



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVUKLARDA *ENTEROCYTOZON BIENEUSI* VE
ENCEPHALITOZON SPP. TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
PREVALANSI, GENOTİPLENDİRİLMESİ VE İNSAN
SAĞLIĞI AÇISINDAN RİSK POTANSİYELLERİ**

**Hazırlayan
Nuri ERCAN**

**Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

Doktora Tezi

**Aralık 2019
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVUKLARDA *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSİ* VE
ENCEPHALITOZOOM SPP. TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
PREVALANSI, GENOTİPLENDİRİLMESİ VE İNSAN
SAĞLIĞI AÇISINDAN RİSK POTANSİYELLERİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Nuri ERCAN**

**Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2018-8065 kod ile desteklenmiştir**

**Aralık 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

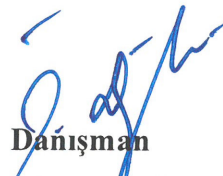
Adı-Soyadı: Nuri ERCAN

İmza :

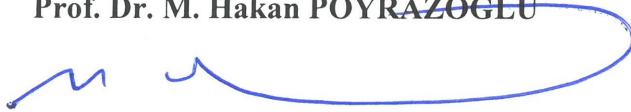
YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Tavuklarda *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon* spp. Türlerinin Moleküler Prevalansı, Genotiplendirilmesi ve İnsan Sağlığı Açısından Risk Potansiyelleri” adlı Doktora Tezi Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.


Tezi Hazırlayan
Nuri ERCAN


Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

Anabilim Dalı Başkanı (Uhde)
Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU



Doç. Dr. Önder DÜZLÜ danışmanlığında **Nuri ERCAN** tarafından hazırlanan “**Tavuklarda *Enterocytozoon bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. Türlerinin Moleküler Prevalansı, Genotiplendirilmesi ve İnsan Sağlığı Açısından Risk Potansiyelleri**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

05/12/2019

JÜRİ :

İmza

Danışman: Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ

(Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Samsun)

Üye: Doç. Dr. Cenk Soner BÖLÜKBAŞ

(Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Kayseri)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesinin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeye katkıda bulunan değerli danışman hocam Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ve Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Tıp Fakültesi Dekanı ve Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında bana her türlü konuda destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Zuhale ÖNDER, Dr. Öğr. Üyesi Arif ÇİLOĞLU, Arş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ ve doktora öğrencisi Uzm. Biyolog Mübeccel OKUR'a teşekkür ederim.

Nevşehir – Kozaklı İlçe Tarım Müdürlüğü personeli Veteriner Hekim Şener TORUN'a destekleri için teşekkür ederim.

Saha çalışmalarımız sırasında; ziyaret ettiğimiz işletme sahiplerine, gittiğimiz her bölgede yardımlarını esirgemeyen köy ve mahalle muhtarlarımıza, sadece evinin kapısı değil gönül kapısı açık, misavirperver Anadolu insanına sonsuz teşekkürler.

Çalışmamıza TDK-2018-8065 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Hiçbir zaman tükenmek bilmeyen sabırları, sevgileri ve destekleri için sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürler.

Sevgileri her zaman en büyük desteğim olan sevgili eşim Fahriye ve canım oğlum Kerem'e sonsuz teşekkürler.

TAVUKLARDA *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI* VE *ENCEPHALITOZOOM* SPP. TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI, GENOTİPLENDİRİLMESİ VE İNSAN SAĞLIĞI AÇISINDAN RİSK POTANSİYELLERİ

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Aralık 2019
Danışman: Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

ÖZET

Bu çalışmada; Kayseri, Kırşehir ve Nevşehir bölgelerinde zoonotik karakterli *E. bieneusi* ve *Encephalitozoon* spp. türlerinin tavuklardaki moleküler prevalansı, genotiplendirilmesi ve insan sağlığı açısından risk potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Örneklem bölgelerinde halk elinde yetiştirilen serbest gezen tavuklardan, yumurtacı tavuk ve etlik piliç (broyler) işletmelerinden toplam 300 adet dışkı örneği toplanmış ve gDNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen gDNA izolatları, ITS, SSU rRNA ve LSU rRNA gen bölgelerini amplifiye eden tür spesifik ve microsporidia genel primer çiftleri kullanılarak Nested-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Analizler sonucu pozitif belirlenen 24 (%8) örnekte *E. bieneusi* pozitifliği 22 (%7,3) örnekte, *Microsporidia* sp. pozitifliği ise 2 (%0,7) örnekte tespit edilmiştir. Sekans analizleri sonucu; *E. bieneusi* izolatlarının iki ayrı genotipte gruplandığı ve en yaygın genotip olarak 21 örnekte (%95) Dünya’da ilk kez rapor edilen ERUNT1 genotipi, bir (%0,5) örnekte ise daha önce aynı bölgede sığırlarda rapor edilen ERUSS1 genotipi olduğu belirlenmiştir. Filogenetik analizler sonucu ERUSS1 genotipinin farklı ülkelere bildirilen geniş konak aralığına sahip Grup 2 içerisinde, ERUNT1 genotipinin ise zoonotik karakterli genotiplerin sıklıkla yer aldığı Grup 1 içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Sekans karakterizasyonu yapılan ve aynı haplotipi paylaşan diğer iki izolatın ise en yakın identikliği %12 genetik farklılıkla GenBank veritabanında *Nosema ceranae* türüne gösterdiği belirlenmiş olup, *Microsporidia* sp. olarak kayıt altına alınmıştır. Sonuç olarak, insanlarda ve farklı konaklarda fırsatçı patojen enfeksiyonlarına yol açan *E. bieneusi*’nin tavuklarda moleküler prevalansı, filogenetik karakterizasyonu ve insan sağlığı açısından oluşturduğu risk potansiyelleri Türkiye için ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp., tavuk, moleküler prevalans.

**MOLECULAR PREVALANCE, GENOTYPING AND RISK POTENTIALS
FOR HUMAN HEALTH OF *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI* AND
ENCEPHALITOZOOM SPP. SPECIES IN CHICKENS**

Erciyes University, Graduate School of Health Science

Department of Parasitology

PhD Thesis, December 2019

Supervisor: Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine molecular prevalence, genotyping and evaluate of risk potentials for human health of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. species in chickens from Kayseri, Kırşehir and Nevşehir regions. Within the scope of the study, 300 stool samples were collected from free range chickens cultivated in public, laying hens farms and broiler chick farms in sampling areas and gDNA extractions was performed. The obtained gDNA elutions were examined by Nested-PCR method using species specific and microsporidia common primer pairs that amplified ITS, SSU rRNA and LSU rRNA gene regions. The analysis of results revealed that 24 (8%) of the totally examined chicken stool samples were positive comprised 22 (7.3%) *E. bieneusi* and two (0.7%) *Microsporidia* sp. Sequence analyses of positive samples indicated the presence of at two genotypes for *E. bieneusi* isolates. The most common genotype ERUNT1 was determined in 21 samples (95%) and firstly characterized in the world. The remaining positive isolate (0.5%) belonged to ERUSS1 genotype that was previously reported in cattle in the same region. As a result of phylogenetic analyzes, ERUSS1 genotype was found in Group 2 with a wide host range reported from different countries and ERUNT1 genotype was in Group 1, which included many genotypes associated with zoonotic character. The other two isolates characterized by sequencing and sharing the same haplotype exhibited highest identity to *Nosema ceranae* in GenBank with a 12% genetic difference, and recorded as *Microsporidia* sp. Consequently, molecular prevalence, phylogenetic characterization and risk potentials for human health of *E. bieneusi* that cause opportunistic pathogen infections in humans and several hosts, has been documented for the first time in Turkey.

Key words: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp., chickens, molecular prevalence.

İÇİNDEKİLER

TAVUKLARDA *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI* VE *ENCEPHALITOZOOM* SPP. TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI, GENOTİPLENDİRİLMESİ VE İNSAN SAĞLIĞI AÇISINDAN RİSK POTANSİYELLERİ

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Sınıflandırma.....	3
2.2 Morfoloji	5
2.2.1 Meront Morfolojisi	6
2.2.2 Sporont.....	6
2.2.3 Spor Morfolojisi.....	6
2.3 Hayat Döngüsü.....	9
2.3.1 Enfektif (Çevresel) Faz.....	10
2.3.2 Proliferatif (Üreme) faz	11
2.3.3 Sporogonik Faz.....	11
2.3.4 Hücre İnvazyon Mekanizmaları:	12
2.4 Epidemiyoloji.....	13
2.5 Klinik ve Patogenez	17
2.5.1. Gastrointestinal Tutulum	18
2.5.2 Oküler Tutulum.....	18
2.5.3 Hepatik, Üriner ve Pankreatik Tutulum.....	19

2.5.4 Serebral Tutulum	19
2.5.5 Pulmoner Tutulum	19
2.5.6 Diğer Enfeksiyonlar	20
2.6 İmmunoloji	21
2.7 Tanı	23
2.7.1 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)	23
2.7.2 Işık ve Floresan Mikroskobu	24
2.7.3 Serolojik Yöntemler	25
2.7.4 Histolojik Yöntemler	26
2.7.5 Hücre Kültürü ve Hayvan Modeli	26
2.7.6 Moleküler Yöntemler	27
2.8 Tedavi	29
2.9 Korunma ve Kontrol	30
2.10 Tavukçuluk Sektörü	31
2.11 Microsporidia ve Diğer Patojenik Etkenlerle Koenfeksiyonlar; <i>Salmonella</i> spp. Enfeksiyonları	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1 Saha Çalışmaları	34
3.1.1 Araştırma Sahası ve Örneklerin Toplanması	34
3.2 Laboratuvar Analizleri	38
3.2.1 Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	38
3.2.2 gDNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	40
3.2.3 <i>E. bienesi</i> rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	41
3.2.4 <i>Encephalitozoon</i> spp. rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	42
3.2.5 Pozitif PCR Amplikonların Agaroza Jelden Ekstraksiyonu	44
3.2.6 Gen Sekans Analizleri ve Filogenetik Analiz	45
3.2.7 <i>Salmonella</i> spp. rRNA 16S Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	45
3.3 İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1 Dışkı Örneklerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi	47
4.2 Microsporidian Parazitlerin Moleküler Prevalansı	49
4.2.1 <i>E. bienesi</i>	49
4.2.2 <i>Encephalitozoon</i> spp.	52

4.3 rRNA ITS Gen Bölgesi Sekans Analizi Sonuçları.....	52
4.3.1 <i>E. bieneusi</i>	52
4.3.2 <i>E. bieneusi</i> Pozitif İzolatların Filogenetik Analizi.....	56
4.3.3 <i>Microsporidia</i> sp.....	59
4.3.4 <i>Microsporidia</i> sp. Pozitif İzolatların Filogenetik Analizi.....	62
4.4 Dışkı Örneklerinin <i>Salmonella</i> spp. Yönünden Değerlendirilmesi	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
6. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ.....	89



KISALTMALAR VE SİMGELER

ng	: Nanogram
µm	: Mikrometre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
ml	: Mililitre
µM	: Mikromolar
M	: Molar
Mb	: Megabaz
bp	: Baz çifti
rpm	: Revolutions Per Minute
dk	: Dakika
sn	: Saniye
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
gDNA	: Genomik DNA
rRNA	: Ribozomal RNA
UV	: Ultraviolet
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
PCR	: Polymerase Chain Reaction
ITS	: Internal Transcribed Spacer
SSU rRNA	: Small Sub Unit rRNA

LSU rRNA	: Large Sub Unit rRNA
IFN- γ	: Interferon gamma
IL-10	: Interleukin 10
TLR-4	: Toll Like Receptor 4
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
KOH	: Potasyum hidroksit
DTT	: Dithiothreitol
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
NaClO	: Sodyum hipoklorit
V	: Volt

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Microsporidian parazitlerin sınıflandırılması	4
Tablo 2.2 Bazı microsporidia türlerinin morfolojik özellikleri.....	5
Tablo 2.3 İnsan ve diğer hayvan konaklarında tespit edilen <i>E. bienewsi</i> genotipleri.....	15
Tablo 2.4 Microsporidiaların yerleştiği dokular ve klinik belirtileri	20
Tablo 2.5 <i>Enterocytozoon bienewsi</i> ve <i>Encephalitozoon</i> spp. tanısında kullanılan tür spesifik ve genel primer çiftleri	28
Tablo 2.6 Ülkemiz 2018 yılı yumurta ve beyaz et üretim ve tüketim miktarları.....	32
Tablo 3.1 <i>E. bienewsi</i> pozitifliğini belirlemek amacıyla kullanılan primer çiftleri ve termal profil.....	42
Tablo 3.2 <i>Encephalitozoon</i> spp. pozitifliğini belirlemek amacıyla kullanılan primer çiftleri ve termal profil	43
Tablo 4.1 Çalışma kapsamındaki örneklerin sayısı, tavuk ırkı ve yaş özellikleri.	47
Tablo 4.2 Çalışma kapsamındaki örneklerin bölgelere göre dağılımı	48
Tablo 4.3 Dışkı örneklerinin morfolojik özelliklerine göre gruplandırması.....	48
Tablo 4.4 <i>E. bienewsi</i> pozitif örneklerin yaşlara göre dağılımı	50
Tablo 4.5 Morfolojik karakter gruplarına göre <i>E. bienewsi</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi	51
Tablo 4.6 Örneklerin morfolojik gruplarına göre <i>E. bienewsi</i> pozitifliğinin dağılımı	51
Tablo 4.7 Tavuklarda belirlenen <i>E. bienewsi</i> izolatlarının genotiplere göre dağılımı ve GenBank aksesyon numaraları.....	55
Tablo 4.8 Tavuklardan rapor edilen <i>E. bienewsi</i> genotiplerinin ITS rDNA sekanslarının çoklu hizalama analizlerine göre genetik farklılıkları.....	56
Tablo 4.9 Tavuk dışkılarından rapor edilen TRMicChick1 izolatu ile diğer bazı microsporidia genotiplerinin, ITS rDNA sekansları çoklu hizalama analizlerine göre genetik farklılıkları.....	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Microsporidian spor morfolojisi	7
Şekil 2.2 <i>E. bieneusi</i> ve <i>Encephalitozoon spp.</i> türlerinin hayat döngüsü	9
Şekil 2.3 <i>E. bieneusi</i> elektron mikroskobu görüntüsü..	24
Şekil 3.1 Örnekleme lokaliteleri	35
Şekil 3.2 Dışkı örnekleme	35
Şekil 3.3 Halk elinde yetiştirilen tavuk kümesi	36
Şekil 3.4 Serbest gezen tavuk yumurtası üretim kümesi.....	36
Şekil 3.5 Yumurtacı tavuk işletmesi	37
Şekil 3.6 Broiler işletmesi.....	37
Şekil 4.1 Nested-PCR analizi sonucu <i>E. bieneusi</i> pozitif belirlenen örneklerin agaroz jelinde görünümü	49
Şekil 4.2 Tavukların yaş gruplarına göre <i>E. bieneusi</i> pozitifliğinin dağılımı	50
Şekil 4.3 Nested-PCR analizi sonucu <i>Microsporidia</i> sp. pozitif belirlenen örneklerin agaroz jelinde görünümü.....	52
Şekil 4.4 <i>E. bieneusi</i> rDNA ITS gen bölgesinin EBITS2.4 reverse primeri ile elde edilen kromotogramı.....	53
Şekil 4.5 <i>E. bieneusi</i> rDNA ITS gen bölgesinin EBITS1 forward primeri ile elde edilen kromotogramı.....	53
Şekil 4.6 DeNovo analizleri sonucu konsensus sekans dizilimi	54
Şekil 4.7 <i>E. bieneusi</i> izolatına ait ITS rRNA gen bölgesi sekanslarının ikili hizalamaları	55
Şekil 4.8 <i>E. bieneusi</i> izolatlarının ITS rRNA gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri.....	58
Şekil 4.9 Microsporidia rDNA ITS gen bölgesinin MSP4A reverse primeri ile elde edilen kromotogramı	59
Şekil 4.10 Microsporidia rDNA ITS gen bölgesinin MSP3 forward primeri ile elde edilen kromotogramı	59
Şekil 4.11 DeNovo analizleri sonucu konsensus sekans dizilimi	60
Şekil 4.12 Microsporidia sp izolatlarının rRNA ITS gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri.....	63

Şekil 4.13 PCR analizi sonucu *Salmonella* sp. pozitif belirlenen örneklerin bazılarının agaroz jelinde görünümü.....64

Şekil 4.14 Pozitif belirlenen *Salmonella* sp. ERU-Slm-1 izolatının Blast analiz sonuçları.....64



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Microsporidian parazitler omurgalı ve omurgasız geniş konak aralığına sahip, yaklaşık 200 cinse ait 1400'den fazla türü kapsayan, spor oluşturan ökaryotik parazitlerdir (Didier, 2005). Tarih boyunca kürk hayvanları, ipek böceği, arı ve balık gibi canlılarda enfeksiyona neden olmuş, bu sektörlerde faaliyet gösteren ticari işletmelerde ekonomik kayıplara neden olmuşlardır. 1980 yılından günümüze kadar microsporidian parazitlerin insan hastalık etkenleri artan bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Özellikle HIV/AIDS hastaları, organ transplantasyonu veya kemoterapi alanlar gibi immun sistemi baskılanmış bireylerde fırsatçı patojen olarak ciddi komplikasyonlara yol açtıkları bilinmektedir (Anane ve Attouchi, 2010; Bergquist ve ark., 1984).

Yapılan çalışmalarda 8 cinse ait 14 türün insanlarda enfeksiyona yol açtığı tespit edilmiştir. Bunlar arasında *Encephalitozoon* soyuna bağlı *E. cuniculi*, *E. intestinalis* ve *E. hellem* ile *Enterocytozoon* soyuna bağlı *E. bienewisi*, insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan ve zoonotik karaktere sahip dört önemli microsporidia türüdür. Enfeksiyon bulaş yolları henüz net olarak tanımlanamamış olmasına rağmen, epidemiyolojik çalışmalarda enfeksiyonların su/gıda kaynaklı, seksüel, respiratör, konjenital, oküler ve zoonotik bulaş yolu gibi çeşitli yollarla ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Didier, 2005; Stentiford ve ark., 2016). Microsporidian parazitler üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar genel olarak insan enfeksiyonları üzerine yoğunlaşmış olmasına karşın son yıllarda evcil ve yaban hayvanları üzerine yapılan çalışmaların sayısında da artış gözlenmiştir.

Tavuk eti düşük kolesterol seviyesi, protein ve mineral yönünden zengin olmasının yanı sıra fiyatı bakımından kırmızı ete göre daha avantajlıdır. Bu özellikleri beyaz eti önemli bir hayvansal protein kaynağı yapmaktadır. Yumurta ise dengeli beslenme için gerek duyulan vitaminler, mineraller ve yüksek protein kalitesine sahip olması ve sevilerek

tüketilmesi bakımından değerli bir besin maddesidir (Kovacs-Nolan ve ark., 2005). Ayrıca yumurta ve beyaz et ülkemiz ihracatında da önemli paya sahiptir.

Bu çalışmada insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olan microsporidian parazitler *Encephalitozoon* soyuna bağlı *E. cuniculi*, *E. intestinalis* ve *E. hellem* ile *Enterocytozoon* soyuna bağlı *E. bienersi*'nin Kayseri, Kırşehir ve Nevşehir illerinde, farklı örnekleme gruplarında (yumurtacı işletme, etlik piliç (broiler) işletme ve halk eli) moleküler prevalansının ve genotiplerinin tespit edilmesi ve insan sağlığı açısından risk potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ülkemizde kanatlı çiftlik hayvanlarında yapılan ilk araştırma olması bakımından önemlidir. Çalışma ile bu alandaki ilk moleküler veriler tespit edilmiş olup araştırma bölgesinde microsporidian parazitlerin insan sağlığı açısından oluşturdukları zoonotik risk potansiyelleri bilimsel verilerle ortaya konmuştur.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Sınıflandırma

Microsporidialar ilk kez Nageli tarafından *Nosema bombycis* olarak tanımlanmıştır (Dong ve ark., 2010). 1882 yılında Balbiani “microsporidia” tanımını ilk kez kullanmış ve gruplandırmıştır. 1980 yılında ise Protista alemi ve protozoa alt alemi altında sınıflandırılmışlardır (Franzen ve Müller, 1999; Weber ve ark., 1994). Microsporidiaların sınıflandırılması konak-parazit ilişkisi, spor yapısındaki polar filamentin helezon sayısı, gelişim dönemlerinin büyüklük ve morfolojileri ile spor ve gelişim dönemlerindeki çekirdeğin konfigürasyonu gibi temel kriterler esas alınarak yapılmıştır (Tablo 2.1) (Weber ve ark., 1994). Teknolojik alanda yaşanan gelişmeler moleküler filogeni çalışmalarına da katkı sağlamıştır. α ve β tubulin gen sekansları, glutamyl tRNA sentetaz, EF-1 vs EF-2 elongasyon faktörleri, TATA-box bağlanma proteinleri, seryl-tRNA sentetaz ve hsp70 heat shock proteinleri gibi evrimsel olarak korunmuş yapıların analizi sonucu microsporidian parazitler mantarlar âlemi içerisinde yeniden sınıflandırılmışlardır (Cavalier-Smith, 1998). 2002 yılında NCBI microsporidiaların sınıflandırmasını “ökaryotik, mantar/metazoa grubu, mantar, microsporidia” olarak kabul etmiş olmasına rağmen bazı araştırmacılar bu sınıflandırmaya halen şüphe ile yaklaşmaktadır (Didier ve ark., 2004; Dong ve ark., 2010; Han ve Weiss, 2017; Vivarès ve ark., 2002).

Tablo 2.1 Microsporidian parazitlerin sınıflandırılması

SINIF	TAKIM	AİLE	CİNS	TÜR
DIHAPLOPHASEA	DISSOCIODIHAPOPHASSIDA	NOSEMATIDAE	NOSEMA	<i>N. connori</i>
				<i>N. algerae</i>
				<i>N. ocularum</i>
			BRACHIOLA	<i>B. vesicularum</i>
HAPLOPHASEA	GLUGEIDA	PLEISTOPHORIDAE	PLEISTOPHORA	<i>Pleistophora</i> spp.
			TRACHIPLEISTOPHORA	<i>T. antropoptera</i>
		ENCEPHALITOZOONIDAE	ENCEPHALITOZOON	<i>T. hominis</i>
				<i>E. intestinalis</i>
				<i>E. hellem</i>
				<i>E. cuniculi</i>
SINIFLANDIRILAMAYAN CİNS VE TÜRLER	CHYTRIDIOPSIDA	ENTEROCYTOZOONIDAE	ENTEROCYTOZOON	<i>E. bieneusi</i>
			VITTAFORMA	<i>V. cornea</i>
			MICROSPORIDIUM	<i>M. africanum</i>
				<i>M. ceylonensis</i>

2.2 Morfoloji

Tüm microsporidian parazitler hücre içi zorunlu parazit olup, konak hücresi dışında aktif formları bulunmamaktadır. Prokaryotik ile ökaryotik organizmalar arasındaki evrimsel süreçte yer alan antik organizmalar olarak kabul edilen (Cavalier-Smith, 1987) microsporidialar ribozom (70S), ribozomal alt ünite (30S ve 50S) ve rRNA bölge (16S ve 23S) özellikleri ve mitokondri, peroksizom, 5.8S rRNA (Vossbrinck ve Woese, 1986) ve tipik bir golgi aygıtına sahip olmamaları ile prokaryotik organizma, zarla çevrili bir çekirdek, intrasitoplazmik membran sistemi ve kromozomal bölünmenin mitotik iplikçiklerle gerçekleşmesi ve mRNA polidentilasyonu gibi özellikleriyle de ökaryotik organizma olarak değerlendirilmektedirler (Franzen ve Müller, 1999; Keeling ve Fast, 2002). Bazı microsporidia türlerine ait morfolojik özellikler Tablo 2.2’de verilmiştir. Meront, sporont, sporoblast ve spor parazitin hayat döngüsünde görülen dönemlerdir.

Tablo 2.2 Bazı microsporidia türlerinin morfolojik özellikleri (Franzen ve Müller, 1999)

Tür	Spor büyüklüğü (µm)	Polar tüp sarmal sayısı	Vakuol	Çekirdek yapısı
<i>E. bienewisi</i>	0.1-1.6x0.7-1.0	5-7	Vakuol yok. Konak hücre sitoplazması ile dolaylı temas	Unikaryon
<i>Encephalitozoon</i> spp.	2.0-2.5x1.0-1.5	5-7	Parazitofor vakuol ile ayrılmış	Unikaryon
<i>Nosema</i> spp.	2.5-5.0x2.0-2.5	7-12	Vakuol yok. Konak hücre sitoplazması ile dolaylı temas	Diplokaryon
<i>V. cornea</i>	3.0-4.5x0.7-1.27	5-7	Vakuol yok. Konak hücre sitoplazması ile dolaylı temas	Diplokaryon
<i>Pleistophora</i> spp.	3.2-3.4x2.8	9-12	Sporofor vezikül	Unikaryon
<i>Trachipleistophora</i> spp.	4.0x2.4	11	Sporofor vezikül	Unikaryon

2.2.1 Meront Morfolojisi

Sporoplazmanın uygun konak hücresine enjeksiyonundan sonra büyüme ve nükleer fizyondan sonra olgunlaşan merontlar bölünerek merozoitleri oluşturur. Merontlar plazma membranı ile çevrili yuvarlak, düzensiz veya hafif oval şekilli hücrelerdir. Konak hücre içerisinde merogoni olarak tanımlanan ikili veya çoklu fizyonlar şeklinde tekrar eden bölünmeler ile çoğalırlar (Franzen ve Müller, 1999; Weber ve ark., 1994). Meront plazma membranı daha sonra spor duvarının ekzospor katmanını teşkil edecek olan elektron yoğun halini alır. Bu safha sporont olarak adlandırılır. Merogoniden sporogoniye geçişi tetikleyen mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak sporogoni safhasının başlangıcından sonra merogoniye dönüşün tekrar olmadığı net şekilde bilinmektedir. Sporontlar tek veya diplokaryon çekirdeğe sahip olabilmektedir. Bazı sporontlar ikili füzyon ile direkt olarak sporoblast haline geçerken, bazıları multinucleated plazmoidal safhaya geçebilmektedir. Sporoblastlar farklı sitoplazmik organellerin sentezlenmesi ve elektronca yoğun plazma membranının kalınlaşması ile olgun sporları oluştururlar (Çetinkaya, 2014; Franzen ve Müller, 1999; Weber ve ark., 1994).

