLP sonucu *C. parvum* teşhis edilmiş olup, yaygınlığı %24.2 oranında belirlenmiş ve sekans analizi ile de tür doğrulanmıştır. Real Time PCR ile buzağularda *C. parvum* yaygınlığını %15.3 (23/150) olarak bulmuşlardır¹⁷. Ayrıca *C. ryanae* (2 /150), *C. bovis* (1/150) türleri de saptanmıştır. Kars yöresinde ise ishalleri buzağularda PCR-RFLP ile yapılan bu çalışmada *C. parvum* görülme oranı %22.2 (8/36) olarak saptanmıştır. Bu oran diğer çalışmalarla¹⁶ bezerlik göstermektedir. Ishalleri buzağularda en yaygın türün *C. parvum* olduğu belirlenmiş olup, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri de bulunmuştur.

Sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının hem veterinerlik ve hem de beşeri hekimlik yönünden önemli olması nedeniyle dünya da sığır cryptosporidiosisi üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Sığırlardan da yaş grubu olarak buzağularda çalışmaların daha sıklıkla yapıldığı görülmektedir⁴. Sığırlarda bildirilen türlerden *C. parvum* konak spektrumu en geniş olan tür olup, genellikle 2-3 aylık öncesi buzağularda daha yaygındır. *Cryptosporidium bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* türleri ise üç aylıktan büyük ya da süttan kesim sonrası yaşlardaki sığırlarda sıklıkla görülen türlerdir^{24,26,30}.

Medikal ve veterinerlik yönünden *Cryptosporidium* türleri içerisinde *C. hominis* ve *C. parvum* en önemli türlerdir.

Çünkü her iki tür insanlarda cryptosporidiosis etiolojisinde önemli ajandır. Hem insan hemde hayvanlarda görülen *C. parvum*'un Ila, Ilb, Ilc, Ild, Ile, Ilf, Ilg, Ilh, Ili, Ilk ve Ill olmak üzere çok sayıda suptip familyası bulunmaktadır⁵. Bunlardan Ila, Ilb ve Ild zoonotik olup, en yaygın olanı da *C. parvum* Ila tipidir. Dünyada en yaygın olarak görülen zoonotik subtipler IlaA15G2R1 ve IlaA18G3R1'dir^{2,4,6}. Hem sığırlarda hem de HIV pozitif insanlarda *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipi daha yaygın olarak görülmektedir¹³. Bu nedenle dünyada *C. parvum* türünün subtiplerinin belirlenmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Almanya'da *C. parvum* Ila ve IlaA15G2R1 subtipi %81 oranında bulunmuştur⁷. İngiltere'de sığırlara Ila subtip familyası ve bu familyaya bağlı altı farklı subtip tespit edilmiştir. En yaygın subtipin ise IlaA15G2R1'in olduğu bildirilmiştir⁸. Kuzey İrlanda'da *C. parvum*'un 16 adet subtipi saptanmış en yaygın görülenlerin ise IlaA18G3R1 ve IlaA15G2R1 subtipleri olduğu kaydedilmiştir¹¹. Macaristan'da süt kesim öncesi yaşlardaki buzağularda *C. parvum* Ila ve *C. parvum* Ild subtip familyaları saptanmış olup, IlaA16G1R1 subtipi yaygın (%71.4) bulunmuştur¹⁰. Hollanda'da *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipi¹⁴, Portekiz'de sığırlardan insanlara bulaşan *C. parvum* Ila ve Ild subtip familyaları tespit edilmiştir¹³. Amerika Birleşik Devletleri'nde buzağularda zoonotik olan Ila subtip familyası ile buna bağlı altı subtip tespit edilmiş ve yaygın olan subtipin ise IlaA15G2R1 olduğu bildirilmiştir^{4,12}. İran'da buzağularda *C. parvum*'un IlaA15G2R1, IlaA16G3R1 ve IldA15G1 subtipleri belirlenmiş olup, en yaygın subtipin IlaA15G2R1 (22/25) olduğu kaydedilmiştir⁹. Kars yöresindeki sığırlarda PCR-RFLP ile teşhisi yapılan 13 adet *C. parvum* türünün yapılan sekans analizi sonucu Ila ve Ild subtip familyaları saptanmıştır. Buzağuların tümünde Ila, ineklerde ise Ila ve Ild subtip familyası tespit edilmiştir. Bu subtip familyalara bağlı olarak ise IlaA15G2R1, IlaA16G3R1 ve IldA15G1 subtipleri bulunmuştur. Dünya'da sığırlarda yaygın olarak bildirilen *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipi Türkiye'nin Kars yöresindeki sığırlarda da en yaygın olarak bulunmuştur. Buzağularda IlaA15G2R1, IlaA16G3R1 subtipleri saptanmış, ineklerde ise IlaA15G2R1, IlaA16G3R1 ve IldA15G1 subtipleri belirlenmiştir. *Cryptosporidium parvum* saptanan 10 buzağının 8'inde IlaA15G2R1 subtipi bulunmuştur.