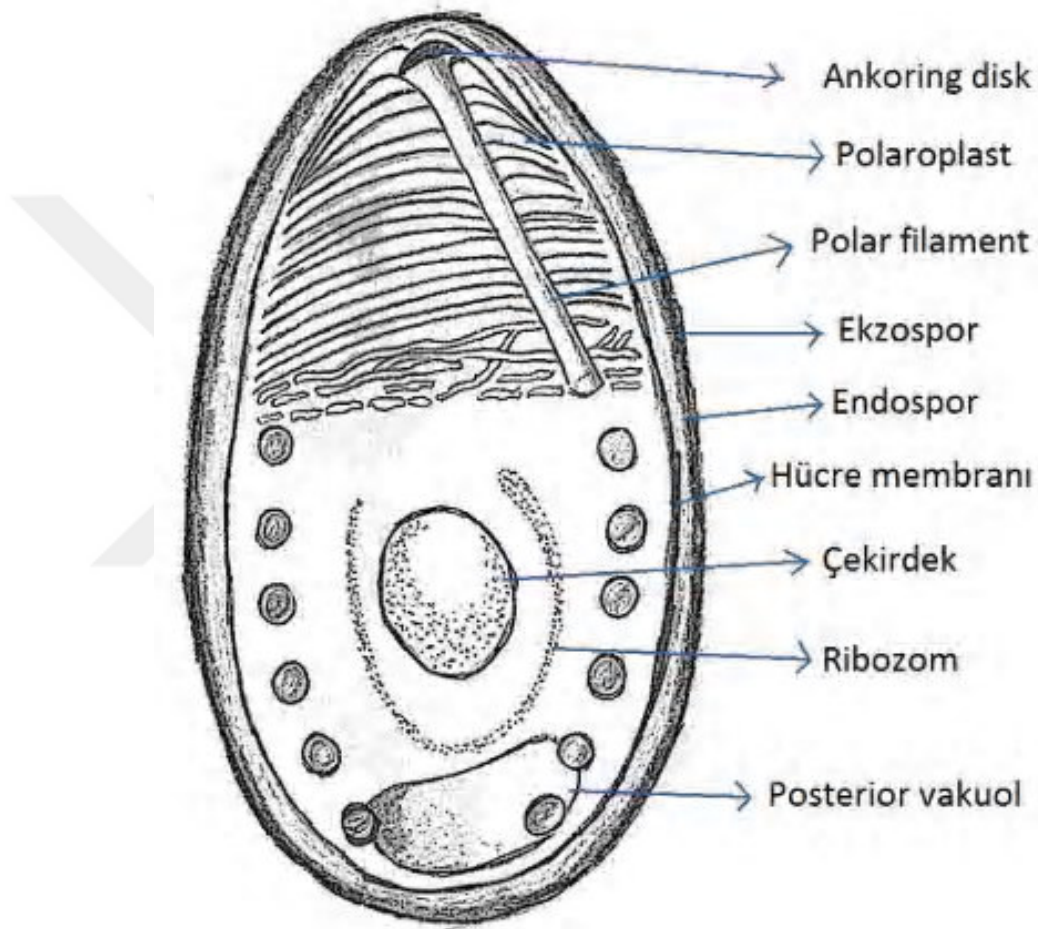
2.2.2 Sporont

Gelişimin bu safhasında ilkin hücreler olarak sporontlar, sporogonik faza geçiş yaparlar. ER ve ribozom artışından dolayı sitoplazmik yoğunluk artışı ve plazmalemma yapısının değişimi sporogoniye geçişin morfolojik değişimleridir. Birçok microsporidia türünde plazmalemmal kalınlaşma karakteristiktir. Membran kalınlaşmanın tamamlanmasını cinslere göre farklılık gösteren nükleer ve hücre bölünmesi takip eder. Nükleer bölünmenin birçok kez tekrarlaması ile hücre genişleyerek çok çekirdekli yuvarlak hale gelmektedir. Sporogonial plasmodium olarak adlandırılan bu yapı, plasmotomy ile bölünerek sporları oluşturur (Cali, 1971; Call ve ark., 1998; Franzen ve ark., 2006).

2.2.3 Spor Morfolojisi

Mikrosporidian parazit sporları konak hücre dışında yaşayabilen, mikroskopik tür ayrımının yapılabildiği tek safhadır. Şekilleri ve büyüklükleri (1.5-7 μm) türlere göre değişiklik göstermekle birlikte genellikle ovaldir. Çevresel şartlara dayanıklı spor duvarı

dıştan içe doğru ekzospor, endospor ve plazma membranı olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır (Bigliardi ve Sacchi, 2001; Han ve Weiss, 2017) (Şekil 2.1). Spor duvar yapısının altında plazma membranı, sporoplazma, polar filament, vakuol ve diğer organeler bulunur.



Şekil 2.1. Microsporidian spor morfolojisi (Çetinkaya, 2014)

Ekzospor; 25-30 nm kalınlığında, proteince zengin ve elektronca yoğun en dış tabakadır. Ekzospor tabakasının dıştan içe doğru dikenli bir tabaka, elektronca zengin lamina ve fibrous tabaka olmak üzere üç katmandan oluştuğu tespit edilmiştir. Kalınlıkları ve yapısı türlere göre farklılıklar içerir. Çevre şartları ve konak hücre ile direkt bağlantılı olan ekzospor proteinleri sinyal, bağlanma ve enzimatik interaksiyonlar gibi önemli fonksiyonları olan proteinleri içermektedir (Bigliardi ve Sacchi, 2001; Franzen ve Müller, 1999; Keeling ve Fast, 2002; Yang ve ark., 2018).

Endospor; 30-35 nm kalınlığında, elektronca fakir ve kitin yapısındadır. Kitin yapısı microsporidiaların floresan boyalarla teşhisine olanak sağlar. Fibril yapısında bağlantılarla ekzosporun en alt tabakasına bağlıdır (Yang ve ark., 2018). Endospor tabakası spor uç kısmında diğer bölgelere göre daha ince yapıdadır (Keeling ve Fast, 2002).

Plazma Membranı; Endospor tabakasının altında sitoplazmayı ve organelleri çevreleyen tabakadır (Didier, 2005). Plazma membranı 7 nm kalınlığında, klasik üç tabakalı unit yapıdadır. Merogoni safhasında plazma membranı konak hücre stoplazması ile veziküler veya tübüler projeksiyonlar ile aktif interaksiyon halindedir (Vavra, 1976).

Sporoplazma; Microsporidian parazitlerin enfektif materyalini oluşturan sporoplazma tek veya diplokaryon çekirdek, ribozom, endoplazmik retikulum ve diğer spor yapılarını içermektedir (Keeling ve Fast, 2002).

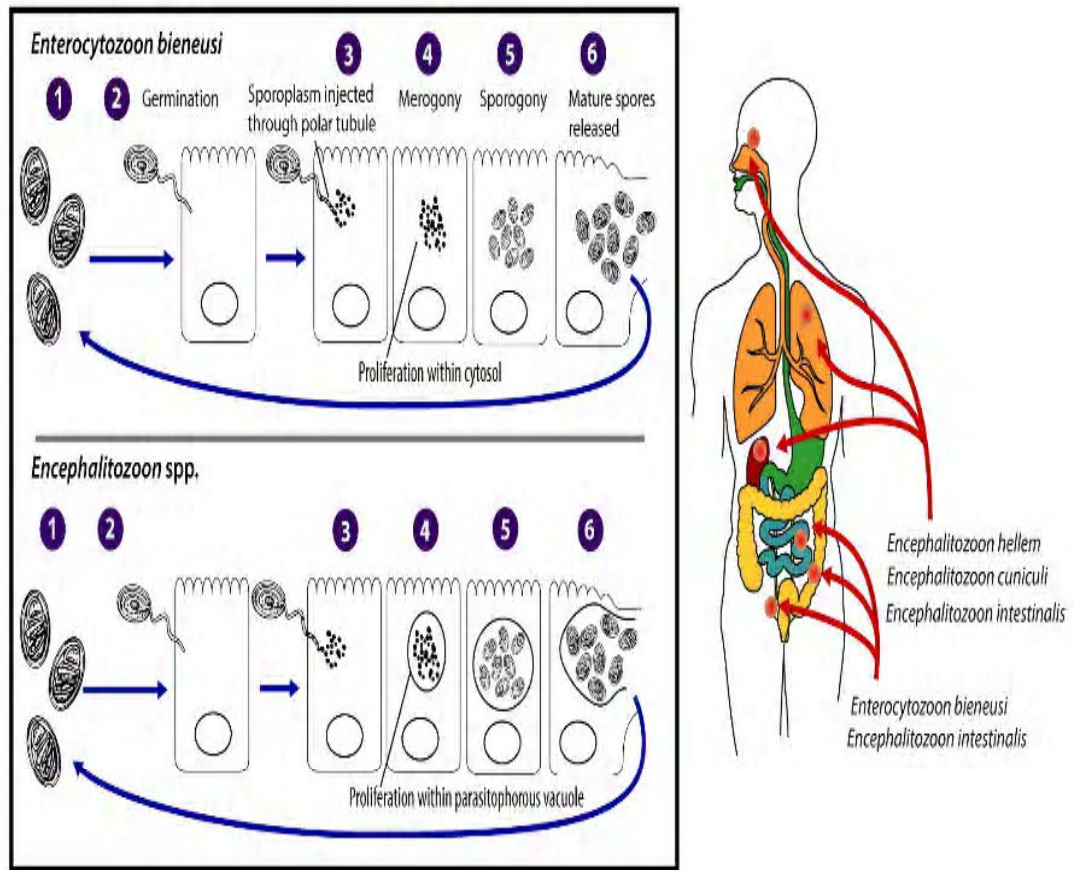
Polaroplast; Atipik golgi cisimciğidir. İki farklı kısımdan oluşan polaroplastın son derece organize olmuş anterior kısmı lamellar polaroplast, daha gevşek yapıda ve sporun ortasına doğru uzanan kısmı ise veziküler polaroplastı oluşturmaktadır (Didier ve ark., 2004; Keeling ve Fast, 2002). Polaroplast ile polar filamentin, polar filament-polaroplast membran kompleksinin aynı olmasından dolayı yakın ilişkili oldukları speküle edilmiştir (Lom ve Corliss, 2007).

Polar Filament; Olgun spordaki en dikkat çekici yapıdır. Membran ve glikoprotein tabakasından oluşmakta, çapı 0.1-0.2 μm uzunluğu 50-500 μm dir. Polar filament sporun anterior kısmında yer alan şemsiye biçimindeki bağlanma (anchoring) diskine bağlanır. Spor uzunluğunun yaklaşık üçte biri ile yarısı boyunca polar filament düzdür ve geri kalanı sporoplazmanın içeriği etrafında sarmal şekilde sarılıdır. Sarmalların sayısı (4-30 sarmal), düzeni, genişliği ve dönüş açıları mikroskobik tür tanımında önemlidir (Didier ve ark., 2004; Franzen, 2004; Sprague ve ark., 1992).

Posterior vakuol; Enfeksiyonda rol alan üçüncü yapı olan posterior vakuol sporun arka kısmında lokalizedir. Polar filament ile fiziksel olarak bağlantılı olan posterior vakuol spor hücresinin yaklaşık yarısını kaplamaktadır. Membran yapısı bazı araştırmacılara göre unit yapıdan oluşurken diğer bazı araştırmacılar dört veya daha fazla katmanlı membran yapısı bulunduğunu ileri sürmektedirler (Keeling ve Fast, 2002; Vinckier ve ark., 1993; Williams, 2009).

2.3 Hayat Döngüsü

Enfektif sporlar solunum, kontamine su ve gıdalar, direkt temas veya bazı türlerde seksüel yolla konağa geçmektedir. Memelilerde ortaya çıkan enfeksiyonun büyük bölümünün solunum ve/veya ağız bulaş yolunu izlediği, vertikal veya transplasental bulaş yolunun daha çok karnivor canlılarda olduğu söylenebilir (Didier ve ark., 2004; Snowden ve ark., 1998). Microsporidian parazitlerin hayat döngüsü enfektif (çevresel) faz, proliferatif (üreme) fazı ve sporogonik faz olmak üzere üç safhadan oluşmaktadır (Chen ve ark., 2017). *E. bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. türlerinin hayat döngüsü Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2 *E. bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. türlerinin hayat döngüsü
<https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis> (Erişim tarihi: 7 Kasım 2019)

2.3.1 Enfektif (Çevresel) Faz

Microsporidian parazitlerin konak hücre dışında aktif fazları, vektörleri veya ara konakları bulunmamaktadır. Bütün microsporidialar çevresel şartlara dayanıklı sporlar oluştururlar. Sporlar apikal uçta anking disk ile son bulan sarmal biçimde polar tüpten oluşan özgün ekstrüksiyon aparatı içerirler (Franzen, 2004). Enfektif sporların konak vücudunda aktif hale geçmesi (germinasyon) türler arası değişiklik göstermekle birlikte pH değişimleri, çeşitli anyon ve katyonların varlığı, dehidrasyon/rehidrasyon, hidrojen peroksit (H_2O_2), UV ve Ca^{++} konsantrasyonu gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal uyarıların etkisi ile olmaktadır (Han ve Weiss, 2017). İlk fizyolojik ve biyokimyasal datalar spor germinasyonu ve polar tüp ekstrüksiyonunun spor içerisine suyun akışı ile oluştuğu şeklindedir. Bu hipoteze göre trehaloz-trehalaz interaksyonu ile intrasporal su miktarı artmakta, ozmotik basınç artışı ile spor germinasyonu mekanizmasının başladığı şeklinde önerilmiştir (Undeen, 1990; Vandermeer ve Gochbauer, 1971). Yapılan bir çalışma da microsporidian sporlarda önemli karbonhidrat depo materyali olan trihaloz düzeyinin çimlenme sırasında büyük oranda azaldığı tespit edilmiş, trihalozun glikoz monomerlerine yıkımı neticesi yüksek oranda suyun hücre içerisine alımının stimüle edildiği fikri ortaya atılmış olmasına rağmen bu kadar karmaşık bir olayın sadece trihalozun monomerlerine yıkımı neticesi olamayacağı, farklı hücresel olaylarında sürece katılacağı değerlendirilmiştir. Sporoplazma endomembran sisteminin spor aktivasyonu sırasında yıkımı neticesi serbest kalan Ca^{++} iyonlarının da hücre içi su alımını arttırdığı, aynı zamanda trihalaz enziminin aktivasyonunda da rol oynadığı ileri sürülmüştür (de Graaf ve ark., 1993; Keeling ve Fast, 2002; Keoghane ve Weiss, 1999). Ancak membran çift tabakalı lipid tabakasından suyun geçişi sınırlı seviyede olmaktadır. Araştırmacılar microsporidiaların sahip olduğu aquaporin moleküllerinin transmembran kanallardan suyun akışını kolaylaştırdığı, oluşan hızlı akımın ozmotik basınç meydana getirdiği ve spor aktivasyonuna neden olduğunu raporlamışlardır (Frixione ve ark., 1992). Bu hipotezin *A. algerae* sporları germinasyonunun aquaporin fonksiyonunu bloke edici gümüş tuzları kullanılarak inhibe edilmesi ile güçlendiği belirlenmiştir (Yang ve ark., 2000). Bu mekanizma ile aktive olan spor polar tüpü düzleşir ve konak hücrelerine bağlanmanın ardından sporoplazmanın boşaltılması ile konak hücreleri enfekte olmaktadır (Keoghane ve Weiss, 1999; Williams, 2009).

2.3.2 Proliferatif (Üreme) faz

Sporoplazmanın konak hücre içerisine boşaltılması ile parazitin hayat döngüsündeki intrasellüler safha olan proliferatif faz başlamaktadır. Bu faz bazı araştırmacılar tarafından şizogoni ve merogoni olarak da tanımlanmıştır. Büyüyerek çoğalan sporoplazma meront olarak ifade edilen yuvarlak, düzensiz veya uzamış biçimde, farklılaşmış sitoplazmaya sahip ve unit tip membranla çevrili hücrelerdir. Merontların konak hücre içerisindeki gelişimleri türlere göre değişiklikler göstermektedir. Genellikle ve diğer hücre içi parazitlerde olduğu gibi herhangi bir fagositik vakuol içerisinde bulunmadan konak sitoplazması içerisinde direkt olarak bulunmaktadır (Örn: *Enterocytozoon* sp. *Nosema* sp. ve *Brachiola* sp. cinslerine ait türler). *Encephalitozoon* spp. cinsine ait türlerde olduğu gibi bazı parazitler enfeksiyonun erken safhasında kendisini çevreleyen bir parazitofor vakuol oluşumunu indüklerken, *Pleistophora* sp. ve *Trachipleistophora* sp. cinsine ait türlerde parazit kendisini çevreleyen sporofor vakuol salgılamaktadır. Bazı parazit türlerinde ise konak meront çevresinde organize olarak paraziti endoplazmik retikulum, mitokondri gibi organelleri ile çevrelemektedir (Örn: *Vittaforma* sp. türleri) (Çetinkaya, 2014; Franzen ve Müller, 1999; Keeling ve Fast, 2002; Weber ve ark., 1994).

Meront çekirdek konfigürasyonu ise cinslere göre farklılıklar göstermektedir. Bazı microsporidialarda tek çekirdek bulunurken (Örn. *Encephalitozoon* spp.) bazılarında ise çiftler halinde (diplokaryon) çekirdek bulunmaktadır (Örn. *S. intestinalis*). Ayrıca her iki çekirdek konfigürasyonuna bazı türlerin farklı yaşam fazlarında rastlanmaktadır (Cali, 1991; Weber ve ark., 1994). Çekirdek sitokinez öncesi tekrar eden ikili veya çoklu bölünerek çoğalır (Karyokinez). Bu aşamada yuvarlak/fazla çekirdekli plazmoidal şekilli (*E. bieneusi*) veya kurdele şekilli/fazla çekirdekli (*E. intestinalis*) hücreler oluşmaktadır (Weber ve ark., 1994). Karyokinezi takiben sitokinez meydana gelir ve sayıları 50 ile birkaç yüz arasında değişen merontlar oluşur. Merontlar olgunlaşarak sporontları oluşturur (Franzen, 2004).

2.3.3 Sporogonik Faz

Sporogoni safhası sporont, sporoblast ve olgun spor olarak üç aşamadan oluşur ve merontların elektron yoğun bir yüzey katmanı ile sporontlara dönüşümü ile başlar. Bu katman ileriki safhalarda spor duvarının ekzospore katmanını oluşturacaktır. Sporontlar

ikiye bölünme veya çoklu füzyon ile çoğalarak, ileri gelişme aşamalarında olgun sporları oluşturacak olan sporoblastları oluşturur. Sporogoni safhası boyunca endoplazmik retikulum ile ribozom varlığı ve organizasyonu artmaktadır. Sporogoni parazitin türüne göre konak sitoplazması içerisinde serbest halde, parazitofor vakuolde veya sporofor vakuolde olmak üzere değişen şekillerde meydana gelebilmektedir. Yapılan histokimyasal işaretleme çalışmaları bölünmeyi takiben homolog membran sistemine sahip golgi ve endoplazmik retikulumun ekstrüksiyon aygıtını (polar filament, polaroplast ve posterior vakuol) oluşturmaktadır. Sporların olgunlaşmasını takiben konak hücre membranı patlayarak olgun sporlar etrafa dağılırlar. Bu sporlar aynı konağın diğer hücrelerini enfekte edebildikleri gibi konak idrar veya dışkısı ile dışarı atılarak yeni konakları enfekte edebilirler (Franzen ve Müller, 1999; Keeling ve Fast, 2002; Keohane ve Weiss, 1999; Weber ve ark., 1994).

2.3.4 Hücre İnvazyon Mekanizmaları

Spor germinasyonu (çimlenmesi) 2 saniyeden daha az bir zaman içerisinde polar tüpü fırlatacak olan gücün oluşturulması, kontrolü ve sporoplazmanın boşaltılması gibi olayları içeren son derece karmaşık ve ilginç hücresel olayları içermektedir. Çimlenme olayı türlere ve habitatlarına göre değişen şekillerde olmak üzere çeşitli kimyasal ve fiziksel olayları da içeren çevresel aktivatörler yoluyla olmaktadır. Tüm bu faktörlerin etkisiyle spor hücre içi ozmotik basınç artmaktadır. Microsporidia sporlarının konak hücrelerini iki farklı yol izleyerek enfekte ettiği deneysel olarak gösterilmiştir. Aktif invazyon olarak tanımlanan ilk yolda; hücre içi artan ozmotik basıncın polar tüpün düzleşmesine ve iç kısmının dış kısım içerisinde kayarak ilerlemesine neden olmakta, uzayan polar tüpün hipodermik iğne gibi sporoplazmayı konak hücre içerisine boşaltmasına neden olmaktadır (Keohane ve Weiss, 1999). Endositozis olarak tanımlanan ikinci yolda ise spor apeksinin konak hücre membranı ile teması sonucu meydana gelen fagositik işlem ile sporun konak hücre içerisine girdiği deneysel olarak gösterilmiştir. Fagosit edilen sporları içeren fagozomlar olgunlaşarak lizozomları oluşturmaktadır. Lizozomlar içerisinde lizozomal yıkımdan kaçan sporoplazmaların polar tüp yoluyla konak hücre sitoplazmasına geçerek enfeksiyonu başlatmaktadır (Bigliardi ve Sacchi, 2001; Çetinkaya, 2014; Franzen, 2005; Magaud ve ark., 1997).

2.4 Epidemiyoloji

İlk kez 1857 yılında Naegeli tarafından (Franzen ve Müller, 1999) tespit edilen microsporidian parazitler omurgalı ve omurgasız çok geniş konak aralığına sahip olup, akut veya kronik enfeksiyonlara neden olarak konakta hayat kalitesini düşürmekte, verim kayıplarına neden olmakta ve hatta ileri klinik tablolarda ölümlere neden olmaktadır. Teknolojik gelişmelere paralel olarak parazitolojik tanı yöntemlerinde de meydana gelen gelişmeler microsporidian parazitlerin memeliler, böcekler ve deniz canlıları gibi çok geniş konak aralığına sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır. İlk insan olgusu 1959 yılında Japon bir çocukta *Encephalitozoon* spp. cinsi tespit edilmiş olup (Matsubayashi ve ark., 1959), 1985 yılında *Enterocytozoon bieneusi* 'ye ait ilk insan olgusu AIDS/HIV enfekte bireyde yeni tür olarak tespit edilinceye kadar 10 insan enfeksiyon olgusu rapor edilmiştir (Desportes ve ark., 1985). Tavuklarda ise *E. bieneusi* türüne ait ilk enfeksiyon olgusu 2002 yılında, *Encephalitozoon* spp. cinsine ait ilk enfeksiyon olgusu ise 1993 yılında tespit edilmiştir (Reetz, 1993; Reetz ve ark., 2002). Lobo ve ark. (2006a) yaptıkları çalışmada 39 kafes kuşu ve 44 papağandan, 5 (%12,8) kafes kuşu ve 19 (%43) papağanın *E. bieneusi* (genotip Peru6) ile enfekte olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar köpeklerde yaptıkları çalışmada ise *E. bieneusi* pozitif iki köpeğin zoonotik karaktere sahip genotip D ve genotip Peru6 ile enfekte olduklarını belirlemişlerdir (Lobo ve ark., 2006b). Sak ve ark. (2010) kuşlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada belirledikleri izolatları, ITS gen bölgesi sekans analizleriyle *E. hellem* genotip 1A (AF338367), *E. hellem* genotip 3 (AF110328) ve *E. cuniculi* genotip II (GQ422153)'de yer aldığını tespit etmişlerdir.

Microsporidiaların enfektif formları çevre şartlarına dayanıklı sporlardır. Rezervuar ve bulaş yolları kesin olarak belirlenememiştir. Enfekte insanlar, hayvanlar ve su kaynakları potansiyel rezervuarlar olarak öne çıkmaktadır. Enfeksiyonun konaktaki lokalizasyonu dikkate alındığında bulaş yolunun fekal-oral, solunum veya oküler enfeksiyonda göze temas ile olacağı değerlendirilmektedir (Anane ve Attouchi, 2010). Gen sekans analizi çalışmalarında hem insan hem de hayvan konaklarda aynı veya yakın genotiplerin tespit edilmesi, zoonotik bulaş yolu için güçlü kanıtlar sağlamıştır. Ayrıca microsporidiosisli HIV pozitif bireylerin hayvanlarla yakın temas halinde olduklarını tespit eden çalışmalar mevcuttur. Hayvan-insan bulaş yolunun tersine insan-hayvan bulaş yolunda mümkün olduğu rapor edilmiştir (Didier ve ark., 2004; Didier, 2005).

Sporların yüzey ve sulama sularında varlığını tespit eden araştırmacılar (Anane ve Attouchi, 2010; Didier ve ark., 2004; Didier, 2005) microsporidiaların su kaynaklı bulaş potansiyelinin bulunduğunu ve enfekte konakların idrar veya dışkıları ile sucul sistemleri kontamine ettiğini ortaya çıkarmışlardır. Sporların çevre şartlarına dayanıklı olması ve boyutlarının çok küçük olması nedeniyle standart filtreleme sistemleri ile filtrasyonunun yapılamaması parazitin yeni konakları enfekte ederek hayat döngüsünü devam ettirmesine olanak sağlamıştır. Microsporidia sporlarının iyi pişirilmeyen et, balık (*Pleistophora* spp.), yeşil sebzeler ve çilek gibi meyvelerde de varlığı tespit edilmiştir (Anane ve Attouchi, 2010; Didier ve ark., 2004; Didier, 2005).

Bazı kemirgen türleri, tavşan ve karnivor konaklarda plasental bulaş yolunun mümkün olduğu bildirilmiştir (Didier, 2005; Franzen ve Müller, 1999).

Bergquist ve ark. (1984) seksüel bulaş yolunu araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, çalışmaya dahil edilen homoseksüel bireylerin %33'ünde *E. cuniculi* antikorlarını tespit etmişlerdir.

Brachiola algerae benzer genotiplerinin insanlar ve sivrisineklerde tespit edilmesi, *Encephalitozoon* spp. türlerinin bazı kene türlerinin bağırsak ve tükürük bezlerinde de tespit edilmesi vektör kaynaklı bulaş yolunun mümkün olabileceği konusunda deliller olmuştur (Cali ve ark., 2005; Didier ve ark., 2004; Didier, 2005).

Ülkemizde farklı konaklarda yapılan sınırlı araştırmalarda microsporidian parazitlerin prevalansı belirlenmeye çalışılmıştır. Karaman (2007) ve Çetinkaya (2014) değişik hasta gruplarında yaptıkları çalışmada sırasıyla %8,5 ve %34,7'sinde, Usluca and Aksoy (2010) immun yetmez bir çocukta microsporidian parazit varlığını belirlemişlerdir. Mumcuoglu ve ark. (2016) akut ve kronik diyare hastası olan immun normal bireylerde yaptıkları çalışmada modifiye trikrom boyama ile %36,4'ünde, Oguz Kaya ve ark. (2018) Calcofluor beyazı ve Uvitex 2B kemiluminesans boyama yöntemleriyle ishalleri 200 hastanın %38,5'inde microsporidian parazit varlığını tespit etmişlerdir. Duzlu ve ark. (2019) köpeklerde yapmış oldukları araştırmada örneklerin %12,4'ünde *E. intestinalis*, %2,1'inde *E. cuniculi* varlığını moleküler olarak tespit etmişlerdir. Kedilerde yapılan bir çalışmada, moleküler analizlerle örneklerin %5,5'inde *E. bienersi* ve %4,1'inde *Encephalitozoon* spp. varlığı tespit edildiği raporlanmıştır (Pekmezci ve ark., 2019). Bilgin (2018) yaptığı çalışmada Sivas yöresinde sağlıklı görünümlü farklı yaş

gruplarındaki sığırlarda *E. bieneusi* prevalansının %19,3 olduğunu moleküler olarak ortaya koymuştur.

Microsporidian parazitlerin dünya üzerinde gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkede enfeksiyonlara neden olduğu farklı konaklar üzerinde yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Santín ve Fayer, 2011) (Tablo 2.3). *E. bieneusi* ITS gen bölgesi analizleri neticesi konak adaptif genotipler ve zoonotik genotipler olarak iki ana grup belirlenmiştir. Bu genotipler insanlarda, hem insan hem de hayvanlarda, sadece hayvan gruplarında rastlanan konak adaptif ve su kaynaklı (konağı bilinmiyor) tespit edilen genotipler olarak dört farklı grupta toplanabilir (Santín ve Fayer, 2009). *E. cuniculi* ITS gen bölgesi analizleri neticesi genotip I (tavşan), genotip II (fare), genotip III (köpek) ve genotip IV olmak üzere dört genotip grubu belirlenmiştir. Bu genotiplerden I, II ve III genotipleri hem insan hem de hayvanlarda tespit edilmiş olup *E. cuniculi* enfeksiyonlarının zoonotik karakterli olabileceğini göstermektedir (Didier ve ark., 1995; Talabani ve ark., 2010). *E. hellem* ITS gen bölgesi analizleri neticesi genotip I, genotip II ve genotip III olmak üzere üç genotip grubu belirlenmiştir (Mathis ve ark., 2005). *E. intestinalis* ITS gen bölgesi analizleri neticesi genotipler arası varyasyon belirlenmiştir (Liguory ve ark., 2000).

Tablo 2.3 İnsan ve diğer hayvan konaklarında tespit edilen *E. bieneusi* genotipleri (Fayer ve Santín-Duran, 2014).

Genotip	Sinonim	Konak	Ülke
Type IV (AF242478)	CMITS1, BEB5, BEB-var, K, Peru2, PtEBIII	İnsan, at, eşek, kedi, köpek, siyah ayı, sincap, fare	Çin, Fransa, İngiltere, Gabon, İran, Hollanda, Nijer, Nijerya, Portekiz, Uganda
WL11 (AY237219)	Peru5	İnsan, kedi, köpek, tilki	Peru, Kolombiya, Amerika,
O (AF267145)		İnsan, domuz	Almanya, Tayland

PigEBITS7 (AF348475)		İnsan, domuz, maymun	Çin, Hindistan, Tayland, Amerika
Peru6 (AY371281)		İnsan, kuş, köpek, kedi, sığır	Portekiz, Peru, Amerika
WL15 (AY237223)		İnsan, maymun, eşek, at, tilki, sincap, rakun	Çin, Çekya, Amerika
D (AF101200)	CEbC, Peru9, PigEBIT9, PtEbV1, WL8	İnsan, domuz, yaban domuzu, sığır, tilki, sincap, rakun, köpek, at, fare, babun, eşek	Brezilya, Kamerun, Çin, Kongo, İngiltere, Gabon, Hindistan, İran, Hollanda, Nijer, Nijerya, Polonya, Portekiz, Peru, Rusya, Tunus, İspanya, Vietnam, Japonya, Amerika, Abu Dabi, Kolombiya, Çekya, Almanya, Kenya, Malawi.
S6 (FJ439682)		İnsan, fare	Çin, Almanya, Çekya
Peru8 (AY371283)		Eşek, insan, maymun, <u>tavuk</u> , fare	Çin, <u>Peru</u> , Çekya, Almanya, Malawi
CZ3 (GU198951)		İnsan, fare	Çekya, Almanya
C (AF101199)	TypeII	İnsan	Fransa, Almanya, Çekya, Portekiz, İsviçre
BEB4 (AY331008)	CHN1	İnsan, fare, sığır	Çekya, Çin, Arjantin, Güney Afrika, Amerika
EbpA (AF076040)	F	Domuz, insan, yaban domuzu, at, fare, sığır, kuş	Çin, Çekya, Nijerya, Polonya, Almanya,

PigITS5 (AF348173)	PEbA	İnsan, domuz, fare	Çekya, Japonya, Kore, Amerika, Almanya
I (AF135836)	BEB2, CEbE	İnsan, maymun, sığır	Çin, Arjantin, Çekya, Almanya, Kore, Güney Afrika, Amerika
J (AF135837)	BEB1, CEbB, PtEbX	İnsan, sığır, <u>tavuk</u>	Çin, Arjantin, <u>Almanya</u> , İran, Kore, Portekiz, Amerika
CHN3 (HM992511)		İnsan, sığır	Çin
CHN4 (HM992512)		İnsan, sığır	Çin
WL12 (AY237220)		İnsan, kunduz, su samuru	Brezilya, Amerika
PtEbII (DQ425108)		İnsan, kuş	Portekiz
EbpD (AF076043)		İnsan, domuz	Çin, İsviçre
WL7 (AY237215)		İnsan, kunduz	Nijerya, Amerika
Henan-I (JF691564)		İnsan, domuz, yaban domuzu	Çin, Avusturya
Henan-III (JF691566)		İnsan, domuz	Çin
Henan-IV (JQ029727)		İnsan, domuz	Çin
Henan-V (JQ029728)		İnsan, maymun, eşek	Çin

2.5 Klinik ve Patogenez

Microsporidian parazitler konak vücudunda herhangi bir organ veya dokuya yerleşim gösterebilmelerine rağmen bazı türleri konak, organ, doku veya hücreye tropizm

gösterebilmektedirler. Örneğin sindirim sistemine yerleşen türlerden *E. bienewisi* bağırsak villuslarının apikal ucuna tropizm gösterirken, *E. intestinalis* bağırsak villuslarına, makrofajlara, fibroblastlara ve koryonun endotel hücrelerine de yerleşim gösterebilmektedir (Anane ve Attouchi, 2010; Contreas ve ark., 2000). Microsporidiosis klinik seyri, konağın bağışıklık durumuna ve enfeksiyon bölgesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Microsporidian parazit türleri esas olarak HIV pozitif veya immun sistemi baskılanmış bireylerde gözlenebilse de yaşlılar, çocuklar, turistler gibi immun normal bireylerde de asemptomatik olarak gözlenebilmektedir. *E. bienewisi* intestinal enterositlerin yanı sıra ince bağırsak lamina propria hücrelerini, safra kesesi ve yollarını, karaciğer hücrelerini, pankreatik kanalları, solunum sistemi epitelyum hücrelerini de enfekte edebilmektedir (Didier ve ark., 2004; Franzen ve Müller, 1999). *Encephalitozoon* spp. türleri ise genel olarak makrofajlar, farklı doku ve sistemlere ait epitelyum hücreleri, fibroblastlar, safra yolları vb. dokulara ait hücreleri enfekte edebilmelerinin yanı sıra *E. cuniculi* beyin ve böbrek dokularına ait hücreleri de enfekte edebilmektedir (Weber ve ark., 1994).

2.5.1. Gastrointestinal Tutulum

Sindirim sistemi enfeksiyonları sıklıkla HIV pozitif bireylerde gözlenmektedir. İzole edilen türler *E. bienewisi* (en sık), *E. intestinalis* ve *E. cuniculi*'dir. Parazitin bağırsak mukozasına yerleşimi ile epitelyumda yağ birikimi, düzleşme, villuslarda atrofi ve emme yüzeyinde %40'a kadar azalma meydana gelmektedir. İntestinal microsporidiosis temel işareti ishaldir. Dışkı genellikle sulu, kansız ve mukus içermez. Ateş, iştahsızlık, karın ağrısı ve kilo kaybı diğer klinik belirtileridir. İshal immun yetmez konaklarda genellikle birkaç ay sürebilirken immun normal bireyler de klinik belirtiler kendi kendini sınırlayabilmektedir. Nadir de olsa asemptomatik microsporidiosis gözlenebilir (Anane ve Attouchi, 2010; Costa ve Weiss, 2000; Franzen ve Müller, 1999).

2.5.2 Oküler Tutulum

Gastrointestinal tutulumdan sonra en fazla rastlanılan microsporidiosis türüdür. Oküler microsporidiosis ise iki farklı klinik tabloda rastlanmaktadır. Klinik tablolardan ilki immun yetmez konaklarda gözlenen keratokonjunktivit olup üç *Encephalitozoon* spp. türü de enfeksiyona neden olmaktadır. Keratokonjunktivit asemptomatik, orta veya şiddetli

olabildiği gibi nadiren kornea ülserasyonu da gözlenebilir. Gözde ağrı, aşırı yaşarma, görme kaybı diğer klinik belirtileridir. Korneal stroma keratit ise sağlıklı ve immun yetmez konaklarda açığa çıkabilmektedir. Enfeksiyonlar *Vittaforma cornea*, *Nosema ocularum* ve *Microsporidium* spp. 'nin neden olduğu olgular şeklinde gözlenmiştir (Anane ve Attouchi, 2010; Franzen ve Müller, 1999; Weber ve ark., 1994).

2.5.3 Hepatik, Üriner ve Pankreatik Tutulum

E. cuniculi kaynaklı hepatitis enfeksiyonu ishal, yorgunluk ve kilo kaybı şikayetli, hepatosellüler nekrozis sonucu ölen 35 yaşında HIV pozitif hastada rapor edilmiştir. *E. bineusi* ve *E. intestinalis* kaynaklı enfeksiyon HIV pozitif bir hastanın nonparankimal karaciğer hücrelerinde tespit edilmiştir. Üriner sistem enfeksiyonları konak immun durumuna bağlı olarak asemptomatik olabileceği gibi, sistit, intestinal nefrit, hematuri, böbrek fonksiyon bozuklukları gibi semptomlar açığa çıkabilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonları genellikle *Encephalitozoon* spp. kaynaklıdır. *Trachipleistophora antropophthera* kaynaklı pankreatik enfeksiyon HIV pozitif bireyde *E. bineusi* kaynaklı pankreatik enfeksiyon rapor edilmiştir (Anane ve Attouchi, 2010; Weber ve ark., 1994; Yachnis ve ark., 1996).

2.5.4 Serebral Tutulum

Serebral microsporidiosis olguları tür tanımı yapılamamış *Encephalitozoon* spp. kaynaklı iki çocukta rapor edilmiştir. Her iki olguda da baş ağrısı, bulantı, kusma, spastik konvulsiyonlar gözlenmiş olup idrar ve serebrospinal sıvı incelemesinde parazit varlığı tespit edilmiştir. *E. cuniculi* kaynaklı serebral microsporidiosis HIV pozitif hastada belirlenmiş, baş ağrısı, bulantı, kusma, görme ve bilişsel bozukluklar gibi semptomlar rapor edilmiştir. Dissemine *Trachipleistophora anthropophthers* kaynaklı serebral microsporidiosis HIV pozitif iki olgu rapor edilmiştir (Costa ve Weiss, 2000; Franzen ve Müller, 1999; Weber ve ark., 1997).

2.5.5 Pulmoner Tutulum

Pulmoner microsporidiosis diğer microsporidial enfeksiyonlara göre daha az rastlanmaktadır. HIV pozitif hastalarda dissemine *Encephalitozoon* spp. enfeksiyonunda

bronşiyal epitelyum hücrelerinde üç *Encephalitozoon* türüne de rastlandığı rapor edilmiştir (Franzen ve Müller, 1999). *E. bienewisi* kaynaklı pulmoner microsporidial enfeksiyon iki hastada tespit edilmiştir (Botterel ve ark., 2002; Franzen ve Müller, 1999; Sodqi ve ark., 2004).

2.5.6 Diğer Enfeksiyonlar

HIV pozitif iki hastada, tür tespiti yapılamamış *Encephalitozoon* spp. kaynaklı üretrit ve sinüzit tespit edilen hastaların idrar, dışkı ve balgam örneklerinde parazit varlığı tespit edilmiştir. *E. hellem* kaynaklı prostat enfeksiyonu HIV pozitif bir hastanın prostat dokusunda periüretral abse belirlenmiş olup, indirekt fluoressan incelemede parazitin *E. hellem* olduğu tespit edilmiştir. HIV pozitif, dissemine *E. cuniculi* enfeksiyonlu bir hastanın dili üzerinde oluşan ülserasyonlu bölgeden alınan örneklerin moleküler analizler ve immuno fluoressan boyama ile mikroskopik incelemesinde parazit sporlarının *E. cuniculi* olduğu belirlenmiştir. HIV pozitif iki hastanın iskelet sisteminde ve bir hastanın cildinde ise kutanöz microsporidiosis tespit edilmiş olup, her iki olguda da tür tayini yapılamamıştır (Franzen ve Müller, 1999).

Tablo 2.4 Microsporidiaların yerleştiği dokular ve klinik belirtileri

<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	İnce bağırsak, safra yolları, solunum sistemi	Diyare, yetersiz beslenme, kolanjit, rinit, bronşit
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	İnce bağırsak, safra yolları, solunum sistemi, göz dokusu	Diyare, intestinal perforasyon, kolanjit, nefrit, dissemine enfeksiyon, keratokonjonktivit
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Sistemik	Hepatit, ensefalit, peritonit, üretrit, nefrit, sinüzit, sistit, keratokonjonktivit, dissemine enfeksiyon
<i>Encephalitozoon hellem</i>	Göz dokusu, böbrek, solunum sistemi	Keratokonjonktivit, sinüzit, nefrit, üretrit, sistit, diyare, pneumonia, prostatit

<i>Nosema ocularum</i>	Göz dokusu	Stromal keratit
<i>Vittaforma cornea</i>	Göz dokusu, üriner sistem	Keratokonjonktivit, üretrit
<i>Pleistophora ronneafiei</i>	Kas dokusu	Miyozit
<i>Anncaliia (Brachiola) algerae</i>	Göz dokusu	Miyozit, keratokonjonktivit
<i>Trachipleistophora hominis</i>	Göz dokusu, kas dokusu	Miyozit, keratokonjonktivit, sinüzit, ensefalit
<i>Trachipleistophora anthropophthera</i>	Göz dokusu, sistemik	Ensefalit, keratokonjonktivit, dissemine enfeksiyon
<i>Microsporidium africanum</i>	Göz dokusu	Stromal keratit
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	Göz dokusu	Stromal keratit

2.6 İmmunoloji

Microsporidialar etkin ve gelişen parazitlerdir. İnsanlarda enfeksiyona neden olan türlerin büyük kısmının doğal veya deneysel olarak hayvanlarda da enfeksiyona neden olması microsporidiosis'e karşı konak immün yanıtın anlaşılmasında önem arz etmektedir. İnsanlarda en sık enfeksiyona neden olan *Enterocytozoon bieneusi* ve *Encephalitozoon* spp. cinsine ait türlerdir. Ancak *Encephalitozoon* spp. türlerinin, *Enterocytozoon bieneusi*'ye oranla uzun süreli doku kültürünün başarılı biçimde yapılabilmesi konak-parazit ilişkisinin ve oluşan immün yanıtın anlaşılması için model oluşturulması çalışmalarında *Encephalitozoon* spp. türlerinin özellikle de *E. cuniculi*'nin daha çok tercih edilmesine neden olmuştur (Desportes ve ark., 1985; Visvesvara, 2002). Microsporidioisise karşı oluşan immün yanıt konağın immün durumuna ve parazitin türüne göre değişiklik göstermektedir. Enfeksiyona karşı konakta spesifik ve spesifik

olmayan birçok savunma mekanizması rol oynamaktadır. Makrofajlar doğal ve adaptif immün sistemleri arasında önemli bağlantı fonksiyonuna sahiptir. Yüzeylerinde bulunan örgü tanıma reseptörleri (PRR) aracılığı ile patojen tanınmasında ve erken cevabın oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar. Patojen tanınması sonucu sitokinler, kemokinler, nitrik oksit (NO), indüklenmiş nitrik oksit sentaz (iNOS) ve radikal oksijen türleri gibi kemoatraktan mediatörlerin sentezi indüklenir. Fagositozis konak hücrenin diğer bir savunma mekanizmasıdır. Ancak çeşitli çalışmalar microsporidiaların fagozom ve lizozom füzyonunu inhibe ettiği ve fagolizozomal kompartmanlarda microsporidian sporların bulunduğunu göstermiştir (Valencakova ve Halanova, 2012). *E. cuniculi* sporlarının oral yoldan alınması sonrası intraepitelyal lenfositlerin (IEL) miktarında hızlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (Moretto ve ark., 2007). Enfeksiyonun 7. gününde IEL sitotoksik etkili sitokinlerin (IFN- γ ve IL-10) artışı indüklemektedir. Niederkorn ve ark. (1981) yaptıkları çalışmada *E. cuniculi* enfekte farelerdeki enfekte konak hücreleri öldürebilen ve fagositik olmayan doğal öldürücü (NK) hücreleri aktivitesinin sağlıklı farelere göre daha yüksek düzeyde olduklarını tespit etmişlerdir. Microsporidian enfeksiyonlara karşı defansinler ve lizozim gibi konak mukozal sekresyonlarında savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Ancak farklı türlerin oluşturduğu enfeksiyonlara karşı farklı defansinlerin savunmada rol oynadığı ileri sürülmüştür (Valencakova ve Halanova, 2012). Araştırmacılar microsporidiosis'e karşı konak immün yanıtın oluşmasında TLR4'ünde önemli rol oynadığını ortaya koymuşlardır (Lawlor ve ark., 2010). Microsporidian antiijenlere karşı konak humoral immün yanıtın önemli komponentleri olan spesifik antikorlarında enfeksiyon sırasında üretimlerinin arttığı belirlenmiştir. Microsporidiosis'e karşı antikorlar makrofaj kökenli fagositozu başlatan opsonik fonksiyonu indüklerler. İmmün sağlıklı deney hayvanlarında enfeksiyonun 2. haftasında IgG antikor cevabının oluştuğu, 5-6. haftalarda en üst seviyeye ulaştığı ve yaşam boyu sürdüğü tespit edilmiştir (Cox ve ark., 1977). Konak savunmasında hücrel immün yanıt da önemli rol oynamaktadır. Hücrel immün yanıt CD4⁺ reseptör taşıyan Th-lenfositler, CD8⁺ reseptör Tc-lenfositler ve CD3⁺ reseptör TCR- $\alpha\beta$ tarafından aktive edilmektedir. T-lenfosit subtiplerinin hücrel immün yanıtın patojen ile savaşındaki rolü açık ve kesin olmakla birlikte fonksiyonları tam olarak açıklanamamıştır. CD4⁺ T-lenfosit yokluğunun CD8⁺ T-lenfosit indüksiyonunu etkilemediği, dolayısı ile immün yanıtın etkilenmediğini speküle edilmiştir. HIV pozitif bireylerde klinik microsporidiosis kan

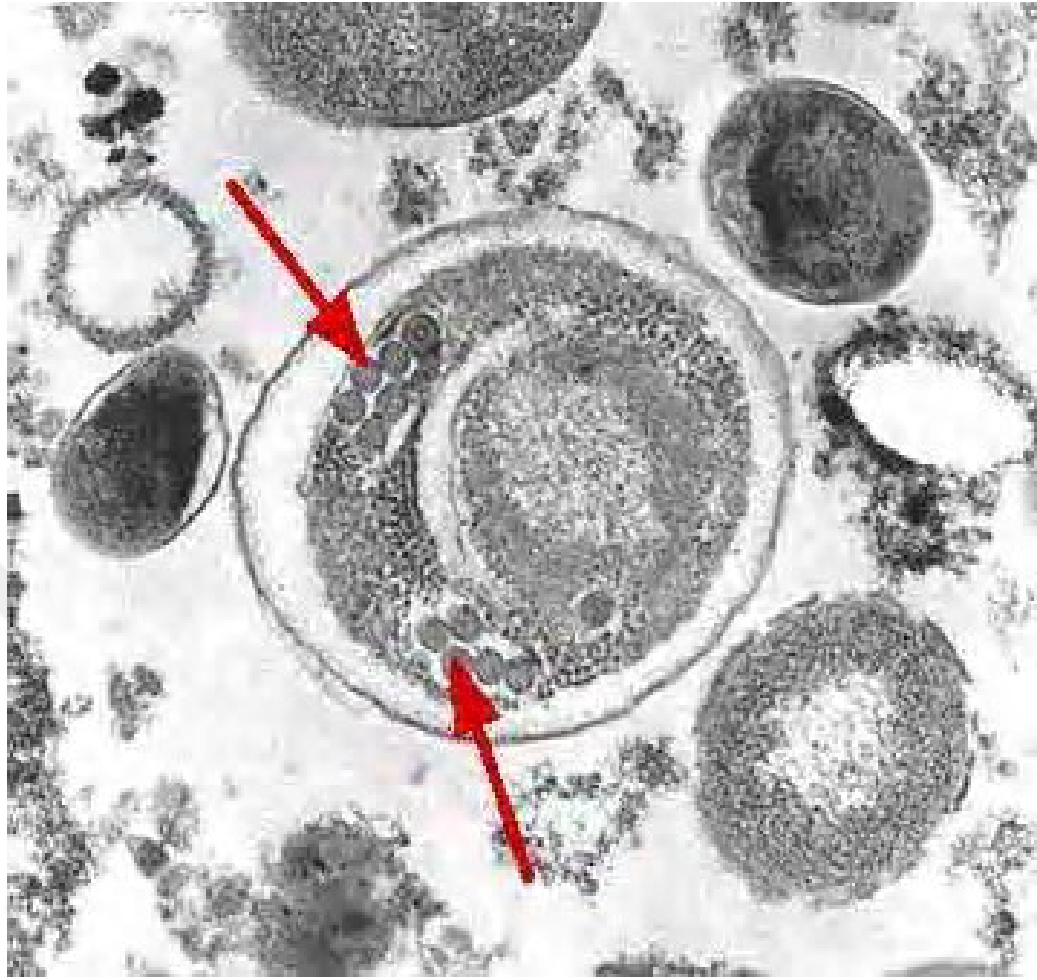
CD4⁺ T-lenfosit seviyesini 100/mm³ seviyesinin altına düştüğü belirlenmiştir (Valencakova ve Halanova, 2012).

2.7 Tanı

Microsporidiosis tanısı dışkı, duodenal veya safra suları, idrar, konjonktival sürüntü, bronkoalveolar lavaj sıvısı, nazal çıkartılar veya biyopsi materyalleri gibi klinik örneklerde microsporidian sporların teşhisi ile olmaktadır. Dışkı örnekleri enfeksiyonun erken dönem teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Bahse konu örneklerde sporların tespiti, boyutlarının çok küçük olması nedeni ile kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Teknolojik anlamda yaşanan gelişmelere paralel olarak yeni boyama tekniklerinin geliştirilmesi ve moleküler metotların tanı ve araştırma laboratuvarlarında yaygın biçimde kullanılmaya başlaması microsporidiosisin teşhisinde olumlu gelişmeler ortaya çıkarmıştır (Franzen ve Müller, 1999).

2.7.1 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Microsporidiaların standart mikroskopik teşhisinde elektron mikroskobu özellikle moleküler yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda kesin sonuç vermesi bakımından değerlidir. Elektron mikroskobisi ile sporların büyüklük, morfoloji, polar tüp sarmal sayısı, proliferatif formları, bölünme biçimleri belirlenebilmekte, konak hücre-parazit ilişkileri değerlendirilebilmektedir (Şekil 2.3). Bu teknik dışkı ve diğer vücut sıvılarında microsporidiaların identifiyesinde başarılı biçimde kullanılıyor olsa da az miktarda örnek kullanılmasından dolayı düşük sensiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca parazit cins ve türlerinin taksonomik sınıflandırılmasında da elektron mikroskobisinden yararlanılmaktadır. Ancak bu teknik pahalı olması, ön hazırlık aşamasının zaman alıcı olması, uzman personel gereksinimi vb. dezavantajları da içerisinde barındırmaktadır (Weber ve ark., 1994).



Şekil 2.3 *E. bienersi* elektron mikroskobu görüntüsü. Oklar çift sıra polar tüp sarmalını göstermektedir. <https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis> (Erişim tarihi: 7 Kasım 2019)

2.7.2 Işık ve Floresan Mikroskobu

Rutin tanı laboratuvarlarında microsporidian parazitlerin tanısı farklı boyama teknikleri kullanılarak ışık veya floresan mikroskobisi ile olmaktadır. Ancak bu yöntem enfeksiyonun tanısı için yeterli olsa da cins ve tür ayrımı yapılamamaktadır (Franzen ve Müller, 1999). Microsporidia spor duvarı protein yapısında ekzospor ve kitin yapısında endospor olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Spor duvarının bu özelliği microsporidian sporlarının gram, giemsa, trichrome ve floresan boyalarla boyanmasına imkân sağlar. Ancak gram ve giemsa boyaları dışkı ve/veya vücut sıvıları gibi klinik örneklerdeki diğer elementler ile sporlar arasında kontrast oluşturamamasından dolayı tanıda uygun görülmemektedir. Dışkı incelemelerinde en yaygın kullanılan boyama

yöntemleri Chromotrope 2R, Calcofluor white M2R ve Uvitex 2B'dir (Ghosh ve ark., 2014). Weber ve ark. (1992) geliştirdikleri Chromotrope tabanlı boyama tekniği klinik örneklerdeki sporların tespiti konusunda önemli katkılarda bulunmuştur. Bu boyama tekniği ile sporlar ovoid görünümlü, spor duvarı parlak kırmızı/pembe, spor içeriği saydam, zemin ise mavi veya yeşil renkte görünmektedir. Ayrıca polar filament ile bağlantılı ekvatoriyal çizgiler de gözlenebilmektedir. Parazit spor duvarında bulunan kitini hedef alan Calcofluor white M2R ve Uvitex 2B fluorometrik boyalarda tanıda kullanılabilmektedir. 350-440 nm dalga boylu filtreler kullanılarak, floresan mikroskopunda spor duvarları turkuaz-beyaz renkte gözlenmektedir. Calcofluor white M2R tekniği ile sporların canlılıkları da tanımlanabilmektedir. Her iki yöntemin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Anane ve Attouchi, 2010; Çetinkaya, 2014).

Microsporidiaların boyutlarının çok küçük olması, mikroskopik tanı öncesi vücut sıvısı örneklerinin santrifüje edilmesi faydalı olacaktır. Ancak dışkı örneklerine tanı öncesi farklı konsantrasyon tekniklerinin uygulanması konusunda farklı görüşler mevcuttur. Bir kısım araştırmacılar formalin-etil asetat tekniği veya flotasyon metodunun spor kaybına neden olduğu ve yanlış tanı riskini artırdığını savunmuşlardır. Diğer bir kısım araştırmacılar ise su-eter sedimentasyon tekniği veya KOH uygulaması-santrifüj tekniğinin spor miktarını artırdığını savunmuşlardır (Franzen ve Müller, 1999).

2.7.3 Serolojik Yöntemler

Microsporidiaların tanısında İndirekt Floresan Antikor Test (IFAT), Western Blot, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), İmmunofloresans Test (IFA) gibi serolojik testler kullanılmaktadır. Uygulama kolaylığı bakımından IFAT ve ELISA bu testlerden en yaygın kullanılan testler olmasına rağmen bu testlerin spesifite ve sensitiveleri net olarak tanımlanamamıştır (Franzen ve Müller, 1999). İmmun baskılanma veya yetersizlik durumlarında meydana gelebilecek antikor üretimi yetersizliği, diğer türler ile çapraz reaksiyon veya non-spesifik reaksiyonlar serolojik tanıya yanlışlıklara neden olabilecektir (Garcia, 2002). Serolojik testler ile özellikle *E. cuniculi* IgG ve IgM antikorları tespit edilebilmektedir. *E. bieneusi*'nin uzun süreli kültüre edilememesi sonucu antijen geliştirilememesi nedeni ile bu türe karşı serolojik test bulunmamaktadır. İnsanlarda patojen microsporidiaların (*E.bieneusi*, *Encephalitozoon* spp.) bazı türlerine

karşı parazit spor duvarı veya polar tüpüne yönelik monoklonal ve poliklonal antikorlar geliştirilmiştir. Bazı araştırmacılar bu IFA testinin sensivitesini moleküler testlerden düşük olarak tanımlarken bazı araştırmacılar tarafından eşit olarak tanımlanmışlardır (Singh ve ark., 2005)

2.7.4 Histolojik Yöntemler

Microsporidian sporları rutin histolojik fiksatifler kullanılarak fiks edilmiş dokuların modifiye Chromotrope 2R ve Gram boyama vb. boyama teknikleri ile hazırlanmış doku preparatlarında kolaylıkla tespit edilebilmektedir (Garcia, 2002). Özellikle Brown-Brenn veya Brown-Hopps gram boyama yöntemleri ile teşhiste avantaj sağlamaktadır. Gram boyama ile boyanan doku kesitlerindeki sporlar koyu mavi veya kırmızı renkte boyandığı belirlenmiştir (Franzen ve Müller, 1999). Warthin-Starry (Field ve ark., 1993) gibi gümüş boyalar veya modifiye kromotrof tabanlı trikrom boyamalar histolojik incelemelerde tercih edilmektedir. Özellikle Warthin-Starry boyama ile sporlar normal boyutlarına göre daha büyük olarak görülebilmektedir (Çetinkaya, 2014). Microsporidian sporlar hematomksilen-eosin boyama yöntemi ile de boyanabilmesine rağmen teşhis edilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (Marc Orenstein ve ark., 1990).

2.7.5 Hücre Kültürü ve Hayvan Modeli

Bazı microsporidian türlerinin in vitro kültürünün yapılabilmesi konak-parazit ilişkisini anlamamızda, tanı ve tür teşhisi için immünolojik araçların geliştirilmesinde ve tedavi edici antimikrobiyal ajanların etkilerinin belirlenmesinde önemli faydalar sağlamaktadır. Microsporidialar Vero, RK13, MRC-5, MDCK hücre hatlarında başarılı biçimde kültüre edilebilmektedir. *E. bienewisi* 'nin ise kısa süreli (6 ay) kültüre edilebildiği belirlenmiştir. BALB/c ve C57B1/6 atimik farelerin *E. cuniculi*, *E. hellem* ve *V. cornea* gibi parazitler için intraperitoneal enfeksiyon hayvan modelinin yapılabildiği, *E. bienewisi* enfeksiyonu için hayvan modelinin zor olduğu tespit edilmiştir (Franzen ve Müller, 1999; Weber ve ark., 1994).