Sonuç olarak; bu çalışma ile Kars yöresindeki sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin zoonotik olan subtip familyaları ile subtipler belirlenmiştir. Türkiye'de ilk olarak bu araştırma ile *C. parvum* türünün subtipleri saptanmıştır. Kars yöresinde daha önce yapılan araştırmalarda^{20,21} bildirilen *C. parvum* tip II genotipi bu çalışma da da buzağularda ve daha yaşlı sığırlarda bulunmuştur. Bu çalışma ile ishalleri buzağularda da *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipinin sorumlu etiolojik ajan olduğu saptanmıştır. Özellikle ishalleri buzağuların dışkıları ile daha fazla oookist çıkarmalarından dolayı, insanlara bulaşımında ve buzağı ishallerinde en önemli subtip olacağı düşünülmelidir.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın yürütülme aşamasında ve sekans analizlerinin yapılmasında desteklerini sağlayan Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Cem ÖZİÇ'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Fayer R:** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*, 214 (1): 90-97, 2010.
2. **Nichols G:** Epidemiology. In, Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. pp. 79-118, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
3. **Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamson MS, Hijjawi NS:** *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. *Adv Parasitol*, 59, 77-158, 2005.
4. **Santin M, Trout JM:** Livestock. In, Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. pp. 451-483, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
5. **Xiao L:** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol*, 124, 80-89, 2010.
6. **Xiao L, Ryan UM:** Molecular Epidemiology. In, Fayer R, Xiao L (Ed): *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. pp. 119-172, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
7. **Brogli A, Reckinger S, Caccio SM, Nöckler K:** Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet Parasitol*, 154 (1-2): 8-13, 2008.
8. **Brook EJ, Hart CA, French NP, Christley RM:** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J*, 179 (3): 378-382, 2009.
9. **Nazemalhosseini-Mojarad E, Haghghi A, Taghipour N, Keshavarz A, Mohebi SR, Zali MR, Xiao L:** Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Vet Parasitol*, 179, 250-252, 2011.
10. **Plutzer J, Karanis P:** Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol*, 146, 357-362, 2007.
11. **Thompson HP, Dooley JS, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L:** Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol Res*, 100 (3): 619-624, 2007.
12. **Xiao L, Zhou L, Santin M, Yang W, Fayer R:** Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol Res*, 100 (4): 701-706, 2007.
13. **Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O:** Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res*, 99 (3): 287-292, 2006.
14. **Wielinga PR, Vries A, Goot TH, Mank T, Mars MH, Koortbeek LM, Giessen JWB:** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. *Int J Parasitol*, 38, 809-817, 2008.
15. **Arslan MÖ:** *Cryptosporidium* enfeksiyonları: İshal olgularında rolü. 17. *Ulusal Parazitolojik Kongre, Program ve Özet Kitabı, KON11*, s. 64-70, 5-10 Eylül 2011, Kars - TÜRKİYE.
16. **Aysul N, Ulutaş B, Ünlü H, Hoşgör M, Atasoy A, Karagenç T:** Aydın ilinde ishalleri buzağılarda bulunan *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu. 16. *Ulusal Parazitolojik Kongre, Program ve Özet Kitabı, S-15*, s. 208, 1-7 Kasım 2009, Adana - TÜRKİYE
17. **Şimşek AT, İnci A, Yıldırım A, Çiloğlu A, Bişkin Z, Düzlü Ö:** Nevşehir yöresinde ishalleri buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler prevalansı ve karakterizasyonu. 17. *Ulusal Parazitolojik Kongre, SB03-06*, s. 158, 5-10 Eylül 2011, Kars - TÜRKİYE.
18. **Çitil M, Arslan MÖ, Güneş V, Erdoğan HM:** Neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria* enfeksiyonlarının rolü. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 10 (1): 59-64, 2004.
19. **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*, 25, 161-164, 2001.
20. **Tanrıverdi S, Arslan MÖ, Akiyoshi DE, Tzipori S, Widmer G:** Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Mol Biochem Parasitol*, 130 (1): 13-22, 2003.
21. **Tanrıverdi S, Markovics A, Arslan MÖ, İtik A, Shkap V, Widmer G:** Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl Environ Microbiol*, 72 (4): 2507-2513, 2006.
22. **Jiang J, Alderisio KA, Xiao L:** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol*, 71 (8): 4446-4454, 2005.
23. **Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Faye R, Lal AA:** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*, 65 (4): 1578-1583, 1999.
24. **Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L:** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol*, 144, 1-9, 2007.
25. **Altschuls F, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ:** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990.
26. **O'handley RM, Olson ME:** Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin Food Anim*, 22 (3): 623-643, 2006.
27. **Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM:** İshalleri neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (5): 717-722, 2010.
28. **Burgu A:** Türkiye'de buzağılarda *Cryptosporidium*'ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 31 (3): 573-585, 1984.
29. **Kar S, Güven E, Yilmazer N, Karaer Z:** Determination of developmental stages of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cell culture by differential interference contrast microscopy, Giemsa and Haematoxylin-Eosin staining methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (2): 171-175, 2011.
30. **Kvac M, Kouba M, Vitovec J:** Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet Parasitol*, 137, 202-209, 2006.