2.7.6 Moleküler Yöntemler

Son yıllarda teknolojik alanda yaşanan gelişmelerin bilimsel alanda gösterdiği yansımalar neticesi klinik tanı laboratuvarlarında kullanılan diğer tanı yöntemlerine ek olarak ve ayrıca araştırma laboratuvarlarında da moleküler teşhis yöntemlerinin yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. Nükleik asit tabanlı tanı yöntemleri spesifik ve bir diziye tamamlayıcı sentetik DNA moleküllerini kullanır. Moleküler tabanlı yöntemlerde de diğer tanı ve teşhis yöntemlerinde kullanılan klinik örnekler kullanılmaktadır. Bu örneklerden DNA ekstraksiyonu klasik protokoller ile yapılabileceği gibi ticari kitler kullanılarak da yapılabilmektedir. Ancak microsporidian parazitlerin güçlü spor duvar yapısından dolayı ekstraksiyon protokollerinde modifikasyonlar yapılmasını zorunlu kılmakta ve spor duvarının fiziksel veya kimyasal ajanlar kullanılarak parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla %0,5 NaClO, kitinaz, guanidin tiyosiyanat, %10 formalin, 1M KOH, DTT, CTAB, kaynatma ve cam boncuk kullanımı gibi işlemlerin yapılmasının başarı oranını artırdığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Dışkı örneklerinden elde edilen DNA ekstraktlarında bulunan PCR inhibitörlerinin inaktivasyonu için standart dilüsyon işlemi ve guanidin tiyosiyanat kullanılması işlevsel olduğu belirlenmiştir (Boom ve ark., 1990; Fedorko ve ark., 1995; Ombrouck ve ark., 1997).

Microsporidialar diğer ökaryotlarla karşılaştırıldıklarının da çok küçük genoma sahiptirler. Pulse-Field jel elektroforezi çalışmaları neticesi bazı türlerinin haploid genomları 5.3-19.5 Mb olarak tespit edilmiştir. *E. cuniculi* haploid genomu 2.9 Mb olarak diğer microsporidia türlerinden daha küçüktür (Franzen ve Müller, 1999). Microsporidialar ökaryotik organizmalar olmalarına rağmen rRNA genleri prokaryotik sekans özellikleri göstermektedir. rRNA gen bölgesi transkripsiyonu yapılmayan ara bölge ile ayrılan 16S SSU rRNA ve 23S LSU rRNA genlerinden oluşmaktadır. Diğer ökaryotik türlerden farklı olarak microsporidialar 5.8S rRNA gen bölgesi ve genler arası ikinci ara bölge bulundurmazlar. Ayrıca SSU ve LSU rRNA genleri tipik SSU ve LSU rRNA genlerinden daha kısadır ve çeşitli universal sekanslardan yoksundur (Vossbrinck ve Woese, 1986).

Microsporidiaların PCR tabanlı moleküler tanısında SSU rRNA, LSU rRNA, α/β -tubulin, polar tüp proteini, ITS gen bölgesi ve actin gen bölgesi gibi gen bölgelerini amplifiye eden primerler kullanılmaktadır (Çetinkaya, 2014; Weber ve ark., 1994). Microsporidian genomu rRNA gen bölgesinin korunmuş ve değişken gen bölgelerinin sekans dizilerinin

bilinmesi, PCR tabanlı çalışmalarda microsporidian tür spesifik veya genel primer setlerinin dizayn edilmesine olanak sağlamıştır. Bazı primer setleri ile çoğaltılan amplikonların restriksiyon enzimleri ile daha küçük parçalara ayrılması ile tür tayini net olarak yapılabilmektedir (Franzen ve Müller, 1999). *E. bienewsi* ve *Encephalitozoon* spp. türlerinin PCR tabanlı tanısında kullanılan tür spesifik ve genel primer örnekleri Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5 *Enterocytozoon bienewsi* ve *Encephalitozoon* spp. tanısında kullanılan tür spesifik ve genel primer çiftleri

Primer çifti sekansı (5'-3')	Primer	Tür	Hedef gen bölgesi	Amplikon büyüklüğü (bp)	Referans
5'-GAAACTTGTCCTCCTTACG-3' 5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3'	EBIEF1 EBIER1	<i>E. bienewsi</i>	SSU rRNA	607	(da Silva ve ark., 1996)
5'-TCAGTTTTGGGTGTGGTATCGG-3' 5'-GCTACCCATACACATCATTC-3'	Eb.gc Eb.gt	<i>E. bienewsi</i>	SSU rRNA, ISR, LSU rRNA	210	(Coyle ve ark., 1996; Franzen ve Müller, 1999)
5'-TTTCGAGTGTAAGGAGTCGA-3' 5'-CCGTCCTCGTTCTCCTGC-3'	SINTF1 SINTR	<i>E. intestinalis</i>	SSU rRNA	520	(Da Silva ve ark., 1997)
5'-TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA-3' 5'-GTAAAAACACTCTCAGCTCA-3'	Ehel-F Ehel-R	<i>E. hellem</i>	SSU rRNA	547	(Franzen ve Müller, 1999)
5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3' 5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3'	Ecun-F Ecun-R	<i>E. cuniculi</i>	SSU rRNA	549	(Franzen ve Müller, 1999)
5'-CACCAGGTGATTCTGCCTGAC-3' 5'-CCTCTCCGGAACCAAACCTG-3'	PMP1 (V1) PMP2	<i>E. bienewsi</i> , <i>Encephalitozoon</i> spp.	SSU rRNA	250,268- 279	(Fedorko ve ark., 1995)
5'-CACCAGGTGATTCTGCC-3' 5'-GTGACGGGCGGTGTGTAC-3'	C1 C2	<i>E. bienewsi</i> , <i>Encephalitozoon</i> spp.	SSU rRNA	1200	(Raynaud ve ark., 1998)

5'-TGAATGKGTCCTGT-3' 5'-GGAATTCACACCGCCGTCRY TAT-3' 5'-GTTTCATTCGCACTACT-3' 5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTCCAGG GAG-3'	MSP1 MSP3 MSP2A MSP4A	<i>E. cuniculi</i> <i>E. intestinalis</i> <i>E. hellem</i>	SSU rRNA, ISR, LSU rRNA	289-305	(Katzwinkel- Wladarsch ve ark., 1997; Katzwinkel- Wladarsch ve ark., 1996)
5'-CCAGGUTGATUCTGCCUGACG-3' 5'-TUACCGCGCCUGCUGGCAC-3' 5'-AAGGAGCCTGAGAGATGGCT-3' 5'-CAATTGCTTACCCTAAGGTC-3'	Mic3U Mic42IU Mic3U Mic42IU	<i>E. bienersi</i>	SSU rRNA	132	(Kock ve ark., 1997)

PCR yöntemi sayesinde filogenetik olarak korunmuş gen bölgelerinin amplifiyesi ve sekans analizlerinin yapılması ile türlerin filogenetik karakterizasyonu ve zoonotik potansiyelleri ile ilgili veriler sağlamaktadır (Weiss ve Vossbrinck, 1999). Bazı araştırmacılar tarafından microsporidiaların floresans boyalar veya floresan işaretli problemler kullanılan SYBR Green Real Time PCR (RT-PCR) metodu kullanılarak tanısının yapılabildiği ile ilgili yayınlar bulunmaktadır (Polley ve ark., 2011). Floresan işaretli problemlerin kullanıldığı ve komplementer nükleik asit dizilerine bağlanması esasına dayalı floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodunda microsporidiaların tanısında kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Ancak FISH metodunun iş gücü gerektirmesi ve zorluğunun yanı sıra PCR metoduna göre sensivitesinin düşük olması yöntemin dezavantajlarıdır (Procop, 2007). Microsporidiaların klinik tanı laboratuvarlarında kullanılan ışık mikroskopisi yöntemi ile moleküler tabanlı PCR metodunun sensivitesini ve spesifitesini belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada ortak 50 dışkı örneği iki grup laboratuvarında, iki farklı yöntem ile incelenerek karşılaştırılmış, ışık mikroskopisi yönteminin sensivitesini %54 spesifitesini %95 PCR metodunun sensivitesini %67 spesifitesini %98 olarak tespit etmişlerdir (Rinder ve ark., 1998).

2.8 Tedavi

Microsporidialar omurgalı ve omurgasız canlılar olmak üzere geniş konak aralığına sahip canlılardır. Microsporidian sporların su kaynaklarını yanı sıra vahşi, evcil ve çiftlik

hayvanlarında da tespit edildiği bildirilmiştir. Araştırmalar gastrointestinal microsporidiosis'te immün fonksiyonların iyileşmesinin klinik semptomların iyileşmesi, patojen eliminasyonu ve intestinal yapının normalizasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir (Foudraine ve ark., 1998; Goguel ve ark., 1997). İnsanlarda enfeksiyona neden olan bazı microsporidia türleri in vitro konak hücrelerinde kültüre edilebilirken, *E. bienewisi* 'nin uzun süreli in vitro kültürü yapılamamaktadır. Bu nedenle antimicrosporidial ajanların in vitro testlerinde *Encephalitozoon* spp. ve *V. cornea* türleri kullanılmaktadır. Microsporidiosis'in in vitro ve in vivo tedavi araştırmalarında albendazol ve fumagilin uzun süreli ve en fazla tedavi edici etki gösteren maddeler olmuşlardır. Bunların yanında metronidazol, itrakanazol, thalidomid, TMP-SMX, atovaquone gibi kemoterapik ajanlar da kullanılmaktadır (Aarons ve ark., 1994; Blanshard ve ark., 1992; Contreas ve ark., 2000; Costa ve Weiss, 2000; Molina ve ark., 2002).

Albendazol, β -tubulin kolşisin bağlanma bölgesine bağlanarak tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği ve hücre bölünmesini durdurarak etki gösterdiği belirlenmiştir. Albendazolün *Encephalitozoon* spp. türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde etkili olurken, *E. bienewisi* 'nin neden olduğu enfeksiyonlarda etkisinin sınırlı olduğu tespit edilmiştir. *E. bienewisi* ve *Vittaforma* sp. türleri β -tubulin amino asitlerinin albendazole karşı dirençli olduğu raporlanmıştır (Akiyoshi ve ark., 2007; Franzen ve Salzberger, 2008).

Fumagilin ilk kez 1949 yılında *Aspergillus fumigatus* 'ta identifiye edilmiştir. Fumagilin, ovacilin ve analogları TNP470 parazitin Methionine Amino Peptidase 2 (MetAP2) inhibitörü oldukları belirlenmiştir. Memeli hücrelerinin aksine microsporidialar MetAP1 geni içermezler ve MetAP2 enzimi parazitin hayat döngüsünde elzemdir. Fumagilin ve türevlerinin *E. bienewisi* ve *Nosema apis* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde umut verici olduğu ileri sürülmüştür (Didier, 1997; Didier, 2005; Han ve Weiss, 2018; Katznelson ve Jamieson, 1952).

2.9 Korunma ve Kontrol

İmmün sistemi baskılanmış, HIV pozitif veya organ nakli hikayesi olan bireylerde microsporidiosis fırsatçı patojen olarak hayati tehlike riskleri taşıyabilmektedir. Bu durumda olan kişilerin kişisel hijyen kurallarına riayet etmesi, şişelenmiş veya

kaynatılmış su tüketmesi, yiyeceklerin iyi yıkanması ve/veya pişirilmesine dikkat etmeleri gerekmektedir.

Microsporidian parazit spor duvarının yapısı dikkate alındığında dış ortam şartlarına oldukça dayanıklı oldukları ve uzun süre canlılıklarını sürdürebildikleri bilinmektedir. Standart filtrasyon teknikleri microsporidian sporlarını filtre edememektedir. Tüketilen suların en az 5 dakika kaynatılmasının *E. cuniculi* sporlarını öldürdüğü tespit edilmiştir. %70 Etanol (30 dk), %1 Formaldehit, Fenolik bileşikler, %2 Lysol, %1 H₂O₂ ve NaOH içeren dezenfektanların sporları öldürdüğü rapor edilmiştir. Laboratuvar ekipmanlarının 120 °C'de 15 dakika otoklavı, ozon, UV ve Gamma radyasyonu uygulamalarının da sterilizasyon sağladığı belirlenmiştir (Didier, 2005; Didier ve ark., 2005; Weber ve ark., 1994).

Yiyecek içecek hizmet sektöründe faaliyet gösteren kuruluşların hijyen ve sanitasyon kurallarına uyması, denetleyici mekanizmalar geliştirmesi gerekmektedir. Belediyeler ve sorumlu kamu kuruluşlarının katı ve sıvı atık drenajı ve bertarafının standartlara uygun biçimde yapılmasını sağlaması, içme sularına atık suların karışmasının önlenmesi microsporidiosisin yaygınlığının önlenmesi bakımından önem arz etmektedir. Hayvan çiftliklerinde atık drenajlarının iyi yapılması, hasta veya şüpheli hayvanların sürüden ayrılması ve tedavilerinin yapılmasının hastalığın yayılmasını önleyici tedbirler olacaktır.

2.10 Tavukçuluk Sektörü

Yumurta ve beyaz tavuk eti günlük beslenme alışkanlıklarımızda önemli yer tutmaktadır. Yumurta içeriğindeki protein, vitaminler ve mineraller bakımından önemli bir besin maddesidir. Ayrıca yumurta yağ oranının düşüklüğü, risk faktörlü hasta gruplarında güvenle tüketilmesini sağlamaktadır. Önemli hayvansal protein kaynağı olan beyaz tavuk eti yağ içeriğinin diğer et çeşitlerine göre düşük olması ile diyabetik özellik göstermektedir (Kovacs-Nolan ve ark., 2005). Fiyatının diğer et çeşitlerine göre daha uygun olması tercih edilebilirliğini de artırmaktadır. Hem yumurta hem de beyaz tavuk eti Ülkemiz için önemli üretim ve ihracat sektörüdür (Tablo 2.6). Ticari üretime ek olarak halk elinde bireysel ihtiyaçların karşılanması amacıyla veya hobi amaçlı yetiştiriciliğinin yapılıyor olması kanatlılarda hastalık etmeni patojenlerin yaygınlığının belirlenmesi,

etkin önleyici tedbirlerin alınması, uygun mücadele ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi bakımından önem arz etmektedir.

Tablo 2.6 Ülkemiz 2018 yılı yumurta ve beyaz et üretim ve tüketim miktarları
<https://www.yum-bir.org> (Erişim tarihi: 7 Kasım 2019)

	Tavuk varlığı (bin adet)	Üretim miktarı (yıllık)	Tüketim miktarı (kişi başı)	İhracat
Yumurta	124,055	22,3 milyar adet	224 adet	430 milyon \$
Beyaz et	229,507	~2 milyon ton	21,5 kg	626 milyon \$

2.11 Microsporidia ve Diğer Patojenik Etkenlerle Koenfeksiyonlar; *Salmonella* spp. Enfeksiyonları

Diyareal hastalıklar ve sindirim sistemi bozuklukları 40'tan fazla bakteriyel, parazitik ve viral patojenler tarafından meydana getirilmektedir (Becker ve ark., 2013). Microsporidia etkenleri ile enfeksiyonların diğer bazı önemli kanatlı patojenleri ile birlikte seyir gösterdiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Weber ve ark., 1999). Bu patojenler arasında *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium özellikle insanlar, çiftlik hayvanları ve tavuklarda su veya yiyecek yolu ile bulaşır ve akut gastrointestinal enfeksiyonlara neden olmasıyla önem arz etmektedir. Düşük hijyen koşulları, yetersiz beslenme, immun yetmezlik vb. koşullar protozoan ve helmintik parazitlerin yayılmasında önemlidir (Supali ve ark., 2010). Bahse konu koşullarda yaşayan konaklarda koenfeksiyonlar oldukça yaygındır.

Su ve ark. (2014) farelerde yaptıkları bir çalışmada helmint enfeksiyonu ile bozulmuş immun sistemin *Salmonella* spp. enterokolit koenfeksiyon şiddetinin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Schneeberger ve ark. (2016) insan dışkılarından çoklu enfeksiyonların metagenomik diyagnozu amacıyla yaptıkları bir çalışmada ısrarcı diyareli ve microsporidiosisli 4 hastanın 3'ünde (%75) salmonellosis tespit edilmiştir.

Park ve ark. (2008) tarafından deneysel olarak *Eimeria maxima* ve *Clostridium perfringens* koenfeksiyonu oluşturulan etlik piliç (broyler) tavuklarda immunopatoloji ve sitokin cevabını incelemiştir. Araştırma sonucunda patojenlerin tek başlarına oluşturdukları sitokin/kemokin cevabına kıyasla koenfeksiyonda oluşan daha yüksek sitokin/kemokin cevabının daha şiddetli bir hastalık fenotipi oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

HIV-seropozitifli hastalara ait dışkıların incelenmesi neticesi 32 microsporidiosisli hastadan; iki hastada *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* kompleksi, yedi hastada *Cryptosporidium parvum*, bir hastada *Salmonella* spp. (%3,1), bir hastada *Ascaris lumbricoides* yumurtası ve bir hastada ise giardiozis tespit edildiği bildirmiştir (Ferreira ve ark., 2001).

Koçer (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Kayseri yöresinde bir tavuk çiftliğinde enfestasyona neden olan *Dermanyssus gallinae* popülasyonlarının *Salmonella* spp. vektörlük potansiyelleri incelenmiş ve 32 örnek içerisinde 9 (%23,7) örnekte *Salmonella* spp. pozitifliği moleküler olarak belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalar dikkate alındığında immun yetmez konaklarda fırsatçı patojen microsporidiaların diğer patojenler tarafından enfekte veya enfeste konaklarda oluşturulan immun yetmezlik durumundan faydalanarak, konaklarda koenfeksiyon yapabilme potansiyellerinin bulunduğu speküle edilebilir. Bu amaçla çalışma sahasında örnekleme yaptığımız tavuklarda *E. bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. parazit türleri ile *Salmonella* spp. türlerinin oluşturabileceği koenfeksiyon potansiyelinin ve prevalansının tespit edilmesi, geliştirilecek koruyucu ve tedavi edici stratejilerin oluşturulmasında önem arz etmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Saha Çalışmaları

3.1.1 Araştırma Sahası ve Örneklerin Toplanması

Çalışma kapsamında 2018-2019 yılları arasında Kayseri, Kırşehir ve Nevşehir merkez ve köylerinde halk elinde, yumurtacı tavuk ve broyler işletmelerinde yetiştiriciliği yapılan sağlıklı görünümlü veya hasta görünümlü tavuklardan dışkı örnekleri toplanmıştır. Örnekleme lokaliteleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Örnekleme periyodu boyunca halk elinde serbest gezen, yumurtacı ve broyler tavuklardan 300 dışkı örneği, dışkılamayı takiben gözetim altında taze olarak dışkının yere temas etmeyen üst kısmından alınmıştır (Şekil 3.2). Halk elinde yetiştiriciliği yapılan (Şekil 3.3) ve serbest gezen tavuk kümeslerinden (Şekil 3.4) kümes içi ve gezinti alanlarından, yumurtacı tavuk işletmelerinde kafes altlıklarından (Şekil 3.5), broyler işletmelerinde ise gezinti alanlarından (Şekil 3.6) örnekleme yapılmıştır. Toplanan dışkı örneklerinin morfolojik karakterleri ve protokol kayıtları yapıldıktan sonra soğuk zincir altında laboratuvara intikalleri sağlanmıştır.

Halk elinde bireysel ihtiyaçları karşılamak veya hobi amacıyla yetiştirilen tavukların yaş özellikleri yetiştiriciler tarafından tahmini olarak verilmiş, ırk karışık (Lohman, Lohman Brown, Atak-S, Sussex, Leghorn gibi) kümeslerin çok olması ve melez ırkların bulunması nedeniyle ırk özellikleri net olarak belirlenememiştir. Ayrıca ülkemizde son yıllarda sıkça rastlanan serbest gezen tavuk yumurtası üretimi ve satışı amacıyla kurulan kümeslerden de örnekleme yapılmıştır. Kayseri ve Kırşehir yöresinde broyler işletmesi bulunmamasından dolayı örnekleme yapılamamış olup, Nevşehir yöresinde faaliyet gösteren bir broyler işletmesinden örnekleme yapılmıştır.



Şekil 3.1 Örnekleme lokaliteleri



Şekil 3.2 Dışkı örnekleme (Orijinal)



Şekil 3.3 Halk elinde yetiştirilen tavuk kümesi (Orijinal)



Şekil 3.4 Serbest gezen tavuk yumurtası üretim kümesi (Orijinal)



Şekil 3.5 Yumurtacı tavuk işletmesi (Orijinal)



Şekil 3.6 Broyler işletmesi (Orijinal)

3.2 Laboratuvar Analizleri

3.2.1 Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Soğuk zincir altında laboratuvara intikal ettirilen ve -20 °C’de saklanan dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonları, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) ve QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) kullanılarak, kit protokollerinde modifikasyonlar yapılarak yapılmıştır.

- QIAamp DNA Stool Mini Kit kullanılarak gDNA izolasyonu;

1. Oda sıcaklığındaki dışkı örneklerinden ~200 mg tartılarak steril 2 ml ependorf tüplerine alınmıştır.
2. Örneklerin her biri üzerine 1,4 ml Buffer ASL eklenerek, örnek tüp içerisinde tamamen homojenize olana kadar vorteksleme işlemi yapılmıştır.
3. Vorteksleme işlemi sonrası örneklerin daha iyi süspanse olmalarını sağlamak amacıyla örnekler QIAGEN TissueLyser LT cihazında 1 dk işleme tabi tutulmuştur.
4. Örnek süspansiyonları spor duvarının kırılabilirliğini artırmak amacıyla 5 siklus, 1 dk olacak şekilde kaynar su – sıvı azot içerisinde tutulmuştur.
5. Örnek süspansiyonları termal blok içerisinde 95 °C’de, 10 dk inkübe edilmiştir.
6. Örnek süspansiyonları 15.000 rpm’de, 1 dk santrifüj edilerek istenmeyen partiküller pellet halinde çöktürülmüştür.
7. Her bir örnekten 1,2 ml süpernatant alınarak 2 ml ependorf tüplerine eklenmiştir.
8. Her bir örnek üzerine 1 adet Inhibitex tablet eklenerek vortekslenmiştir.
9. Örnekler oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir.
10. Örnekler 15.000 rpm’de 3 dk santrifüje edilmiştir.
11. Yeni 1,5 ml ependorf tüplerine 15 µl proteinaz K eklenerek 10. basamakta elde edilen süpernatanttan 200 µl eklenmiştir.
12. Süspansiyon üzerine 200 µl Buffer AL eklenmiş ve 15 sn vortekslenmiştir.
13. Örnekler sıcak su banyosunda 70 °C’de 15 dk inkübasyona bırakılmış olup, her 5 dakikada bir vortekslenmiştir.

14. İnkübasyon sonrası süspansiyon üzerine 200 µl Etanol (%96-100) eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir.
15. Kapakları etiketlenen spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine alınmış ve örnek süspansiyonları kolon içerisine aktarılmıştır. Daha sonra 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilmiştir.
16. Santrifüjleme işlemi sonrası spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine alınmış, üzerlerine 500 µl Buffer AW1 eklenmiştir. 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilmiştir.
17. Spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine transfer edilmiş, üzerlerine 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. 15.000 rpm’de 3 dk santrifüje edilmiştir.
18. Spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine transfer edilmiş, üzerlerine ekleme yapılmadan 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilmiştir.
19. Spin kolonlar etiketlenmiş 1,5 ml ependorf tüplere transfer edilerek üzerlerine 50 µl Buffer AE eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılan kolonlar 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilerek gDNA elusyonu elde edilmiştir.
20. Elde edilen gDNA elusyonları sonraki işlemler için -20 °C’de saklanmıştır.

- QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit kullanılarak gDNA izolasyonu;

1. Oda sıcaklığındaki dışkı örneklerinden ~200 mg tartılarak steril 2 ml ependorf tüplerine alınmıştır.
2. Örneklerin her biri üzerine 200 µl Inhibitex Buffer eklenerek, örnek tüp içerisinde tamamen homojenize olana kadar vorteksleme işlemi yapılmıştır.
3. Vorteksleme işlemi sonrası örneklerin daha iyi süspanse olmalarını sağlamak amacıyla örnekler QIAGEN TissueLyser LT cihazında 1 dk işleme tabi tutulmuştur.
4. Örnek süspansiyonları spor duvarının kırılabilirliğini artırmak amacıyla 5 siklus, 1 dk olacak şekilde kaynar su – sıvı azot içerisinde tutulmuştur.
5. Oda sıcaklığındaki örnek süspansiyonlarına 800 µl Inhibitex Buffer eklenerek toplam hacim 1 ml’ye tamamlanmıştır. Homojenizasyon sağlamak amacıyla 1 dk boyunca vortekslenmiştir.

6. Örnek süspansiyonları 15.000 rpm'de 1 dk santrifüje edilerek istenmeyen partiküller pellet halinde çöktürülmüştür.
7. Yeni 2 ml ependorf tüplerine 25 µl proteinaz K eklenmiştir. Tüpler üzerine 6. basamaktaki süpernatanttan 600 µl eklenmiştir.
8. Tüpler üzerine 600 µl Buffer AL eklenerek 15 sn vortekslenmiştir.
9. Örnekler sıcak su banyosunda 70 °C'de 15 dk inkübasyona bırakılmış olup, her 5 dakikada bir vortekslenmiştir.
10. Inkübasyon sonrası süspansiyon üzerine 600 µl Etanol (%96-100) eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir.
11. Kapakları etiketlenen spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine alınmış ve 600 µl örnek lizatları kolon içerisine aktarılmıştır. Daha sonra 15.000 rpm'de 1 dk santrifüje edilmiştir.
12. 11. basamak işlemi örnek lizatları bitinceye kadar devam edilmiştir.
13. Santrifüjleme işlemi sonrası spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine alınmış, üzerlerine 500 µl Buffer AW1 eklenmiştir. 15.000 rpm'de 1 dk santrifüje edilmiştir.
14. Spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine transfer edilmiş, üzerlerine 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. 15.000 rpm'de 3 dk santrifüje edilmiştir.
15. Spin kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine transfer edilmiş, üzerlerine ekleme yapılmadan 15.000 rpm'de 3 dk santrifüje edilmiştir.
16. Spin kolonlar etiketlenmiş 1,5 ml ependorf tüplere transfer edilerek üzerlerine 50 µl Buffer ATE eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılan kolonlar 15.000 rpm'de 1 dk santrifüje edilerek gDNA elusyonu elde edilmiştir.
17. Elde edilen gDNA elusyonları sonraki işlemler için -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 gDNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Elde edilen gDNA elusyonlarında DNA izolasyon etkinliğini belirlemek amacıyla Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında gDNA (ng/µl) miktarları ölçülmüştür. İzolasyonu yapılan örneklerden rastgele seçilen 10 örnekte ölçüm yapılmıştır.

1. 10 örnek, standart I, II ve microsporidia pozitif gDNA olmak üzere toplam 13 ölçüm için 2587 µl Qubit® dsDNA BR Buffer üzerine 13 µl Qubit® dsDNA BR Reagent eklenerek working solution hazırlanmıştır.
2. Standart I ve II solüsyonları hazırlamak için kapağı etiketli her bir 0,5 ml ependorf tüplerine 190 µl working solution eklenmiştir.
3. Standart I solüsyonu için 10 µl Qubit® dsDNA BR Standart 1 eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlanmıştır.
4. Standart II solüsyonu için 10 µl Qubit® dsDNA BR Standart 2 eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlanmıştır.
5. Örnek solüsyonlarını hazırlamak için kapağı etiketli her bir 0,5 ml ependorf tüplerine 198 µl working solution eklenmiştir.
6. Her bir örnek gDNA elusyonundan ve pozitif kontrol örneğinden tüplere 2 µl örnek eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlanmıştır.
7. Tüpler düşük hızda vortekslenerek homojenizasyon sağlanmıştır.
8. Bütün tüpler oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakılmıştır.
9. Qubit® Fluorometer cihazından dsDNA Broad Range menüsü seçilerek standart solüsyonlar ve örnekler okutulmuş, gDNA (ng/µl) miktarları belirlenmiştir.

3.2.3 *E. bieneusi* rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA elusyonlarında *E. bieneusi* pozitifliği, ribozomal ITS gen bölgesini spesifik olarak amplifiye eden primer çiftleri kullanılarak iki basamaklı Nested-PCR analizi ile test edilmiştir. Bu amaçla Nested-I PCR analizinde EBITS3 (5'-GGTCATAGGGATGAAGAG-3') ve EBITS4 (5'-TTCGAGTTCTTTCGCGCTC-3') primerleri, Nested-II PCR analizinde EBITS1 (5'-GCTCTGAATATCTATGGCT-3') ve EBITS2.4 (5'-ATCGCCGACGGATCCAAGTG-3') primerleri kullanılarak ITS bölgesini bütün olarak içeren yaklaşık 390 bp ribozomal bölge amplifiye edilmiştir (Buckholt ve ark., 2002). Nested-I PCR ve Nested-II PCR analizlerinde kullanılan termal profil Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 *E. bieneusi* pozitifliğini belirlemek amacıyla kullanılan primer çiftleri ve termal profil

Nested-I PCR		Nested-II PCR	
Primer çiftleri	Termal Profil	Primer çiftleri	Termal Profil
EBITS3	95 °C - 4 dk 95 °C - 30 sn 47 °C - 30 sn 72 °C - 1 dk	EBITS1	95 °C - 4 dk 95 °C - 30 sn 46 °C - 30 sn 72 °C - 1 dk
EBITS4	72 °C - 10 dk 12 °C - ∞	EBITS2.4	72 °C - 10 dk 12 °C - ∞

Her iki basamaktaki PCR analizleri de steril kabin içerisinde, DNase/RNase free tüp ve pipet uçları kullanılarak yapılmıştır. PCR reaksiyon karışımı 25 µl son hacim olacak şekilde Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM primer çifti ve 10-20 ng gDNA ve DNase/RNase free dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Nested-II PCR analizinde kalıp olarak Nested-I PCR ampliconlarından 1 µl kullanılmıştır.

3.2.4 *Encephalitozoon* spp. rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA elusyonlarında *Encephalitozoon* spp. pozitifliği, rRNA SSU ve rRNA LSU gen bölgesini spesifik olarak amplifiye eden primer çiftleri kullanılarak iki basamaklı Nested-PCR analizi ile test edilmiştir. Bu amaçla Nested-I PCR analizinde MSP-I (5'-TGAATGKGTCCCTGT-3') ve MSP-2A (5'-TCACTCGCCGCTACT-3') primerleri, Nested-II PCR analizinde MSP-3 (5'-GGAATTCACACCGCCCGTCRYTAT-3') ve MSP-4A (5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGGGT-3') primerleri kullanılarak yaklaşık 289-

305 bp ribozomal bölge amplifiye edilmiştir (Katzwinkel-Wladarsch ve ark., 1996). Nested-I PCR ve Nested-II PCR analizlerinde kullanılan termal profil Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 *Encephalitozoon* spp. pozitifliğini belirlemek amacıyla kullanılan primer çiftleri ve termal profil

Nested-I PCR		Nested-II PCR	
Primer çiftleri	Termal Profil	Primer çiftleri	Termal Profil
MSP-I	95 °C - 4 dk 95 °C - 30 sn 40 °C - 30 sn 72 °C - 1 dk 72 °C - 10 dk 12 °C - ∞	MSP-3	95 °C - 4 dk 95 °C - 30 sn 57 °C - 30 sn 72 °C - 1 dk 72 °C - 10 dk 12 °C - ∞
MSP-2A		MSP-4A	

Her iki basamaktaki PCR analizleri de steril kabin içerisinde, DNase/RNase free tüp ve pipet uçları kullanılarak yapılmıştır. PCR reaksiyon karışımı 25 µl son hacim olacak şekilde Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM primer çifti ve 10-20 ng gDNA ve DNase/RNase free dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Nested-II PCR analizinde kalıp olarak Nested-I PCR ampliconlarından 1 µl kullanılmıştır.

PCR analizlerinin her basamağında geçerlilik ve kontaminasyon kontrolü amacıyla pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında bulunan referans microsporidia gDNA izolatları, negatif kontrol olarak ise DNase/RNase free dH₂O kullanılmıştır. PCR ampliconlarının elektroforetik ayrımının yapılması amacıyla yatay elektroforez tankı (BioRad) kullanılmıştır. 1X konsantrasyonunda TAE (Tris-Acetate-EDTA) koşturma tamponu ve %1,5 agaroz jeli

(SIGMA) hazırlamak için kullanılmıştır. PCR ampliconları ethidium bromide (10 mg/ml, SIGMA) ile boyanmış %1,5 agaroz jelinde 130 V akımda 30 dk elektroforetik ayrımaya tabi tutulmuştur. Referans marker olarak GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) kullanılmıştır. İşlem sonrası agaroz jel Gene Snap/Syngene analiz programı ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.5 Pozitif PCR Ampliconların Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

Agaroz jelinde elektroforetik ayrımaya tabi tutulan ampliconların jel ekstraksiyon işlemi GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) protokolünde ufak modifikasyonlar ile yapılmıştır.

1. PCR analizi neticesi pozitif belirlenen ampliconlar agaroz jeline her kuyucuğa 10 µl hacimde olacak şekilde çift kuyucuk yüklenmiştir.
2. Koşturma sonrası steril bistüri yardımı ile bantlar jelden kesilerek ayrılmış ve 1,5 ml ependorf tüplerine alınmıştır.
3. Kesilen jelin ağırlığı hassas terazide tartılmış ve jel ağırlığı miktarınca (örn:100 mg-100 µl) Binding Buffer eklenmiştir.
4. Jel süspansiyonu 56 °C’de 10 dk inkübe edilmiştir.
5. Inkübasyon sonrası tamamen eriyen jel süspansiyonu pürifikasyon kolonuna aktarılmıştır. 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilerek altta kalan kısım atılmıştır.
6. Pürifikasyon kolonuna 100 µl Binding Buffer eklenmiş olup, 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilerek altta kalan kısım atılmıştır.
7. Pürifikasyon kolonuna 700 µl Wash Buffer eklenmiştir. 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilerek altta kalan kısım atılmıştır.
8. Pürifikasyon kolonunun kapağı açılarak 15 dk boyunca kuruma sağlanmıştır.
9. 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilerek toplama kolonu atılmıştır.
10. Pürifikasyon kolonu 1,5 ml ependorf tüpüne alınarak üzerine 35 µl Elution Buffer eklenmiştir.
11. 15.000 rpm’de 1 dk santrifüje edilerek elusyonun ependorf tüpte toplanması sağlanmıştır.

12. Pürifikasyon işleminin etkinliğini kontrol etmek için pürifiye elusyon referans marker varlığında agaroz jelde ayırma tabi tutularak jel dokümantasyon cihazında görüntülenmiştir.

3.2.6 Gen Sekans Analizleri ve Filogenetik Analiz

E. bieneusi tür spesifik ve *Encephalitozoon* spp. genel primer çiftleri ile pozitif belirlenen örneklerle ait pürifiye ampikonlar Nested-II PCR analizinde kullanılan primer çiftleri ile çift yönlü olarak sekans analizi yaptırılmıştır (Macrogen Europe). DNA dizileri belirlenen izolatlarla ait kromotogramlar Geneious 11.0.2 programında De Novo Assamble üzerinden dizi analizleri yapılmış olup, yüksek kalite değerindeki konsensüs sekanslar tespit edilmiştir (Kearse ve ark., 2012; Nei, 1996). Konsensüs sekans dizilerinden eşit uzunlukta diziler elde etmek için primer sekans dizileri trimlenmiş ve hedef bölge final sekans dizileri elde edilmiştir. Elde edilen sekansların GenBank veritabanında kayıtlı microsporidia izolatlarına ait hedef gen bölgesi sekansları ile kıyaslamaları Geneious 11.0.2 programı üzerinden BLASTn algoritması kullanılarak yapılmıştır. Genetik çeşitlilik indeksi ile inter ve intra spesifik nükleotid farklılıklarını belirlemek için hizalanmış sekanslar DnaSP (Rozas ve ark., 2017) ve Mega 7 (Kumar ve ark., 2016) programı üzerinden Kimura 2-Parametresi (K2P) uzaklık modeli kullanılarak analiz edilmiştir (Kimura, 1980). GenBankta kayıtlı genotiplere ait hedef gen bölgesi sekans dizileri ile data set oluşturularak, nükleotid dizilerindeki polimorfizmlere göre en iyi filogenetik ağaç olasılığı Maximum Likelihood (ML) analizi ile yapılmıştır. Maximum Likelihood analizlerinde sekans değişimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) programı üzerinden en düşük AIC (Akaike Information Criteria) değerine sahip model filogenetik ağacın belirlenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca oluşturulan model filogenetik ağaçların güvenilirlikleri 1000 tekrarlı Bootstrap testi ile de denetlenmiştir.

3.2.7 *Salmonella* spp. rRNA 16S Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA elusyonlarında *Salmonella* spp. DNA'sının araştırılması, 16S rRNA gen bölgesi PCR ve sekans analizleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 16SF (5'-TGTTGTGGTTAATAACCGCA-3') ve 16SR (5'-CACAAATCCATCTCTGGA-3') primerleri kullanılarak yaklaşık 570 bp rRNA bölgesi

amplifiye edilmiştir (Ziemer ve Steadham, 2003). PCR analizleri steril kabin içerisinde, DNase/RNase free tüp ve pipet uçları kullanılarak yapılmıştır. PCR reaksiyon karışımı 25 µl son hacim olacak şekilde Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM primer çifti ve 10-20 ng gDNA ve DNase/RNase free dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. PCR termal profili 95 °C’de 5 dk, 35 siklus 95 °C’de 1 dk, 55 °C’de 30 sn, 72 °C’de 1 dk ve son uzama 72 °C’de 10 dk. olarak belirlenmiş ve hedef bölge amplifiye edilmiştir (Ziemer ve Steadham, 2003). PCR analizlerinin her basamağında geçerlilik ve kontaminasyon kontrolü amacıyla pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında bulunan sekans konfirmasyonu yapılmış referans *Salmonella* spp. gDNA elusyonu, negatif kontrol olarak ise DNase/RNase free dH₂O kullanılmıştır.

PCR ampliconlarının elektroforetik ayrımı yatay elektroforez tankı (BioRad) kullanılarak 1X konsantrasyonda TAE (Tris-Acetate-EDTA) koşturma tamponu ve %1,5 agaroz jeli (SIGMA) varlığında yapılmıştır. PCR ampliconları ethidium bromide (10 mg/ml, SIGMA) ile boyanmış agaroz jelde 130V akımda 30 dk elektroforetik ayırma tabi tutulmuştur. Referans marker olarak GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) kullanılmıştır. İşlem sonrası agaroz jel Gene Snap/Syngene analiz programı ile görüntülenip analiz edilmiştir. Pozitif belirlenen örneklerle ait agaroz jel üzerinden 3.2.5’inci basamakta verilen protokole göre pürifiye edilen ampliconlar 16SF ve 16SR primer çiftleri ile çift yönlü olarak sekans analizi yaptırılmıştır (MacroGen Europe). Elde edilen dizilimler konsensüs oluşturulmuş ve GenBank veri tabanında Blastn analizleriyle tür konfirmasyonları sağlanmıştır.

3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS statistics 20 programıyla *E. bieneusi* pozitifliği ile dışkı karakteri faktörlerinin ilişkisi Pearson’s Chi Square testi ile araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Dışkı Örneklerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmaya; Kayseri, Kırşehir ve Nevşehir bölgesinde halk elinde gerek bireysel ihtiyaç için veya hobi amaçlı yetiştirilen gerekse de serbest gezen tavuk yumurtası üretimi yapan kümeslerden, yumurtacı tavuk işletmelerinden ve etlik piliç (broyler) işletmesinden usulüne uygun olarak 300 adet tavuk dışkısı dâhil edilmiştir. Örnekleme yapılan tavukların ırk ve yaş özellikleri Tablo 4.1’de, örnekleme bölgelerine göre dağılımları ise Tablo 4.2’de verilmiştir. Ayrıca dışkı örneklerinin morfolojik özelliklerine göre oluşturulan gruplar Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.1 Çalışma kapsamındaki örneklerin sayısı, tavuk ırkı ve yaş özellikleri.

		Sayı (adet)	İrk	Yaş (hafta)
Halk eli (serbest gezen)	Ticari amaçlı	74 (%24,6)	Lohman Brown (%100)	~40-60
	Bireysel ihtiyaç	170 (%56,6)	--	Alt sınır- ~40 (%18) ~40-60 (%58) ~60-Üst sınır (%24)
İşletme	Yumurtacı tavuk	45 (%15)	Lohman (%47) Nick Chick (%31) Lohman Brown (%22)	~60-90
	Etlik piliç (Broyler)	11 (%3,6)	Ross (%100)	~4-5
Toplam		300		

Tablo 4.2 Çalışma kapsamındaki örneklerin bölgelere göre dağılımı

Faktör		İncelenen Dışkı Sayısı (%)			
		Kayseri	Kırşehir	Nevşehir	Toplam
Halk eli (serbest gezen)	Ticari amaçlı	30 (%10)	22 (%7,3)	22 (%7,3)	74 (%24,6)
	Bireysel ihtiyaç	60 (%20)	55 (%18,3)	55 (%18,3)	170 (%56,6)
İşletme	Yumurtacı tavuk	15 (%5)	15 (%5)	15 (%5)	45 (%15)
	Etlik piliç (Broyler)	--	--	11 (%3,6)	11 (%3,6)
Toplam		105 (%35)	92 (%30,6)	103 (%34,4)	300

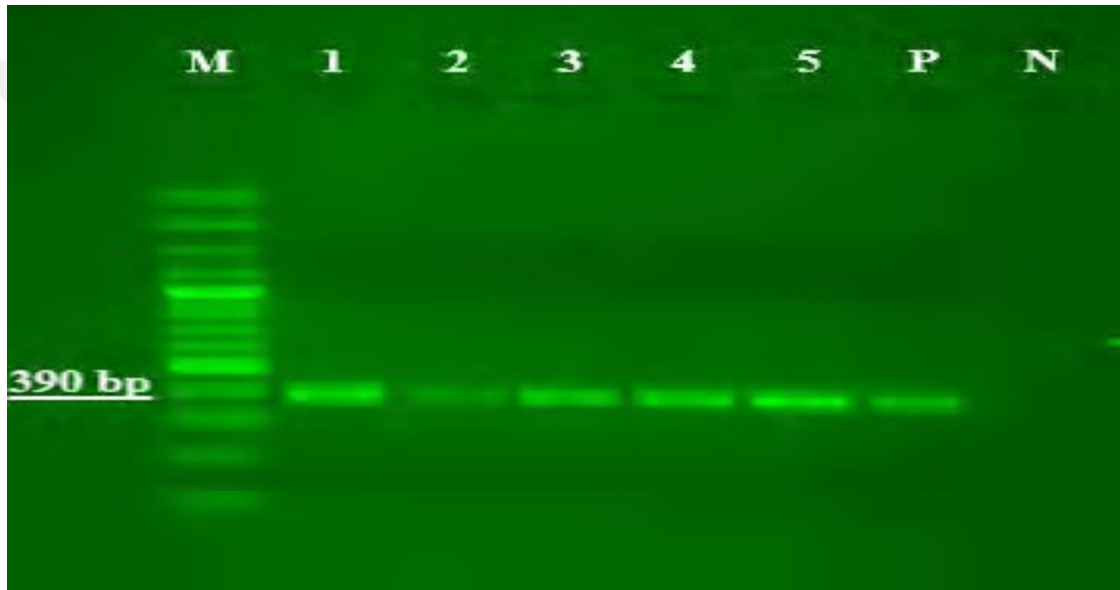
Tablo 4.3 Dışkı örneklerinin morfolojik özelliklerine göre gruplandırması

	Dışkıların morfolojik görünümüne göre gruplandırması (adet)			
	Katı	Yumuşak	Gevşek veya sulu	Toplam
Halk eli (serbest gezen)	25	127	92	244
İşletme	36	20	-	56
Toplam	61	147	92	300

4.2 Microsporidian Parazitlerin Moleküler Prevalansı

4.2.1 *E. bieneusi*

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA elusyonlarından *E. bieneusi* pozitifliği Nested-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Analizler sonucu pozitif belirlenen bazı izolatların agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

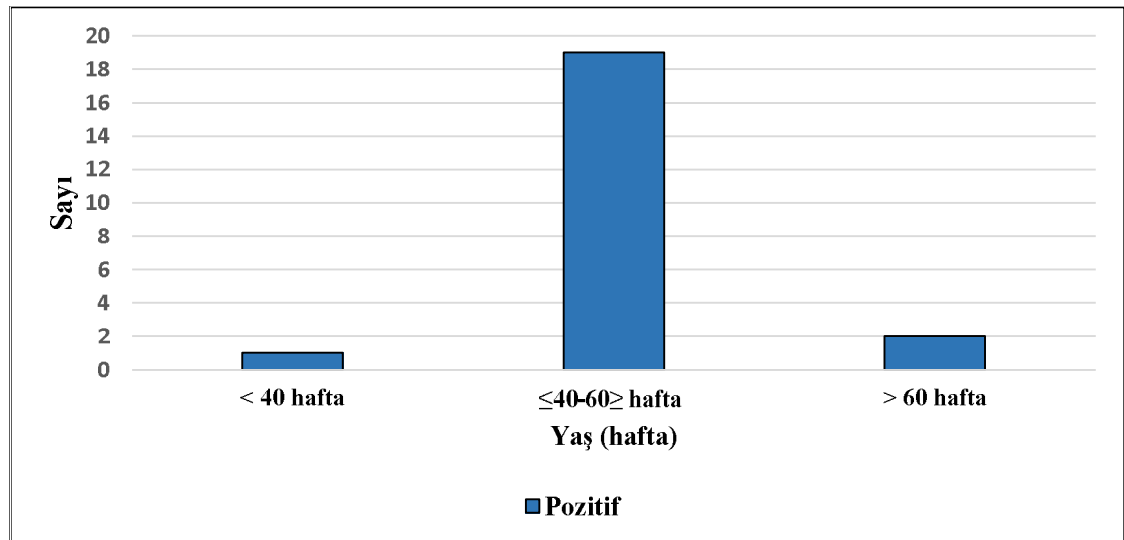


Şekil 4.1 Nested-PCR analizi sonucu *E. bieneusi* pozitif belirlenen örneklerin agaroz jelinde görünümü. M: 100bp Marker, 1:ERUSS1, 2-5:ERUNT1, P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol.

İncelenen 300 adet dışkı örneğinin *E. bieneusi* yönünden moleküler analiz sonuçları Tablo 4.4’te sunulmuştur. Kayseri ilinde halk elinde serbest gezen tavuklardan alınan dışkı örneklerinden 14 ve Nevşehir ilinde serbest gezen tavuklardan alınan dışkı örneklerinden 8 olmak üzere toplam 22 örnekte *E. bieneusi* pozitifliği tespit edilmiş olup ilgili microsporidia etkeninin moleküler prevalansı %7,3 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.4). Pozitif örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 4.2’de verilmiştir. Yumurtacı ve broyler işletmelerinden alınan örneklerde ve Kırşehir ilinden alınan örneklerde *E. bieneusi* pozitifliği belirlenememiştir.

Tablo 4.4 *E. bieneusi* pozitif örneklerin yaşlara göre dağılımı

		<i>E. bieneusi</i> Nested PCR analizleri ile pozitif örnek sayısı		
	Yaş aralığı	Pozitif	Negatif	Toplam
Halk eli (serbest gezen)	Alt sınır - ~ 40 hafta	1	30	31
	~ 40 - 60 hafta	19	153	172
	~ 60 hafta – Üst sınır	2	39	41
İşletme	Alt sınır - ~ 40 hafta	-	11	11
	~ 40 - 60 hafta	-	-	-
	~ 60 hafta – Üst sınır	-	45	45
Toplam		22 (%7,3)	278	300

**Şekil 4.2** Tavukların yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımı

Örneklerin morfolojik gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımı Tablo 4.5'te verilmiştir. *E. bieneusi* pozitif örneklerden 13 (%8,8) adet örnek yumuşak karakterli, 9 (%9,7) adet örnek ise gevşek-sulu karakterde oldukları belirlenmiştir. Diğer örnek gruplarından *E. bieneusi* pozitif örnek bulunmamaktadır. Yapılan istatistik analiz sonucu Tablo 4.6'da verilmiş olup gevşek-sulu ve yumuşak karakterli örnekler ile şekilli örnekler arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.5 Örneklerin morfolojik gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımı

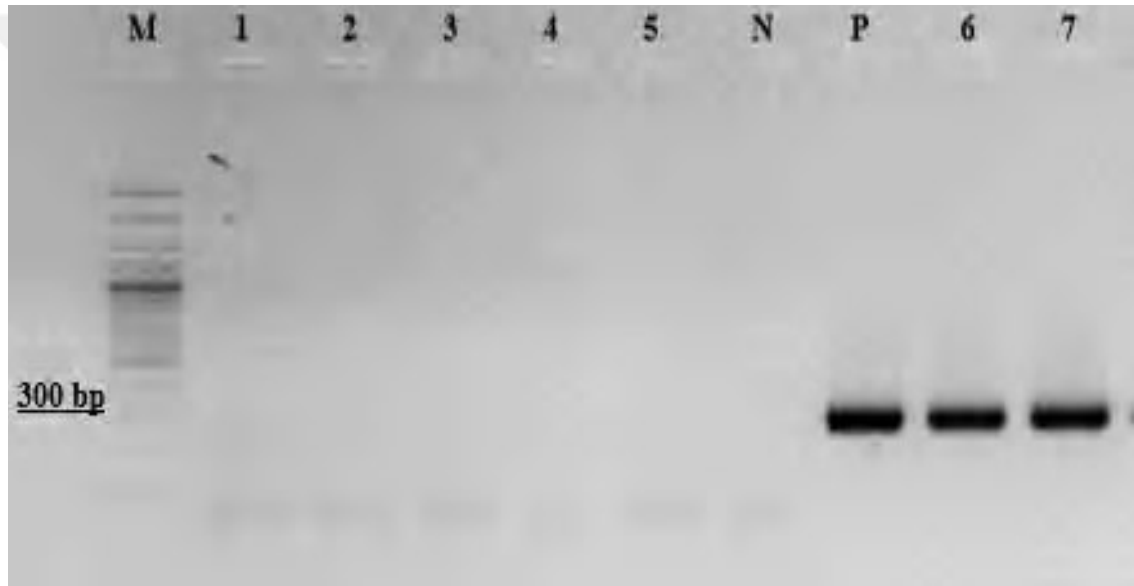
	Morfolojik grup dağılımı			
	Katı	Yumuşak	Gevşek veya sulu	Toplam
<i>E. bieneusi</i> Pozitif	-	13 (%8,8)	9 (%9,7)	22 /%7,3)
<i>E. bieneusi</i> Negatif	61	134	83	278
Toplam	61	147	92	300

Tablo 4.6 Örneklerin morfolojik karakter gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v25)

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,133 ^a	2	,047
Likelihood Ratio	10,497	2	,005
N of Valid Cases	300		

4.2.2 *Encephalitozoon* spp.

İncelenen dışkı örneklerinin microsporidia genel primerlerle yapılan Nested PCR analizleri sonucunda Kırşehir yöresinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklara ait dışkı örneklerinden 2'si (%0,6) pozitif bulunmuştur. Analizler sonucu pozitif belirlenen izolatların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 4.3'te verilmiştir. İki pozitif örneğin 40-60 haftalık yaş grubunda olduğu ve dışkı karakterine göre yumuşak kıvamlı grupta yer aldığı tespit edilmiştir.

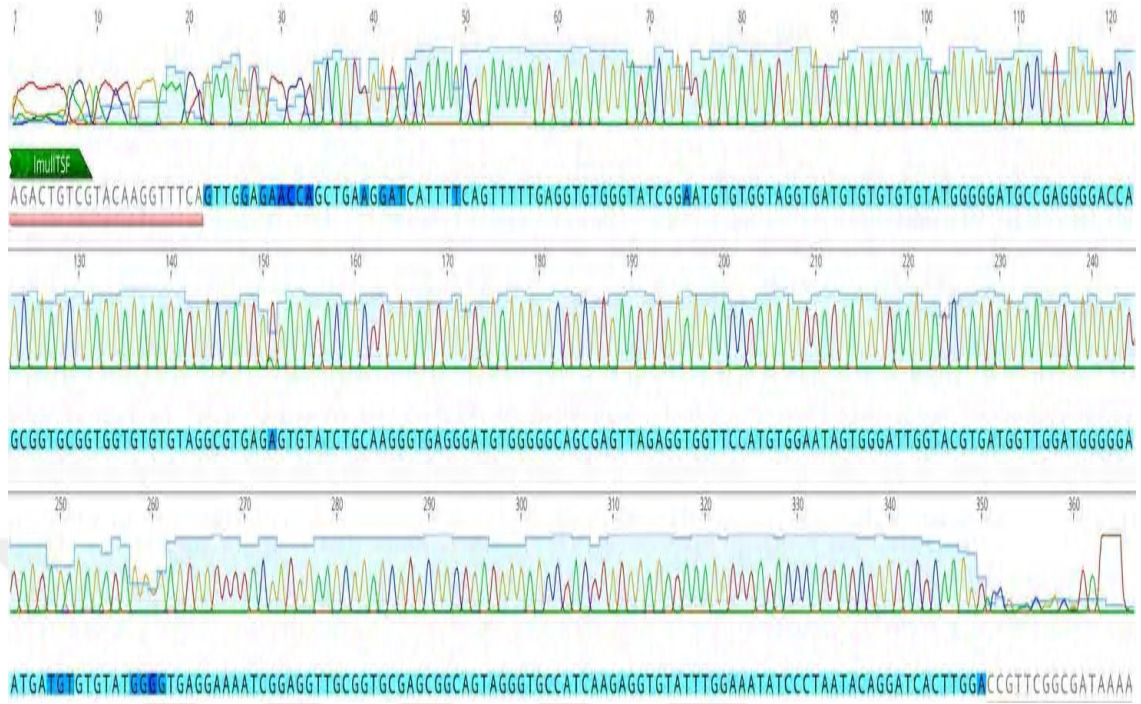


Şekil 4.3 Nested-PCR analizi sonucu *Microsporidia* sp. pozitif belirlenen örneklerin agaroz jelinde görünümü. M: 100 bp Marker, 1-5:Negatif örnek, 6-7:TrMicChik1, P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol.

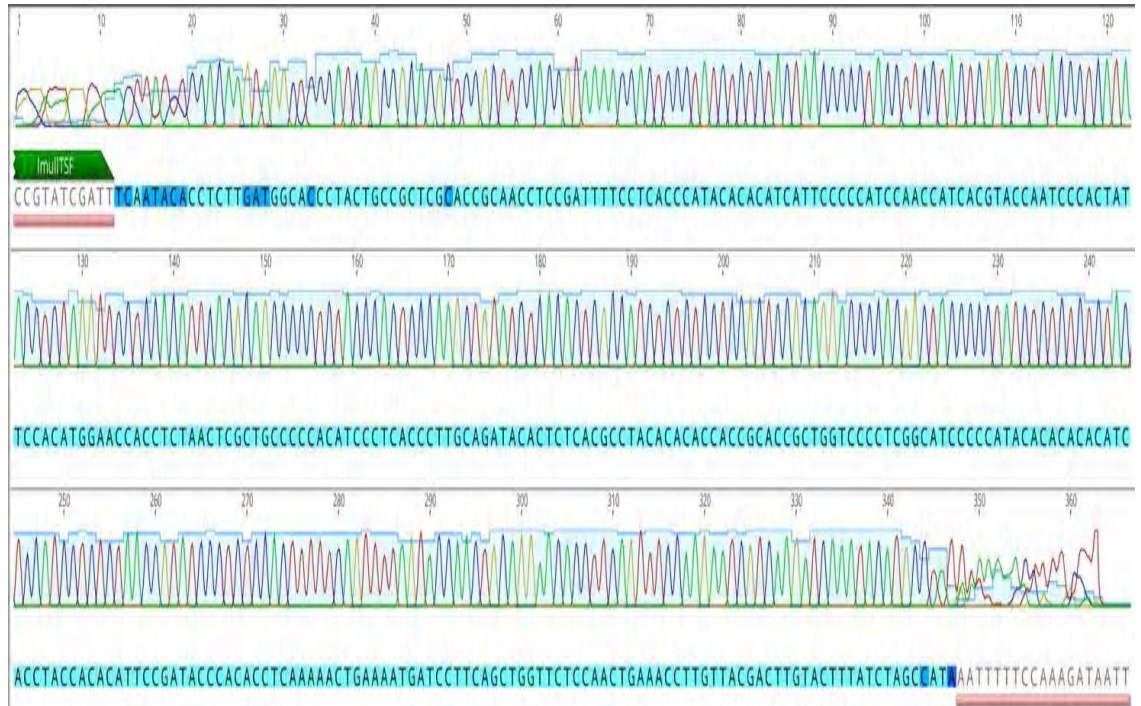
4.3 rRNA ITS Gen Bölgesi Sekans Analizi Sonuçları

4.3.1 *E. bieneusi*

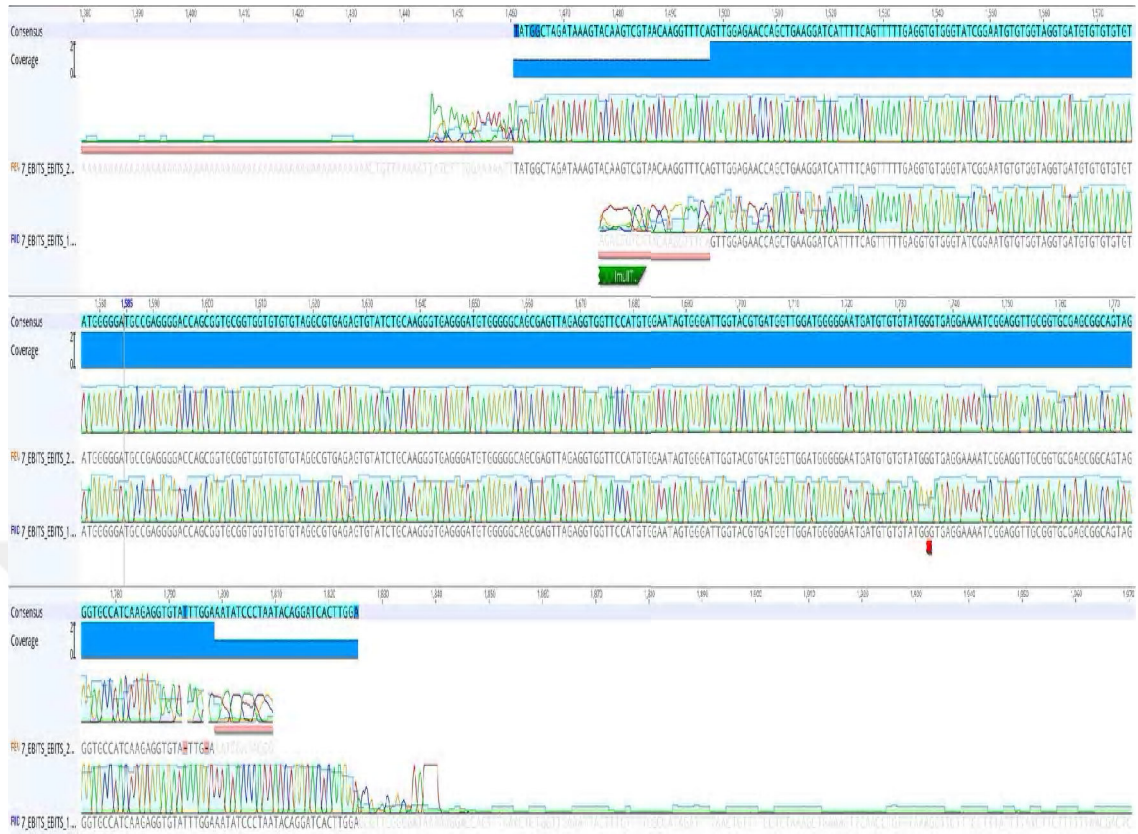
Nested PCR analizleri sonucu pozitif belirlenen tüm örneklerle ait jel pürifiye ampliconlar EBITS1 ve EBITS2.4 primer çiftleri varlığında çift yönlü olarak sekans analizine tabi tutulmuştur. Analiz neticesi yüksek kalite skorlu kromotogramlar elde edilmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Çift yönlü dizilerin birleştirilmesi sonucu konsensus sekans dizilimleri oluşturulmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.4 *E. bieneusi* rDNA ITS gen bölgesinin EBITs2.4 reverse primeri ile elde edilen kromotogramı



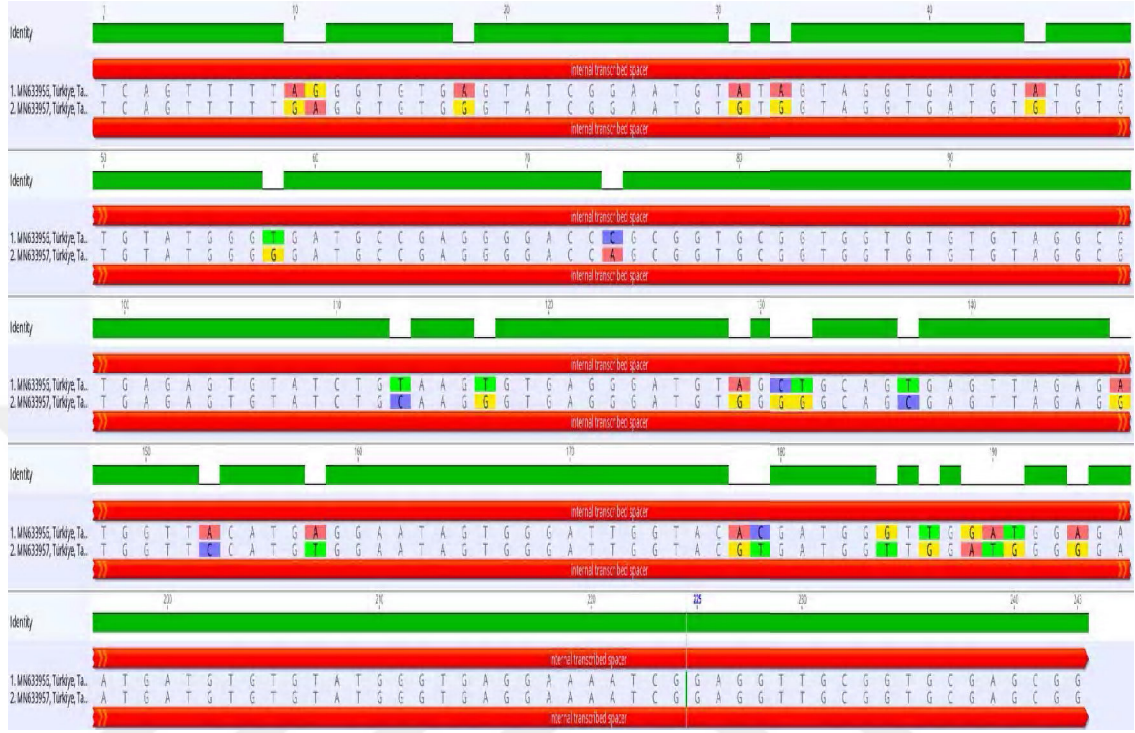
Şekil 4.5 *E. bieneusi* rDNA ITS gen bölgesinin EBITs1 forward primeri ile elde edilen kromotogramı



Şekil 4.6 DeNovo analizleri sonucu konsensus sekans dizilimi

Tavuk dışkılarından izole edilen tüm izolatların sekans primerleri uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen 350 bp rDNA nükleotid dizilerinin blast analizleri ile tür konfirmasyonları sağlanmıştır. Toplam 22 *E. bieneusi* izolatına ait sekansların analizi sonucu belirlenen genotipler ve genotiplerin içerdiği izolat sayısı, GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.7’de verilmiştir. Sekansların hizalama analizlerinde genotiplendirmede referans olan ITS bölgesi sekansları (243 bp), small subunit ve large subunit rRNA dizilimlerinin konsensus sekanslardan uzaklaştırılması sonucu elde edilmiştir. ITS rRNA gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *E. bieneusi* izolatlarının nükleotid sekanslarının ikili hizalamaları Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Şekil 4.6’da belirlenen her genotipe ait bir izolat gösterilmiştir. *E. bieneusi* izolatlarının ITS sekansları arasında 218 (%89,7) identik bölge belirlenirken 2 farklı genotipi ortaya koyan 25 polimorfik bölge saptanmıştır. Araştırmada belirlenen izolatlar ile Dünyanın farklı ülkelerinde tavuklardan karakterize edilen *E. bieneusi* izolatları arasındaki genetik farklılıklar Tablo 4.8’de

verilmiştir. Çalışmada belirlenen genotiplere ait izolatlar arasında identiklik oranı ortalama %89,7 belirlenmiştir.



Şekil 4.7 *E. bieneusi* izolatına ait ITS rRNA gen bölgesi sekanslarının ikili hizalamaları

Tablo 4.7 Tavuklarda belirlenen *E. bieneusi* izolatlarının genotiplere göre dağılımı ve GenBank aksesyon numaraları

Sekanslanan izolat sayısı	Genotip				
	Adı	Ait olan izolat sayısı	İzolasyon		GenBank Aksesyon
			Yer	Sayı	
22	ERUNT1	21 (%95,5)	Kayseri	13 (%61,9)	MN653957
			Nevşehir	8 (%38,1)	
	ERUSS1	1 (%4,5)	Kayseri	1 (%100)	MN653956

Araştırma yörelerinde tavuklarda en yaygın genotip ilk kez bu tez çalışması ile karakterize edilen ERUNT1 belirlenmiş bunu ERUSS1 genotipi izlemiştir (Tablo 4.7). Çalışmada identifiye edilen iki genotipe ait izolatlar arasında intraspesifik nükleotid farklılığı ortalama $12,0 \pm 2,6$ saptanmış olup Dünyada günümüze kadar tavuklardan rapor edilen genotiplere ait izolatlarla ikili hizalama analiz sonucu belirlenen genetik farklılıklar ayrıca Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8 Tavuklardan rapor edilen *E. bieneusi* genotiplerinin ITS rDNA sekanslarının çoklu hizalama analizlerine göre genetik farklılıkları (Sağ üst diagonalde italik karakterde verilen değerler standart sapmayı göstermektedir.)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	MN633957 Türkiye Tavuk ERUNT1		0,006	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,008	0,010	0,011	0,010	0,026
2	KT943975 Brezilya Tavuk TypeIV	0,008		0,004	0,004	0,004	0,006	0,006	0,006	0,007	0,009	0,008	0,024
3	KY448453 Çin Tavuk	0,013	0,004		0,000	0,006	0,004	0,004	0,004	0,006	0,010	0,009	0,024
4	KY448452 Çin Tavuk	0,013	0,004	0,000		0,006	0,004	0,004	0,004	0,006	0,010	0,009	0,024
5	JF927959 Peru Tavuk Peru8	0,013	0,004	0,008	0,008		0,004	0,004	0,004	0,006	0,010	0,010	0,025
6	KY448451 Çin Tavuk	0,017	0,008	0,004	0,004	0,004		0,000	0,000	0,004	0,011	0,011	0,024
7	KT943972 Brezilya Tavuk D	0,017	0,008	0,004	0,004	0,004	0,000		0,000	0,004	0,011	0,011	0,024
8	KY448446 Çin Tavuk	0,017	0,008	0,004	0,004	0,004	0,000	0,000		0,004	0,011	0,011	0,024
9	KT943973 Brezilya Tavuk Peru11	0,021	0,013	0,008	0,008	0,008	0,004	0,004	0,004		0,011	0,011	0,025
10	KF724905 Çin Tavuk CC-1	0,026	0,017	0,021	0,021	0,021	0,026	0,026	0,026	0,030		0,013	0,026
11	KT943974 Brezilya Tavuk Peru6	0,026	0,017	0,021	0,021	0,021	0,026	0,026	0,026	0,030	0,035		0,025
12	MN633956 Türkiye Tavuk ERUSS1	0,120	0,109	0,104	0,104	0,115	0,110	0,110	0,110	0,116	0,121	0,115	

4.3.2 *E. bieneusi* Pozitif İzolatların Filogenetik Analizi

Tavuk dışkılarından izole edilerek moleküler olarak karakterize edilen *E. bieneusi* genotiplerine ait izolatların Dünyada çeşitli bölgelerdeki farklı konaklardan bildirilen çeşitli genotiplere ait izolatlarla ilişkileri filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 4.8) gösterilmiştir. Maximum Likelihood (ML) filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük genogruplar bazında yüksek bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen genotiplerin Grup 1 ve Grup 2 olmak üzere iki grupta yer aldığı belirlenmiştir. Araştırma bölgelerinde tavuklarda en yaygın olarak belirlenen ve ilk kez bu

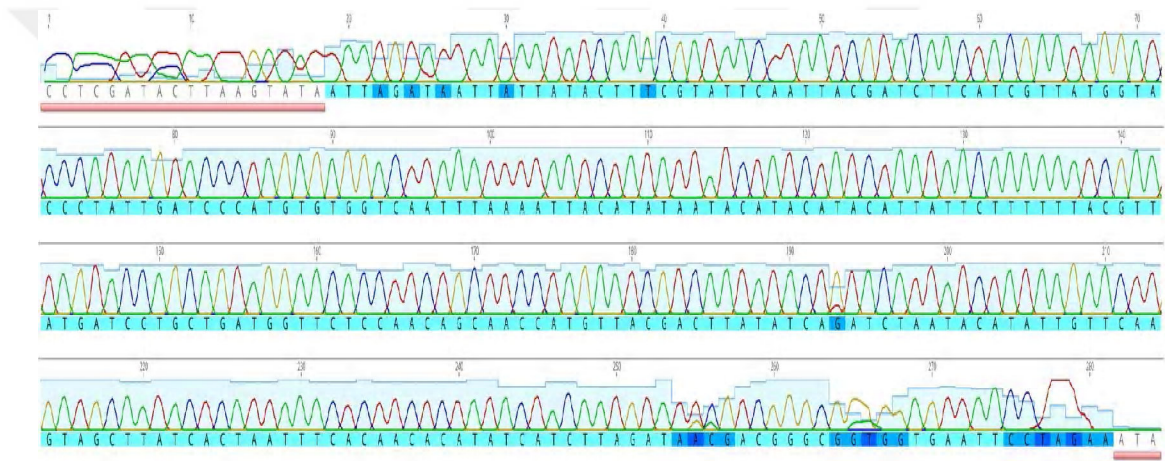
tez çalışması ile karakterize edilen ERUNT1 genotipine ait izolatların yüksek potansiyelde zoonotik grup olarak nitelenen Grup 1’de yer aldığı tespit edilmiştir. İlgili genotipe ait izolatların, genotip IV’de yer alan Brezilya’da tavuk (KT943972), Nijeryada insan (JX683799), Çin’de at (MK789441), kedi (KX964628), Hint sıçan yılanı (KJ651436) ve Hint şebeği (KF305582), Peru’da alpaka (KC868884) ve genotip BEB5’te bildirilen ABD’de sığır (AY331009) izolatlarıyla %99,2 oranında yüksek identiklik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada Kayseri yöresinde bir tavuktan izole edilerek karakterize edilen ERUSS1 genotipinin önceden sığır-spesifik genogrup olarak nitelenen Grup 2’de yer aldığı görülmüştür. İlk kez Türkiye’den önceki çalışmalar kapsamında karakterize edilen ERUSS1 genotipi Kayseri ve Sivas yörelerinde sığır ve koyunlardan (Şekil 4.8 filogenetik ağaç) rapor edilmiştir. İlgili genotipe ait izolatların konak spektrumu geniş olan BEB6 (%99,6) ve SH5 (%99,6) genotiplerinin yanında yine Sivas yöresi sığırlarından izole edilerek karakterize edilmiş ERUSS2-4 (%99,2-%99,6) genotipleri ile genetik olarak yakın oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



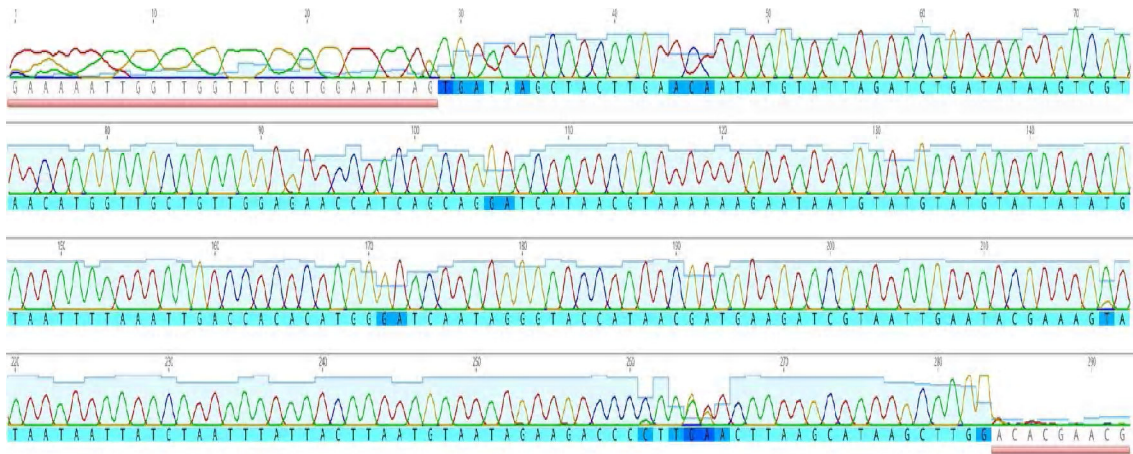
Şekil 4.8 *E. bieneusi* izolatlarının ITS rRNA gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen genotipler kırmızı, Türkiye’de çeşitli konaklardan rapor edilen genotipler yeşil ve tavuklarda farklı ülkelerde bildirilen genotipler mavi karakterde gösterilmiştir. Node’ların önündeki rakamlar ML bootstrap desteğini göstermektedir. Dış grup olarak *E. bieneusi* PtEb IX köpek izolatı (DQ885585) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

4.3.3 *Microsporidia* sp.

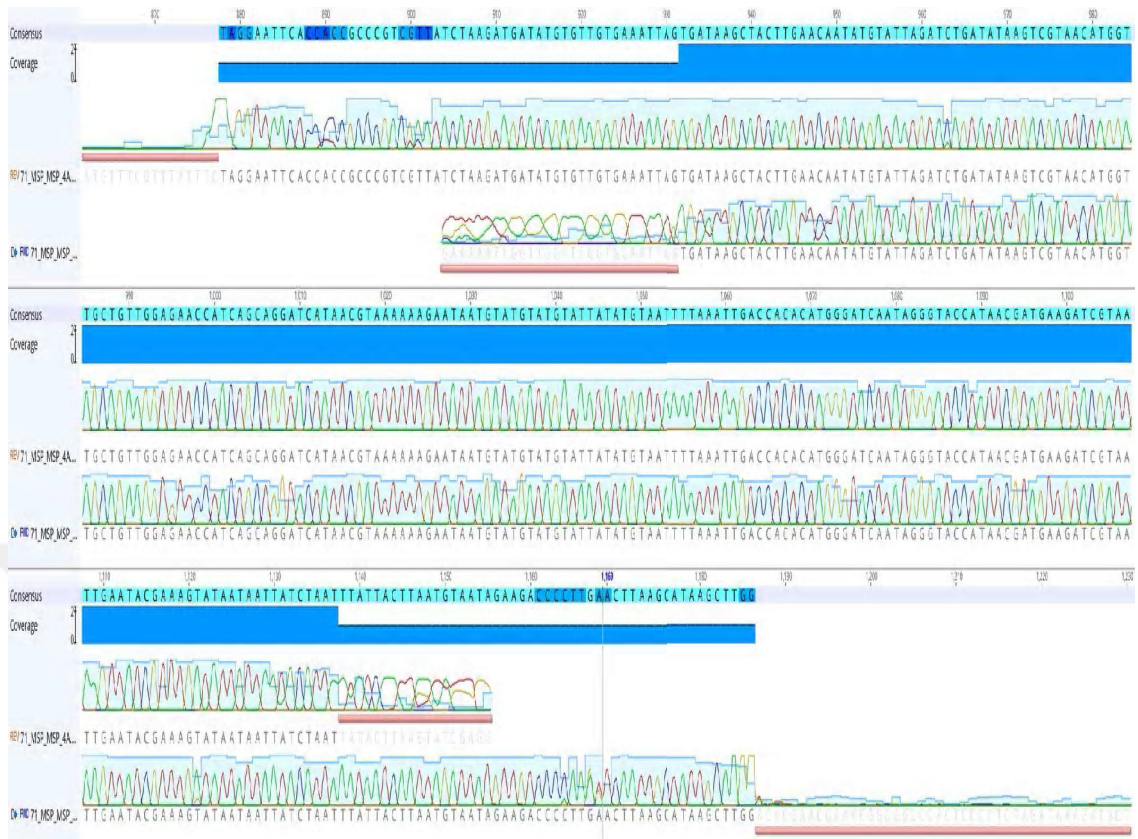
Nested PCR analizleri sonucu microsporidia genel primerler ile pozitif belirlenen iki örneğe ait jel pürifiye ampliconlar MSP3 ve MSP4A primer çiftleri varlığında çift yönlü olarak sekans analizine tabi tutulmuştur. Analiz neticesi yüksek kalite skorlu kromotogramlar elde edilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Çift yönlü dizilerin birleştirilmesi sonucu konsensus sekans dizilimleri oluşturulmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.9 *Microsporidia* rDNA ITS gen bölgesinin MSP4A reverse primeri ile elde edilen kromotogramı



Şekil 4.10 *Microsporidia* rDNA ITS gen bölgesinin MSP3 forward primeri ile elde edilen kromotogramı



Şekil 4.11 DeNovo analizleri sonucu konsensus sekans dizilimi

Kırşehir yöresinden yumuşak karakterdeki tavuk dışkılarından izole edilen iki izolatın sekans primerleri uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen 255 bp rDNA nükleotid dizilerinin blast analizleri ile karakterizasyonları sağlanmış ve identik bulunan izolatlar tek sekans altında MN633958 aksesyon numarası ile GenBank'a kaydedilmiştir. İlgili izolatlara ait sekansın blastn analizleri sonucu GenBank'ta mevcut olan microsporidia türlerinden farklı olduğu tespit edilmiş ve ilgili sekans TRMicChik1 izolat ismiyle *Microsporidia* sp. olarak gen veri tabanına kaydedilmiştir. TRMicChik1 *Microsporidia* sp.'nin *E. bienewisi*, *Encephalitozoon* spp. türleri ve diğer bazı microsporidia türlerine ait ITS gen bölgesi sekanslarıyla ikili hizalama analizi sonucu belirlenen farklılıklar Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9 Tavuk dışkılarından rapor edilen TRMicChick1 izolatu ile diğer bazı microsporidia genotiplerinin, ITS rDNA sekansları çoklu hizalama analizlerine göre genetik farklılıkları (Sağ üst diagonalde italik karakterde verilen değerler standart sapmayı göstermektedir.)

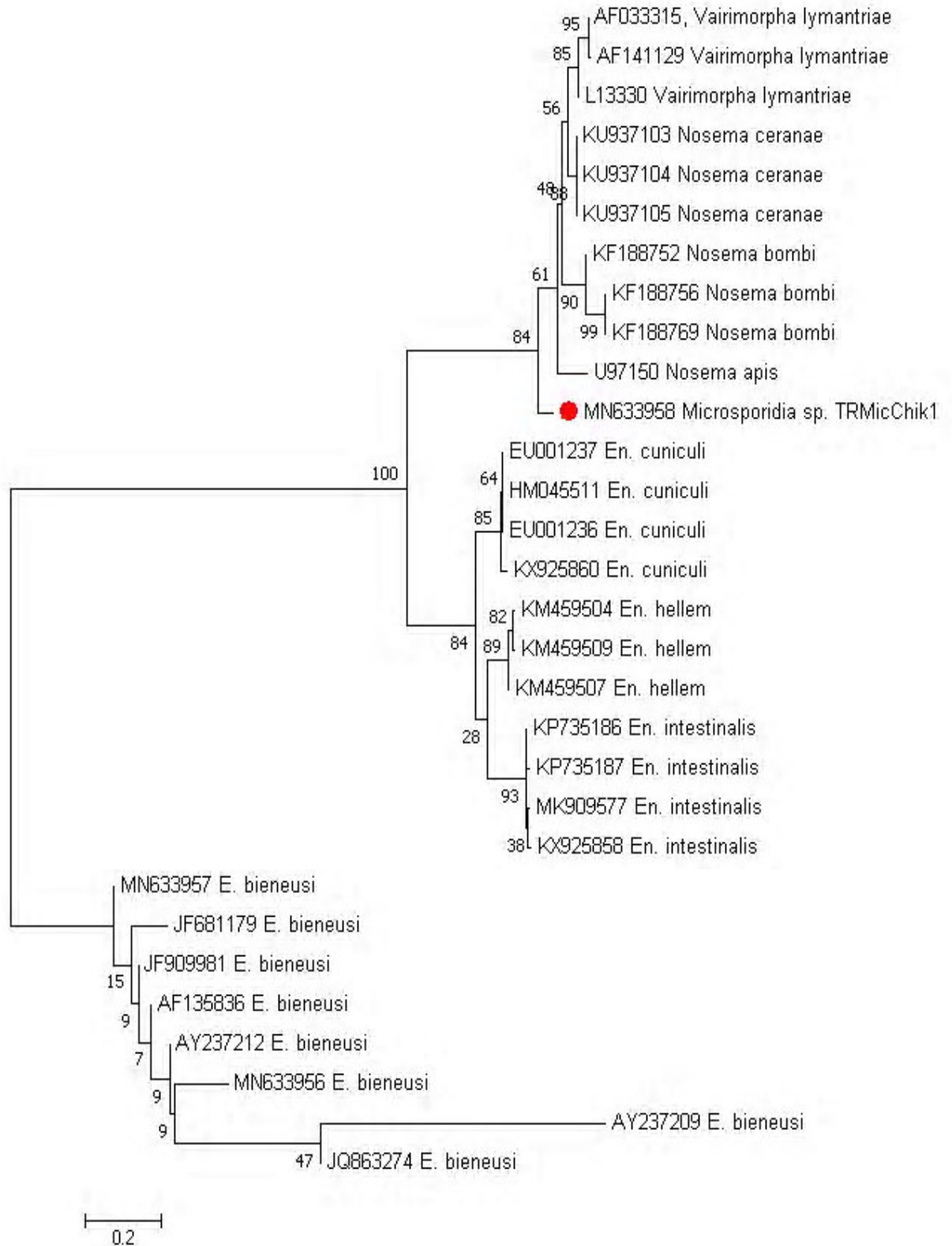
[illegible]

4.3.4 *Microsporidia* sp. Pozitif İzolatların Filogenetik Analizi

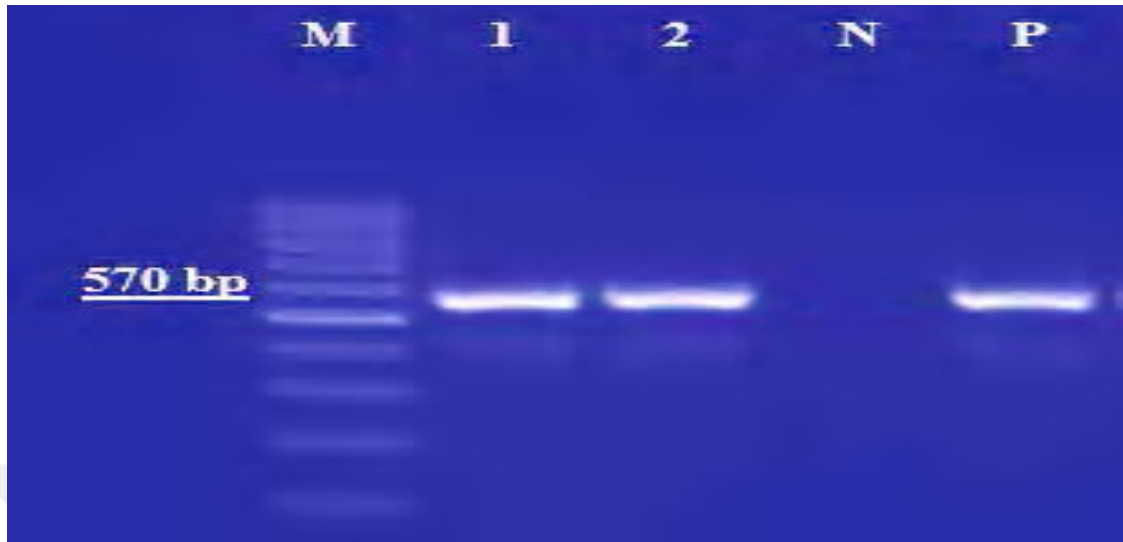
Tavuk dışkılarından izole edilerek moleküler olarak karakterize edilen TRMicChik1 *Microsporidia* sp. izolatının *E. bienersi*, *Encephalitozoon* spp. türleri ve diğer bazı microsporidia türlerine ait izolatlarla ilişkileri filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 4.12) gösterilmiştir. Maximum Likelihood (ML) filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük genogruplar bazında yüksek bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Çalışmada *Microsporidia* taksonunda ilk kez karakterize edilen ilgili izolatın *Nosema* sp. ve *Vairimorpha* sp. türleriyle birlikte filogenetik ağaç üzerinde kümelendiği belirlenmiştir. İlgili küme içerisinde TRMicChik1 *Microsporidia* sp. izolatının *Nosema* sp. ve *Vairimorpha* sp. türlerine dış grup olarak yerleştiği ve genetik olarak sırasıyla $12,6 \pm 3,4$ ve $11,4 \pm 3,3$ farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

4.4 Dışkı Örneklerinin *Salmonella* spp. Yönünden Değerlendirilmesi

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA elusyonlarından *Salmonella* spp. pozitifliğini belirlemek için 16SF ve 16SR primer çiftleri kullanılmıştır. Tavuk dışkı örneklerinden elde edilen gDNA elusyonlarından bölgeleri ve çalışma gruplarını temsil edecek nitelikte, ayrıca koenfeksiyon varlığını tespit etmek amacıyla microsporidia pozitif örnekleri de içerecek şekilde oluşturulan gen havuzuna 60 örnek dahil edilmiş olup, *Salmonella* spp. pozitif 7 ($11,6$) örnek tespit edilmiştir. Ayrıca microsporidia pozitif olarak tespit edilen 24 adet örnekten 2 adet örnekte ($8,3$) *Salmonella* spp. enfeksiyonu da tespit edilmiştir. Analizler sonucu pozitif belirlenen izolatların agaroz jelinde görünümüleri Şekil 4.13'te verilmiştir. İki örneğe ait 16S rRNA amplikonlarının sekans analizleri sonucunda *Salmonella enterica* olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.12 *Microsporidia* sp. izolatlarının rRNA ITS gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. (Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir).



Şekil 4.13 PCR analizi sonucu *Salmonella* sp. pozitif belirlenen örneklerin bazılarının agaroz jelinde görünümü. M: 100bp Marker, 1-2: *Salmonella* sp. pozitif, P: Pozitif Kontrol, N: Negatif Kontrol.

Name	Description	Sequence Length	Topology	Molecule Type	# Sequences	% Pairwise Identity	% Identical Sites	Query cover
MN160621	Salmonella sp. strain FCS 126 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MN160611	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Augustenborg strain FC...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MN160606	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Baiboukoum strain FCS...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809237	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809236	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809235	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809233	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809232	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809231	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809230	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809229	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809228	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809227	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809226	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809225	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809224	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809215	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Indiana strain RM_AST...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809196	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809195	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809194	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809193	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809192	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809189	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809188	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%
MK809187	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM_A...	572	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%

Şekil 4.14 Pozitif belirlenen *Salmonella* sp. ERU-Slm-1 izolatının Blast analiz sonuçları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oldukça geniş bir konak spektrumuna sahip olan microsporidian parazitler insanlarda, çiftlik ve pet hayvanlarında, arılarda, balıklarda ve omurgasız canlılarda enfeksiyona neden olmaktadır. Özellikle HIV pozitif ve organ nakli olan bireyler, çocuklar, yaşlılar, kontak lens kullanıcılarında fırsatçı patojendirler (Anane ve Attouchi, 2010). Microsporidiaların prevalansını belirlemek üzere yapılan çalışmalar genel olarak insanlarda yapılmış olmasına rağmen son yıllarda hayvan konaklar üzerinde yapılan çalışmaların sayısı da giderek artmaktadır. Günümüze kadar 200 cinse ait 1400'e yakın microsporidia türü raporlanmış olup, bunlar içerisinde 8 cinse ait 14 türün insanlarda enfektif olduğu belirlenmiştir (Keeling, 2009). Microsporidiaların zoonotik potansiyeli ile ilgili 1995 yılında yayınlanan ilk raporda köpeklerde ve tavşanlarda tespit edilen *Encephalitozoon cuniculi* türünün insanlar içinde enfektif olduğu öne sürülmüştür (Cama ve ark., 2007). Dengjel ve ark. (2001) yaptıkları filogenetik analizler neticesi insanlar ve hayvan konaklar arasında transmisyon bariyerinin bulunmadığını ortaya koymuş ve *E. bieneusi*'nin zoonotik karakterli olduğunu rapor etmiştir.

Türkiye kaynaklı literatür kayıtları incelendiğinde microsporidialar ile ilgili yapılan çalışmaların daha çok insan temelli çalışmalar olduğu söylenebilir. Farklı hasta gruplarında *E. intestinalis* enfeksiyonu yaygınlığını belirlemek için yapılan bir çalışmada araştırmacılar farklı tanı yöntemleri kullanarak belirledikleri pozitif örneklerin rRNA SSU gen bölgesi sekans konfirmasyonlarını yapmışlar ve *E. intestinalis* enfeksiyonu ile diğer hastalıklar arasındaki ilişkileri ortaya koymuşlardır (Çetinkaya ve ark., 2016). Calik ve ark. (2011) gelişme çağındaki çocuklarda microsporidiosis ve diğer intestinal parazit enfeksiyonlarını araştırdıkları çalışmada, alınan dışkı örneklerinin %7,8'inde microsporidian parazit varlığını tespit etmişlerdir. Türk ve ark. (2012) diyare şikayetli farklı yaş ve cinsiyet gruplarındaki hastalarda farklı boyama teknikleri kullanarak microsporidiaların varlığını araştırdıkları çalışmada microsporidiosis bakımından yaş ve

cinsiyet faktörünün önemsiz olduğunu önermişlerdir. Şıvgın ve ark. (2013) miyelomonosit (M4) lösemi tanılı, hematopoetik kök hücre nakli yapılmış bir hastada gelişen sulu diyare şikâyeti tanısında, etkenin *E. intestinalis* olduğunu tespit etmişlerdir. Türkiye’de hayvanlarda microsporidiaların yaygınlığı üzerine yapılan çalışmaların incelenmesinde; Duzlu ve ark. (2019) köpekler üzerinde yürüttükleri çalışmada incelenen dışkı örneklerinin %14,5’inde microsporidia pozitifliği tespit etmişlerdir. Pekmezci ve ark. (2019) ev kedilerinde microsporidiaların moleküler prevalansını belirlemek için yaptıkları çalışmada inceledikleri dışkı örneklerinden %5 oranında *E. bienersi*, %4 oranında *E. intestinalis* varlığını ortaya koymuşlardır. Ozkan ve ark. (2019) tavşanlarda oküler enfeksiyon transmisyonunun intrauterin yolu ile olduğunu ilk kez moleküler olarak ortaya koymuşlardır. Bilgin (2018) Sivas yöresinde sığırlarda *E. bienersi*’nin moleküler prevalansını belirlemek için yaptığı çalışmada örneklerin %19,3’ünde *E. bienersi* pozitifliği tespit etmiştir. Yıldırım ve ark. (2019) sığır, koyun ve manda çiğ sütlerinde *E. bienersi* moleküler prevalansını %10,2 olarak bulmuşlardır.

Hayvan konaklar üzerinde microsporidian türlerin varlığının tespitine yönelik diğer ülkelerde yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Ancak tavuklar ve diğer kanatlı hayvanlardaki çalışma sayısı sınırlıdır. Reetz (1993) yaptığı çalışmada duyarsızlık, topallık, orta şiddette diyare klinik belirtilerine sahip yaklaşık 40 haftalık tavuktan alınan örneklerin immunohistokimyasal incelemesinde *E. cuniculi* enfeksiyonu tavuklarda ilk kez rapor etmiştir. Reetz ve ark. (2002) kilo kaybı tablosuna sahip 5 haftalık broyler tavuklardan alınan dışkı örneklerinde *E. bienersi* (genotip J) enfeksiyonunu tavuklarda ilk kez moleküler olarak tespit etmişlerdir. Reetz (1994) yapmış olduğu çalışmada incelenen 18 günlük 100 tavuk embriyosunun 40’ında (%40) *E. cuniculi* enfeksiyonunu belirlemiş ve çalışma grubu için vertikal bulaş yolunun varlığını ilk kez tespit etmiştir. Embriyoların nekropsisinde parazitin bütün organlarda özellikle özofagus, intestinal sistem, beyin ve kalp dokularında varlığını immunohistokimyasal incelemede belirlemiştir. Fayer ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada deneysel gastrik gavaj yoluyla *E. hellem* enfekte ettikleri 3-5 günlük tavuk ve hindilerde farklı günlerde atılan dışkı örneklerini mikroskopi ve PCR metoduyla incelemişler ve tavukların *E. hellem* için konak olabileceğini rapor etmişlerdir. Tavuklar üzerinde yapılan bu çalışmalar kontamine yumurta veya tavuk eti tüketiminin, microsporidiaların insanlara yiyecek kaynaklı bulaş yolu ile bulaşabileceği ihtimalini güçlendirici veriler sağlamaktadır. Lee ve ark. (2011) pet papağanlarında yaptıkları çalışmada incelenen pozitif dışkı örneklerinden 7 (%13,7)

tanisinin *E. hellem* (genotip 1A ve 2B), bir (%1,9) tanisinin ise *E. cuniculi* (genotip II) olduğunu ve pet papağanlarının insan microsporidian enfeksiyonları için kaynak olabileceği speküle etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından raporlanan bir çalışmada yaban kazlarının zoonotik microsporidian parazitlerin prevalansının artmasındaki rolünü fekal-oral bulaş yolunun önerilebileceğini ancak bunun günümüze kadar net olarak ortaya konulamadığını, su kaynaklı bulaş yolu potansiyelinin daha yüksek derecede olduğunu speküle etmişlerdir (Elmberg ve ark., 2017).

E. bienewisi izolatlarının genotipleme çalışmaları morfolojik kriterlere göre yapılamamakta ve temel olarak rRNA geni ITS bölgesinin 243 bp'lik bölümündeki polimorfik bölgelere göre yapılmaktadır. *E. bienewisi* rRNA ITS bölgesi izolatlar arasında yüksek oranda çeşitlilik içermektedir (Santin ve Fayer, 2009). Bu zamana kadar yaklaşık 240 genotip identifiye edilmiştir (Jiang ve ark., 2015). Araştırmacılar rRNA ITS gen bölgesi sekans dizilimlerinde göre oluşturdukları filogenetik ağaçlarda *E. bienewisi* genotiplerini alt grupları da içeren 9 farklı gruba bölmüşlerdir (Karim ve ark., 2015; Thellier ve Breton, 2008). Grup 1 filogenetik yapıda en geniş grup olup, zoonotik genotipleri de içermesinden dolayı insan enfektif grup olarak da tanımlanmaktadır. Diğer 8 grup ise farklı konaklarda ve sularda tespit edilen genotipleri barındırmasından dolayı konak adaptif gruplar olarak nitelendirilmiştir (Li ve Xiao, 2019; Stentiford ve ark., 2016). *E. cuniculi* çok küçük genoma sahip olması, polimorfizm çalışmalarını sınırlamış olmasına rağmen ITS gen bölgesi polimorfik bölgelerine göre genotip I (tavşan suşu), genotip II (fare suşu), genotip III (köpek suşu) ve genotip IV olmak üzere dört genotip grubu sınıflandırılmışlardır. Genotip I, II ve III insan ve hayvan konaklarda da tespit edilmiş olması insan *E. cuniculi* enfeksiyonlarının zoonotik karakterli olabileceğini akla getirmelidir (Didier ve ark., 1996; Kodjikian ve ark., 2005; Sokolova ve ark., 2011). *E. hellem* rRNA ITS gen bölgesi polimorfik bölgelerine göre genotip 1, genotip 2 ve genotip 3 olmak üzere 3 genotip grubu oluşturulmuştur (Mathis ve ark., 1999). *E. intestinalis* rRNA ITS gen bölgesi sekans analizinde herhangi bir varyasyon tespit edilememiş olup, HIV pozitif bireylerden elde edilen 15 farklı ve bağımsız genotip tanımlanmıştır (Liguory ve ark., 2000). Tavuklarda yapılan mevcut çalışmalar çerçevesinde Reetz ve ark. (2002) tarafından tespit edilen *E. bienewisi* J genotipin insan patojen grup içerisinde yer aldığı, aynı araştırma grubu tarafından broyler tavuklarda tespit edilen *E. cuniculi* enfeksiyonu için herhangi bir genotipleme yapmadıkları belirlenmiştir (Reetz, 1993).

Microsporidia türlerinin teşhisi için mikroskopik yöntemlerin yanı sıra moleküler tabanlı konvansiyonel PCR, SYBR Green Real-Time PCR ve prob bazlı qPCR yöntemleri kullanılmaktadır. Farklı araştırmacılar tarafından bu yöntemlerin microsporidia türlerini saptamasındaki sensitivite ve spesifite oranları karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir (Polley ve ark., 2011). SYBR Green Real-Time PCR tekniği ile mikroskopi yönteminin microsporidia türlerinin teşhisinde tekniklerin sırasıyla sensitivitelerinin %26,7 ve %93,3 spesifitelerinin ise %100 ve %99,3 olarak tespit etmiş, konvansiyonel Nested-PCR tekniğini altın standart olarak belirtmişlerdir. Bilgin (2018) yapmış olduğu çalışmada SYBR Green RT-PCR yöntemi ile inceledikleri örneklerin %13,3'ünde Ct değeri 28 üzeri amplifikasyon eğrileri saptamıştır. Aynı set örneklerin altın standart Nested-PCR analizlerinde ise SYBR Green RT-PCR yöntemi ile negatif olarak belirlenen 9 örnek pozitif olarak belirlenmiş ve örneklerin sekans konfirmasyonları yapılmıştır. Bu veriler ışığında çalışmamızda daha önce farklı araştırmacılar tarafından karşılaştırmalı sensitivite ve spesifiteleri belirlenen tekniklerden altın standart olarak nitelenen Nested-PCR tekniğini kullanmanın gerekliliği belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında incelediğimiz 300 dışkı örneğinden; halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklardan alınan 22 örnekte (%7,3) *E. bienersi* pozitifliği tespit edilmiş olup, pozitif tespit edilen bir (%4,5) örneğin sekans analizleri ve genotiplendirilmesi sonucu, daha önce Kayseri ve Sivas yöresinde sığırlarda *E. bienersi* üzerine çalışmalar (Bilgin, 2018) kapsamında tespit edilen ERUSS1 genotipi ile tam olarak homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Konak adaptif genotipler içerisinde ve Grup 2'de yer alan genotipin filogenetik ağaç üzerindeki yeri incelendiğinde farklı ülkelerde sığır, koyun, geyik, kedi ve maymun türlerinde tespit edilen BEB6 genotipi ile (%99,2-%99,6) ve Çin'de bir insandan tespit edilen SH5 (%99,2-%99,6) genotipi ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Bilgin, 2018). Bahse konu çalışma sonuçları ile tarafımızca aynı bölgede ERUSS1 genotipinin tespit edilmiş olması, çalışmamızın sonucunu doğrular niteliktedir. Ayrıca ERUSS1 genotipinin bölgedeki yaygınlığı, sığır ve tavuklar gibi bölgede yoğun biçimde yetiştiriciliği yapılan ve insanlarla gerek vücut gerekse de ürünleri ile yakın ilişkide olan konaklarda tespit edilmiş olması genotipin enfeksiyon kapasitesinin yüksek olduğu ve bölgede yaşayan insanlar için zoonotik microsporidia enfeksiyon riskinin var olduğu şeklinde speküle edilebilir. Araştırma bölgemizde ve dünyada tavuk konaklarda ilk kez tespit edilen bu genotipin, konaklar arasında transmisyon bariyerinin bulunmadığı,

araştırma bölgesinde diğer konaklarda ve özellikle insanlarda yapılacak epidemiyolojik çalışmalar ile zoonotik karakterinin ortaya konulmasının gerekliliği önem arz etmektedir.

E. bienersi pozitifliği belirlenen diğer 21 (%95,5) örneğin sekans karakterizasyonu ve genotiplendirilmesi sonucu yeni bir genotipin varlığı tespit edilmiştir. ERUNT1 olarak isimlendirilen bu genotip, GenBank'ta kayıtlı mevcut karakterize edilmiş genotiplerden en düşük farklılığı %0,6 olarak göstermiştir. ERUNT1 genotipinin Grup 1 içerisinde ve zoonotik karakterli gruplar arasında yer aldığı tespit edilmiştir. Dünyada ilk kez tespit edilen bu genotipin zoonotik karakterli grup içerisinde yer alması araştırma bölgesinde diğer konaklarda ve özellikle insanlarda yapılacak epidemiyolojik çalışmalar ile zoonotik karakterinin ortaya konulmasının gerekliliği önem arz etmektedir. Nitekim ilgili genotipin Brezilya'da tavuk (KT943972), Nijeryada insan (JX683799), Çin'de at (MK789441) ve kedi (KX964628), Peru'da alpaka (KC868884) ve genotip BEB5'te bildirilen ABD'de sığır (AY331009) izolatlarıyla %99,2 oranında yüksek identiklik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Laboratuvar analizlerinde microsporidia genel MSP primer çiftleri ile pozitif olarak belirlediğimiz iki örneğin sekans karakterizasyonu sonucu, tek bir haplotipe ait oldukları ve yeni bir microsporidia türüne ait olabileceği belirlenmiş olup ilgili haplotip *Microsporidia* sp. TrMicChik1 izolatı olarak adlandırılmış ve gen veri tabanına kayıt edilmiştir. İlgili genotip GenBank'ta kayıtlı microsporidia izolatları arasında en yakın genetik ilişkiyi %12-15 farklılıkla arılarda enfektif *Nosema ceranae* genotiplerine göstermiştir. Filogenetik olarak ortaya çıkan bu farklılık örnekleme veya analizler sırasında herhangi bir kontaminasyon ihtimalinin varlığı açısından irdelenmiştir. Ancak daha önce ve analizler boyunca laboratuvarımız da herhangi bir *Nosema* sp. türü ile ilgili çalışmanın olmaması ve analizlerin tümüyle steril kabinler içerisinde aseptik koşullarda yapılması laboratuvar kontaminasyonu ihtimalini ortadan kaldırmaktadır. Örnek dışkının herhangi bir enfekte arı türüne ait çıkartı/vücut parçaları ile kontamine olması veya enfekte arının tavuk tarafından yenilerek microsporidia sporlarının dışkı ile atılması sonucu dışkının *Nosema* sp. sporları barındırma ihtimalide değerlendirilmektedir. Ancak belirlediğimiz izolat ile *Nosema* sp. genotipleri arasında %10'dan fazla bir genetik farklılığın bulunmuş olması ilgili izolatın henüz Dünya literatüründe tanımlanmamış olan yeni bir *Microsporidia* türüne ait olabileceği görüşünü ön plana çıkarmaktadır. Tüm bu verilerin ve görüşlerin açıklığa kavuşturulması için ilgili izolatın belirlendiği odakta tavuk

ve diğer konaklar üzerinde yeniden örneklemelerle detaylı morfolojik ve moleküler tabanlı tekniklerin epidemiyolojik çerçevede uygulanması gerekmektedir.

Saha çalışmalarındaki gözlemlerimiz, yetiştiriciler ile yapılan karşılıklı görüşmeler ve çalışma sonuçlarımız göz önüne alındığında;

-Gerek yumurtacı gerekse de etlik piliç işletmelerinin kapalı kümes sisteminin olması, yemleme ve sulama sistemlerinin otomatik mekanizasyon ile kontrollü biçimde sağlanması, kümes girişlerinde uygun dezenfekte edici kimyasal solüsyonların kullanılması microsporidian sporların bulaş yollarını engelleyici faktörler olarak ortaya çıkmaktadır.

-Halk elinde yetiştiriciliği yapılan serbest gezen tavuk çiftlik ve kümeslerinde ise kümeslerin ve gezinti alanlarının bazı yetiştiriciler tarafından kireçlenerek dezenfekte ediliyor olması, küçük ölçekli kümes ve gezinti alanlarının üzerinin yabancı kuş türlerinin girişini engelleyecek biçimde file ile örtülmüş olması, sulama sularının çeşme suyundan sağlanması gibi tedbirlerin microsporidian sporların bulaş yollarını engelleyici faktörler olduğu speküle edilebilir.

Salmonella enterica çok geniş konak aralığına sahip akut veya kronik enfeksiyonlara neden olan gram (-) bakterilerdir. *S. enterica* asemptomatik klinikte olabileceği gibi gastroenterit tifoid ateşi gibi sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *S. enterica* Serovar Typhi ve Paratyphi enfeksiyonları diyare, yorgunluk ve ateş gibi klinik belirtiler vermektedir (Hurley ve ark., 2014).

Zoonotik karakterli *Salmonella* spp. kanatlılardaki en büyük problemlerden birisini oluşturmaktadır. Yumurtacı ve etlik piliç (broiler) işletmelerinde performans kaybı ve ölümlere neden olarak maddi kayıplar meydana getirmektedir. Çalışmamızda oluşturduğumuz gen havuzu kapsamında incelediğimiz örneklerden 7 (%11,6) örnekte salmonellosis varlığı moleküler olarak tespit edilmiş ve sekans analizleriyle ilgili izolatların *S. enterica*'ya ait olduğu belirlenmiştir. Microsporidiosis pozitif örneklerin ikisinde (%8,3) *S. enterica* ile koenfeksiyon tespit edilmiştir. Araştırmacılar konaklardaki *Salmonella* enfeksiyonunun, immun sistem elemanlarından bir kısmının ifadesini azalttığını rapor etmişlerdir (Bayer-Santos ve ark., 2016). Bu önerme ile immun sistemin patojen enfeksiyonu kaynaklı zayıflaması, diğer bazı fırsatçı enfektif ajanlar için uygun ortam oluşturabildiği ve konakta koenfeksiyonların gelişebildiği speküle edilebilir.

İnsanoğlunun hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında ve günlük diyet rejimleri içerisinde önemli bir yere sahip olan et ve yumurta vazgeçilemez gıda maddeleridir. Türkiye’de hayvansal protein ihtiyacının karşılanması, hızlı üreme kapasitesi ve iklim-yer kesin istekleri olmayan tavukçuluğun diğer hayvansal üretim dalları arasında önemli yeri bulunmaktadır (Çınar, 2008). Ülkemizde kırmızı et fiyatlarının dünya standartlarına göre yüksek seyretmesine bağlı olarak, yükselen alım gücünün doğurduğu hayvansal protein ihtiyacı çoğunlukla kanatlı eti ile karşılanmaktadır. Ayrıca alt kolları ile birlikte kanatlı eti ve yumurta sektörü meydana getirdiği istihdam ve katma değer ile ülke ekonomisine önemli katkıda bulunmaktadır (Çınar ve ark., 2008). Bu kapsamda tavuklarda, ihmal edilen ve fırsatçı patojen olan microsporidiaların oluşturacağı enfeksiyonlar performans kaybı ve ölümlere neden olması ile bireysel ve ülke ekonomisine zarar verecektir.

Teknolojik gelişmeler, eğitim seviyesinin, ekonomik ve sosyal refahın artması, sosyal medya kullanımının yüksek olması insanların organik gıdalara ve sağlıklı beslenmeye olan ilgisini arttırmıştır. Fakat bu durum gerek sosyal medyada gerekse de basılı yayınlarda doğru bilginin yanında yanlış bilgilerinde ortaya çıkmasına neden olmuştur (Sağlam ve Gümüş, 2019). Tavuk eti ve yumurta konusunda fazlaca rastlanılan bu bilgi kirliliği insanların organik tavuk ve tavuk ürünleri tercihinin artmasına neden olmuş ve semt pazarlarında, bakkallarda veya şarküterilerde köy yumurtası, köy tavuğu gibi ürünlerin satışı artmıştır. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar tarafından semt pazarlarında ve marketlerde satışa sunulan köy ve market yumurtalarının patojen yükleri incelemiş ve köy yumurtasındaki toplam mezofilik aerob bakteri sayısının daha yüksek olduğu raporlanmıştır (Erkan ve ark., 2008). Microsporidian parazit enfeksiyonların da fekal-oral yol bulaş yolunun önemi göz önüne alındığında, kontamine yumurta ile temas eden eller, yiyecekler, mutfak ekipmanları ve benzerlerinin enfektif ajanın bulaşmasında rol alabileceği unutulmamalıdır. Bu noktada tüketicilerin hijyen koşullarına uyması önem arz etmektedir.

Çalışmamızda halk elinde yapılan yetiştiricilikte ırk tercihinin olmaması ve ırk karışık (ve ayrıca melez ırk) kümeslerin yoğunlukta olması, üreticilerin kümeslerinde tespit edilecek hastalık durumunda tavuklarının itlaf edileceği yönünde kaygı düzeyleri, hastalık durumlarının ilgili kamu kurumları ile paylaşılması veya sorumluların konuya yeterli ilgi göstermemesi en büyük kısıtlamalardan olmuştur.

Sonuç olarak, Türkiye’de insanlar ile yakın ilişkide olan tavuklarda zoonotik microsporidiaların prevalansının tespitine yönelik literatür kaydının bulunmayışı, fırsatçı patojen olan bu parazitlerin mevcut durumunu ortaya konulması bakımından çalışmamız ilk olma özelliği taşımaktadır. Türkiye genelinde microsporidiaların farklı konaklardaki prevalansının tam olarak ortaya konulması için çok merkezli çalışma planlamaları yapılarak epidemiyolojik verilerin ortaya çıkarılması ve zoonotik karakterli genotiplerin belirlenmesi, microsporidiosisin kontrolü ve mücadele stratejilerinin şekillendirilmesi açısından önem arz etmektedir.



6. KAYNAKLAR

<https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/> Erişim tarihi: 07.11.2019.

<https://www.yum-bir.org> Erişim tarihi: 07.11.2019.

Aarons EJ, Woodrow D, Hollister WS, Canning EU, Francis N, Gazzard BG. Reversible renal failure caused by a microsporidian infection. *AIDS* 1994; 8: 1119-21.

Akiyoshi DE, Weiss LM, Feng X, Williams BA, Keeling PJ, Zhang Q, Tzipori S. Analysis of the beta-tubulin genes from *Enterocytozoon bienewisi* isolates from a human and rhesus macaque. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2007; 54: 38-41.

Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2010; 34: 450-464.

Bayer-Santos E, Durkin CH, Rigano LA, Kupz A, Alix E, Cerny O, Jennings E, Liu M, Ryan AS, Lapaque N, Kaufmann SHE, Holden DW. The *Salmonella* effector SteD mediates MARCH8-Dependent ubiquitination of MHC II molecules and inhibits T Cell activation. *Cell Host & Microbe* 2016; 20: 584-595.

Becker SL, Vogt J, Knopp S, Panning M, Warhurst DC, Polman K, Marti H, Von Müller L, Yansouni CP, Jacobs J. Persistent digestive disorders in the tropics: causative infectious pathogens and reference diagnostic tests. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 37.

Bergquist R, Morfeldt-Månsson L, Pehrson PO, Petrini B, Wasserman J. Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scand. J. Infect. Dis.* 1984; 16: 389-391.

Bigliardi E, Sacchi L. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection* 2001; 3: 373-79.

- Bilgin T. Sivas yöresinde sağlıklı sığırlarda *Enterocytozoon bieneusi*' nin moleküler prevalansı ve filogenetik karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri. 2018: 79.
- Blanshard C, Ellis DS, Tovey DG, Dowell S, Gazzard BG. Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. AIDS 1992; 6: 311-3.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PM, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 495-503.
- Botterel F, Minozzi C, Vittecoq D, Bouree P. Pulmonary localization of *Enterocytozoon bieneusi* in an AIDS patient: case report and review. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 4800-1.
- Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68: 2595-2599.
- Cali A. General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates. J. Protozool. 1991; 38: 625-30.
- Cali A. Morphogenesis in the genus *Nosema*. Proc. IVth Int. Colloq. Insect Pathol., 1971. 104-112.
- Cali A, Weiss LM, Takvorian PM. A review of the development of two types of human skeletal muscle infections from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. Folia Parasitol. (Praha) 2005; 52: 51.
- Calik S, Karaman U, Colak C. Prevalence of microsporidium and other intestinal parasites in children from Malatya, Turkey. Indian J. Microbiol. 2011; 51: 345-349.
- Call A, Takvorian PM, Lewin S, Rendel M, Sian CS, Wittner M, Tanowitz HB, Keohane E, Weiss LM. *Brachiola vesicularum*, ng. n. sp., a new microsporidium associated with AIDS and myositis. J. Eukaryot. Microbiol. 1998; 45: 240-251.
- Cama VA, Pearson J, Cabrera L, Pacheco L, Gilman R, Meyer S, Ortega Y, Xiao L. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 2708-10.

- Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 1987; 326: 332-333.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 1998; 73: 203-266.
- Chen J, Guo W, Dang X, Huang Y, Liu F, Meng X, An Y, Long M, Bao J, Zhou Z, Xiang Z, Pan G. Easy labeling of proliferative phase and sporogonic phase of microsporidia *Nosema bombycis* in host cells. *PLoS One* 2017; 12: e0179618.
- Conteas C, Berlin O, Ash L, Pruthi J. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63: 121-127.
- Costa SF, Weiss LM. Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resistance Updates* 2000; 3: 384-399.
- Cox JC, Gallichio HA, Pye D, Walden NB. Application of immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi*-free rabbit colony. *Lab. Anim. Sci.* 1977; 27: 204-9.
- Coyle CM, Wittner M, Kotler DP, Noyer C, Orenstein JM, Tanowitz HB, Weiss LM. Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 23: 1002-1006.
- Çetinkaya Ü. Farklı Hasta Gruplarında *Encephalitozoon intestinalis*' in Araştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2014:122.
- Çetinkaya Ü, Yazar S, Kuk S, Sivcan E, Kaynar L, Arslan D, ŞahİN İ. The high prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in patients receiving chemotherapy and children with growth retardation and the validity of real-time PCR in its diagnosis. *Turk J Med Sci* 2016; 46: 1050-1058.
- Çınar H. Avrupa Birliğine uyum sürecinde Türkiye' de tavuk unu kullanımına getirilecek yasaklamanın broyler entegrasyonları üzerine ekonomik etki analizi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009:145.
- Çınar H, Demir A, Top TB. Türkiye kanatlı eti alt sektörü rekabet analizi ve politika önerileri. 8. Türkiye Tarım Ekonomisi Kongresi, Bursa.2008; 114-124

- Da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, De Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ. Sensitive PCR diagnosis of infections by *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 986-987.
- Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, Wallace S, Pieniazek NJ. Detection of *Septata intestinalis* (Microsporidia) Cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. Mol. Diagn. 1997; 2: 47-52.
- De Graaf D, Masschelein G, Vandergeynst F, De Brabander H, Jacobs F. In Vitro germination of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) spores and its effect on their $\alpha\alpha$ -trehalose/d-Glucose ratio. J. Invertebr. Pathol. 1993; 62: 220-225.
- Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, Heinritzi K, Spillmann T, Thomschke A, Löscher T, Gothe R, Rinder H. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 4495-4499.
- Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool. 1985; 32: 250-4.
- Didier E, Stovall M, Green L, Brindley P, Sestak K, Didier P. Epidemiology of microsporidiosis: Sources and modes of transmission. Vet. Parasitol. 2004; 126: 145-166.
- Didier E, Vossbrinck C, Baker M, Rogers L, Bertucci D, Shadduck J. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology 1995; 111: 411-421.
- Didier ES. Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41: 1541-1546.
- Didier ES. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop. 2005; 94: 61-76.
- Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ. Therapeutic strategies for human microsporidia infections. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2005; 3: 419-34.

- Didier ES, Visvesvara GS, Baker MD, Rogers LB, Bertucci DC, De Groote MA, Vossbrinck CR. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 2835-2837.
- Dong S, Shen Z, Xu L, Zhu F. Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of five microsporidia. Curr. Microbiol. 2010; 60: 30.
- 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;0: 1-7
- Elmberg J, Berg C, Lerner H, Waldenstrom J, Hessel R. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literature from a One Health perspective. Infect Ecol Epidemiol 2017; 7: 1-22.
- Erkan ME, Vural A, Güran HŞ. Diyarbakır İli'nde Satışa Sunulan Köy ve Market Yumurtalarının Hijyenik Kalitesi Üzerine Bir Araştırma. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 11-16.
- Fayer R, Santin-Duran M. Epidemiology of microsporidia in human infections. Microsporidia: Pathogens of Opportunity 2014; 135-164.
- Fayer R, Santin M, Palmer R, Li X. Detection of *Encephalitozoon hellem* in feces of experimentally infected chickens. J. Eukaryot. Microbiol. 2003; 50: 574-576.
- Fedorko DP, Nelson NA, Cartwright CP. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 1739-1741.
- Ferreira FMB, Bezerra L, Santos MBG, Bernardes RMA, Avelino I, Sampaio Silva ML. Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. Microbes and Infection 2001; 3: 1015-1019.
- Field AS, Hing MC, Milliken ST, Marriott DJ. Microsporidia in the small intestine of HIV-infected patients. A new diagnostic technique and a new species. Med. J. Aust. 1993; 158: 390-4.

- Foudraine NA, Weverling GJ, Van Gool T, Roos MT, De Wolf F, Koopmans PP, Van Den Broek PJ, Meenhorst PL, Van Leeuwen R, Lange JM, Reiss P. Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy. *AIDS* 1998; 12: 35-41.
- Franzen C. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol. (Praha)* 2005; 52: 36-40.
- Franzen C. Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol* 2004; 20: 275-9.
- Franzen C, Futerman PH, Schroeder J, Salzberger B, Kraaijeveld AR. An ultrastructural and molecular study of *Tubulinosema kingi* Kramer (Microsporidia: Tubulinosematidae) from *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) and its parasitoid *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Invertebr. Pathol.* 2006; 91: 158-167.
- Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 243-285.
- Franzen C, Salzberger B. Analysis of the beta-tubulin gene from *Vittaforma corneae* suggests benzimidazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 790-3.
- Frixione E, Ruiz L, Santillán M, De Vargas LV, Tejero JM, Undeen AH. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil.* 1992; 22: 38-50.
- Garcia LS. Laboratory Identification of the Microsporidia. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 1892-1901.
- Ghosh K, Schwartz D, Weiss LM Laboratory Diagnosis of Microsporidia. In: WEISS, LM & BECNEL, JJ (eds.) *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, First Edition. 2014:421-456
- Goguel J, Katlama C, Sarfati C, Maslo C, Leport C, Molina JM. Remission of AIDS-associated intestinal microsporidiosis with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1997; 11: 1658-9.
- Han B, Weiss LM. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol Spectr* 2017; 5.

- Han B, Weiss LM. Therapeutic targets for the treatment of microsporidiosis in humans. *Expert Opin. Ther. Targets* 2018; 22: 903-915.
- Hurley D, Mccusker MP, Fanning S, Martins M. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front. Immunol.* 2014; 5: 481-481.
- Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, Zhang S, Li W. Zoonotic and potentially host-adapted *Enterocytozoon bieneusi* 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: 3326-3335.
- Karaman Ü. İnsanlarda Microsporidiaların Epidemiyolojisi (Malatya ili örneği), Doktora tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya. 2007;120
- Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, Li J, Wang R, Li S, Li X, Rume FI, Ning C. Predomination and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive nonhuman primates in zoos in China: High genetic diversity and zoonotic significance. *PLoS One* 2015; 10: 1-14
- Katznelson H, Jamieson CA. Control of nosema disease of honeybees with fumagillin. *Science* 1952; 115: 70-1.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Deplazes P, Weber R, Löscher T, Rinder H. Comparison of polymerase chain reaction with light microscopy for detection of microsporidia in clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997; 16: 7-10.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Heise W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1996; 1: 373-378.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647-9.
- Keeling P. Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog.* 2009; 5.
- Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56: 93-116.

- Keoghane E, Weiss L The Structure, Function, and Composition of the Microsporidian Polar Tube. In: WEISS, L (ed.) The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, DC: ASM Press. 1999
- 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.
- Kock N, Petersen H, Fenner T, Sobottka I, Schmetz C, Deplazes P, Pieniazek N, Albrecht H, Schottelius J. Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1997; 16: 369-376.
- Koçer Z. Tavuklarda *Dermanyssus gallinae*' nin Moleküler Karakterizasyonu ve *Salmonella* spp. Yönünden Vektörlük Potansiyellerinin Moleküler Olarak Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri. 2016.81
- Kodjikian L, Garweg JG, Nguyen M, Schaffner T, Deplazes P, Zimmerli S. Intraocular microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. Int. J. Med. Microbiol. 2005; 294: 529-533.
- Kovacs-Nolan J, Phillips M, Mine Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 8421-8431.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 2016; 33: 1870-1874.
- Lawlor EM, Moretto MM, Khan IA. Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. Infection and immunity 2010; 78: 3097-102.
- Lee S-Y, Lee S-S, Lyoo YS, Park H-M. DNA detection and genotypic identification of potentially human-pathogenic microsporidia from asymptomatic pet parrots in South Korea as a risk factor for zoonotic emergence. Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77: 8442-8444.
- Li W, Xiao L. Multilocus Sequence Typing and Population Genetic Analysis of *Enterocytozoon bieneusi*: Host Specificity and Its Impacts on Public Health. Front Genet 2019; 10: 307.

- Liguory O, Fournier S, Sarfati C, Derouin F, Molina J-M. Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Intestinal Microsporidiosis. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 2389-2391.
- Lobo ML, Xiao L, Cama V, Magalhães N, Antunes F, Matos O. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. Appl. Environ. Microbiol. 2006a; 72: 7380-7382.
- Lobo ML, Xiao L, Cama V, Stevens T, Antunes F, Matos O. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in mammals in Portugal. J. Eukaryot. Microbiol. 2006b; 53: S61-S64.
- Lom J, Corliss J. Ultrastructural Observations on the development of the microsporidian protozoon *Plasmodium hyphessobryconis* Schaperclaus. J. Eukaryot. Microbiol. 2007; 14: 141-152.
- Magaud A, Achbarou A, Desportes-Livage I. Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. J. Eukaryot. Microbiol. 1997; 44: 81s.
- Marc Orenstein J, Chiang J, Steinberg W, Smith PD, Rotterdam H, Kotler DP. Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients: A report of 20 cases. Hum. Pathol. 1990; 21: 475-481.
- Mathis A, Tanner I, Weber R, Deplazes P. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 767-770.
- Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18: 423-445.
- Matsubayashi H, Koike T, Mikata I, Takei H, Hagiwara S. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. AMA Arch. Pathol. 1959; 67: 181-7.
- Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, Chevret S, De Gouvello A, Gobert JG, Balkan S, Derouin F. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. N. Engl. J. Med. 2002; 346: 1963-9.
- Moretto MM, Weiss LM, Combe CL, Khan IA. IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against

- intracellular parasitic infection. J. Immunol. 2007; 179: (Baltimore, Md. : 1950)2485-2492.
- Mumcuoglu I, Cetin F, Dogruman Al F, Oguz I, Aksu N. Prevalence of microsporidia in healthy individuals and immunocompetent patients with acute and chronic diarrhea. Infect. Dis. 2016; 48: 133-137.
- Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. Annu. Rev. Genet 1996; 30: 371-403.
- Niederkorn JY, Shadduck JA, Schmidt EC. Susceptibility of selected inbred strains of mice to *Encephalitozoon cuniculi*. J. Infect. Dis. 1981; 144: 249-53.
- Oguz Kaya I, Dogruman Al F, Mumcuoglu I. Investigation of Microsporidia prevalence with calcofluor white and uvitex 2B chemiluminescence staining methods and molecular analysis of species in diarrheal patients. Mikrobiyol. Bul. 2018; 52: 401-412.
- Ombrouck C, Ciceron L, Biligui S, Brown S, Marechal P, Van Gool T, Datry A, Danis M, Desportes-Livage I. Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 652-5.
- Ozkan O, Karagoz A, Kocak N. First molecular evidence of ocular transmission of Encephalitozoonosis during the intrauterine period in rabbits. Parasitol. Int. 2019; 71: 1-4.
- Park SS, Lillehoj HS, Allen PC, Park DW, Fitzcoy S, Bautista DA, Lillehoj EP. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic Enteritis. Avian Dis. 2008; 52: 14-22.
- 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: 13-18.

- Polley SD, Boadi S, Watson J, Curry A, Chiodini PL. Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60: 459-66.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25: 1253-1256.
- Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45: S99-S111.
- Raynaud L, Delbac F, Broussolle V, Rabodonirina M, Girault V, Wallon M, Cozon G, Vivares CP, Peyron F. Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 37-40.
- Reetz J. Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. *Tierarztl. Prax.* 1994; 22: 147-150.
- Reetz J. [Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens]. *Tierarztl. Prax.* 1993; 21: 429-35.
- Reetz J, Rinder H, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Bruderek A. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int. J. Parasitol.* 2002; 32: 785-787.
- Rinder H, Janitschke K, Aspöck H, Da Silva AJ, Deplazes P, Fedorko DP, Franzen C, Futh U, Hüniger F, Lehmacher A. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1814-1818.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-Delbarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sanchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* 2017; 34: 3299-3302.
- Sağlam K, Gümüş T. Yazılı, Görsel ve Sosyal Medyada Gıda ile İlgili Bilgi Kirliliğinin Halkın Gıda Tercihi Üzerine Etkileri. *Gıda* 2019; 44: 153-162.
- Sak B, Kašičková D, Kváč M, Květoňová D, Ditrich O. Microsporidia in exotic birds: Intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Parasitol.* 2010; 168: 196-200.

- Santin M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. J. Eukaryot. Microbiol. 2009; 56: 34-38.
- Santin M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. Res. Vet. Sci. 2011; 90: 363-371.
- Schneeberger PHH, Becker SL, Pothier JF, Duffy B, N'goran EK, Beuret C, Frey JE, Utzinger J. Metagenomic diagnostics for the simultaneous detection of multiple pathogens in human stool specimens from Côte d'Ivoire: a proof-of-concept study. Infect. Genet. Evol. 2016; 40: 389-397.
- Singh I, Sheoran AS, Zhang Q, Carville A, Tzipori S. Sensitivity and specificity of a monoclonal antibody-based fluorescence assay for detecting *Enterocytozoon bieneusi* spores in feces of simian immunodeficiency virus-infected macaques. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12: 1141-1144.
- Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shaddock JA. Animal models of human microsporidial infections. Lab. Anim. Sci. 1998; 48: 589-92.
- Sodqi M, Brazille P, Gonzalez-Canali G, Cornet M, Piketty C, Weiss L. Unusual pulmonary *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in an AIDS patient: case report and review. Scand. J. Infect. Dis. 2004; 36: 230-1.
- Sokolova OI, Demyanov AV, Bowers LC, Didier ES, Yakovlev AV, Skarlato SO, Sokolova YY. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. J. Clin. Microbiol. 2011; 49: 2102-2108.
- Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. Taxonomy of phylum microspora. Crit. Rev. Microbiol. 1992; 18: 285-395.
- Stentiford G, Becnel J, Weiss LM, Keeling P, Didier E, Bjornson S, Freeman M, Brown M, Roesel K, Sokolova Y. Microsporidia—emergent pathogens in the global food chain. Trends in Parasitology 2016; 32: 336-348.
- Su L, Su C-W, Qi Y, Yang G, Zhang M, Cherayil BJ, Zhang X, Shi HN. Coinfection with an intestinal helminth impairs host innate immunity against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and exacerbates intestinal inflammation in Mice. Infect. Immun. 2014; 82: 3855-3866.

- Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaisar MM, Wammes LJ, Van Lieshout L, Luty AJ, Sartono E. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40: 1171-1176.
- Şıvgın S, Eser B, Kaynar L, Kurnaz F, Şıvgın H, Yazar S, Cetin M, Ünal A. *Encephalitozoon intestinalis*: a rare cause of diarrhea in an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipient complicated by albendazole-related hepatotoxicity. *Turkish Journal of Hematology* 2013; 30: 204.
- Talabani H, Sarfati C, Pillebout E, Van Gool T, Derouin F, Menotti J. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 2651-2653.
- Thellier M, Breton J. *Enterocytozoon bienersi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 2008; 15: 349-58.
- Türk S, Al Doğruman F, Karaman U, Kuştımur S. Investigation of microsporidia prevalence by different staining methods in cases of diarrhea. *Mikrobiyol. Bul.* 2012; 46: 85-92.
- Undeen AH. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *J. Theor. Biol.* 1990; 142: 223-235.
- Usluca S, Aksoy Ü. İmmün sistemi baskılanmış bir çocukta *Microsporidium* spp. enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması. *Mikrobiyol. Bul.* 2010; 44: 679-83.
- Valencakova A, Halanova M. Immune response to *Encephalitozoon infection* review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 35: 1-7.
- Vandermeer JW, Gochner TA. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 1971; 17: 38-41.
- Vavra J Structure of the microsporidia. *Comparative Pathobiology*, Plenum Press, New York, 1976: pp.1-85.
- Vinckier D, Porchet E, Vivier E, Vavra J, Torpier G. A freeze-fracture study of microsporidia (Protozoa: Microspora): II. The extrusion apparatus: Polar filament, polaroplast, posterior vacuole. *Eur J Protistol* 1993; 29: 370-80.

- Visvesvara GS. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15: 401-413.
- Vivarens CP, Gouy M, Thomarat F, Méténier G. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. Curr. Opin. Microbiol. 2002; 5: 499-505.
- Vossbrinck CR, Woese CR. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. Nature 1986; 320: 287-288.
- Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N. Engl. J. Med. 1992; 326: 161-6.
- Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin. Microbiol. Rev. 1994; 7: 426-461.
- Weber R, Deplazes P, Flepp M, Mathis A, Baumann R, Sauer B, Kuster H, Luthy R. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med. 1997; 336: 474-8.
- Weber R, Ledergerber B, Zbinden R, Altwegg M, Pfyffer GE, Spycher MA, Briner J, Kaiser L, Opravil M, Meyenberger C, Flepp M, Study FTSHC. Enteric infections and diarrhea in Human Immunodeficiency Virus–Infected Persons: Prospective Community-Based Cohort Study. JAMA Internal Medicine 1999; 159: 1473-1480.
- Weiss LM, Vossbrinck CR. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. The microsporidia and microsporidiosis. American Society of Microbiology. 1999
- Williams BA. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. Cell. Microbiol. 2009; 11: 1551-60.
- Yachnis AT, Berg J, Martinez-Salazar A, Bender BS, Diaz L, Rojiani AM, Eskin TA, Orenstein JM. Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. Am. J. Clin. Pathol. 1996; 106: 535-43.

- Yang B, Ma T, Dong JY, Verkman AS. Partial correction of the urinary concentrating defect in aquaporin-1 null mice by adenovirus-mediated gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 2000; 11: 567-75.
- Yang D, Pan L, Chen Z, Du H, Luo B, Luo J, Pan G. The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Exp. Parasitol.* 2018; 187: 93-100.
- Yıldırım Y, Yıldırım A, Gönülalan Z, Onmaz NE, Düzlü Ö, Hızlısoy H, Önder Z, Al S. 2019. Sığır, koyun ve manda çiğ sütlerinde zoonotik karakterli *Encephalitozoon* ve *Enterocytozoon* türlerinin moleküler identifikasyonu ve genotiplendirilmesi, 8. Ulusal 2. Uluslararası Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 24-27 Ekim 2019, Antalya, 41-42.
- Ziemer CJ, Steadham SR. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003; 37: 463-9.

Tavuklarda Enterocytozoon bieneusi ve Encephalitozoon spp. türlerinin moleküler prevalansı, genotiplendirilmesi ve insan sağlığı açısından risk potansiyelleri

ORJINALLIK RAPORU

% 3	% 3	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.turkiyeparazitoiderg.org İnternet Kaynağı	% 1
2	www.jove.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	cmr.asm.org İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.vetpathology.org İnternet Kaynağı	<% 1
5	Migle Janulaitiene, Virginija Paliulyte, Svitrigaile Grinceviciene, Jolita Zakareviciene et al. "Prevalence and distribution of Gardnerella vaginalis subgroups in women with and without bacterial vaginosis", BMC Infectious Diseases, 2017 Yayın	<% 1
6	ijecm.co.uk İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nuri ERCAN
Uyruğu : Türkiye (T.C.)
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.03.1981-Kayseri
Medeni Durumu : Evli
E-posta : nuriercan@gmail.com, nuri.ercan@ahievran.edu.tr
Yazışma Adresi : Nasuhdede Mah. 399. Sok. Kaan Apt. No:7
 Merkez/KIRŞEHİR

EĞİTİM

<u>Derece</u>	<u>Kurum</u>	<u>Mezuniyet Tarihi</u>
Yüksek Lisans	Erciyes Üni./Fen Bilimleri Ens./Biyoloji ABD	2007
Lisans	Erciyes Üni./Fen Edebiyat Fak./Biyoloji B.	2003
Lise	Şeker Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı), Kayseri	1999

İŞ DURUMU

<u>Yıl</u>	<u>Kurum</u>	<u>Görevi</u>
2015-Halen	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Fahriye Sümer Ercan, **Nuri Ercan** & Dilek Demirezen Yilmaz (2018). Effect of heavy metal stress on antioxidant enzymes and DNA damage in *Nasturtium officinale* R.Br. (watercress). Toxin Reviews. ISSN: 1556-9543 (Print) 1556-9551.

2. Ercan F., Baş H., **Ercan N.**, Vural C., Ozcan S. (2018). Fumigant toxicitiy of essential oils from *Thymus argaeus* Boissier & Balansa and *Thymus sipyleus* Boissier (Lamiaceae) againts *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) International Journal of Scientific and Technological Research. ISSN 2422-8702 (Online) Vol 4, No.3.

3. **Ercan N.**, Karadavut U., Sözen O., Ercan F. (2018) Investigation of genetic diversity by using molecular markers in local chickpea populations collected from Kırsehir province. J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci. 2018, 6(3): 75-79

Uluslararası veya Uluslararası katılımlı bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **Ercan N.**, Düzlü Ö. (2019) Tavuklarda Microsporidian Parazitlerin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu 21. Parazitoloji Kongresi. İzmir. SB24

2. **Ercan N.**, Düzlü Ö., Yıldırım A., İnci A., Önder Z., Çiloğlu A., Şimşek E., Yetişmiş G. (2019) *Encephalitozoon intestinalis* triosephosphate isomerase enziminin homoloji modellemesi metodu ile 3D protein yapısının belirlenmesi ve moleküler bağlanma analizi. 21. Parazitoloji Kongresi. İzmir. P21

3.Yalçın S., Ercan F., Baş H., Yalçınkaya S., **Ercan N.** (2019) *Homo sapiens* ve *Tribolium castaneum* Pten İndüklenmiş Kinaz 1 (PINK1) proteini üzerinde hypericin, hyperforin hyperoside metabolitlerinin moleküler kenetleme çalışması. 2. Erciyes Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi. Kayseri, SB.91-92

4.Yalçın S., Ercan F., Baş H., Yalçınkaya S., **Ercan N.** (2019) *Hypericum perforatum* esansiyel yağına maruz kalan *Tribolium castaneum*'un malondialdehit, superoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin değerlendirilmesi. 2. Erciyes Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi. Kayseri, SB.89-90

5. **Ercan N.**, Azarkan SY., Yıldırım A., Düzlü Ö., Ercan F. (2019) Farklı organik moleküllerin antiparazitik etkilerinin *In Silico* ön değerlendirmesi 1st International Ahi Evran Medicine & Health Science Congress. Kırşehir. OP-401

6. **Ercan N.**, Açıkgöz İE., Özer T., Ercan FS. (2017) Assessment of DNA Extraction Methods for Algae. International DNA Day and Genome Congress (IDDGC) 2017- PP-167. Kırşehir.
7. Ercan FS., Azarkan SY., **Ercan N.**, Koç M. (2017) Determination of Cytochrome P450-Mediated Detoxification Resistance Gene (*Cyp6a14*) In *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) Adults Exposed To *Bolanthus turcicus* (Caryophyllaceae) Extract. International DNA Day and Genome Congress (IDDGC) 2017- OP-174. Kırşehir.
8. Ercan FS., Öztemiz S., **Ercan N.**, Tunçbilek A. (2017) Influence of Cold Storage on Adult and Prepupa Stages of *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae). International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF). Paper Number: ICAFOF-537. Nevşehir.
9. Yılmaz DD., Ercan F.S., **Ercan N.** (2017) Cd-Induced Oxidative Stress in Leaves of *Elodea canadensis*, Ecology Symposium, 11-13 May, Kayseri, Turkey, p 471.
10. Ercan FS., **Ercan N.**, Yılmaz DD. (2017) Effect of Cadmium Stress on Antioxidant Enzymes in Watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.), Ecology Symposium, 11-13 May, Kayseri, Turkey, p 536.
11. **Ercan N.**, Per S., Denli K., Ercan F. (2016). Comparison of DNA extraction methods from two Acari species (Acari: Oribatida) from Turkey. 2nd Symposium on EuroAsian Biodiversity. p.490 Antalya
12. Ercan F., Öztemiz S., **Ercan N.**, Tunçbilek A. (2016) Effect of Non-ionizing Radiation (UV) on prepupal and pupal development stages of egg parasitoid *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae), International Conference on Zoology and Zoonoses, 26-28.10.2016, Hissar, Bulgaria, p 105.
13. Çalışır Z., Ercan F., Sevim E., **Ercan N.**, Sevim A., Çıplak G., Kurt M. (2016) Synthesis of two new metal halogen complexes; $Cd((2A1MB)_2)Cl_2$ and $Hg((2A1MB)_2)Cl_2$: Spectroscopic properties and antimicrobial activity. 2nd International Congress on the World of Technology and Advanced Materials. Kırşehir.

14. Baş H., Ercan F., **Ercan N.** (2016) The Effects of Oleuropein on Sodium Dichromate Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Blood Cells. 2nd International Congress on the World of Technology and Advanced Materials. Kırşehir.
15. Ercan F., Öztemiz S., **Ercan N.**, Tunçbilek A. (2016) *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae)' nin Ergin ve Yumurta Evresinin Soğuk Şartlarda Depolanmasının Parazitlenme ve Ergin Çıkışı Üzerine Etkisi. Turkey 6th Plant Protection Congress. p.60 Konya.

