

Sağlıklı Sığırlarda *Enterocytozoon bienersi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu

Molecular Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Enterocytozoon bienersi* in Healthy Cattle

✉ Tuğba Bilgin, ✉ Sadullah Usluğ, ✉ Gupse Kübra Karademir, ✉ Mübcecel Okur, ✉ Gamze Yetişmiş, ✉ Alparslan Yıldırım

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

Cite this article as: Bilgin T, Usluğ S, Karademir GK, Okur M, Yetişmiş G, Yıldırım A. Sağlıklı Sığırlarda *Enterocytozoon bienersi*'nin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu. Türkiye Parazitol Derg 2020;44(1):36-42.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada sağlıklı sığırlarda *Enterocytozoon bienersi*'nin moleküler prevalansının ve genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada, Ekim 2017 ve Mart 2018 tarihleri arasında Sivas yöresindeki sağlıklı görünümü 150 sığırdan dışkı örnekleri toplanmış ve genomik DNA (gDNA) izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen gDNA izolatları, *E. bienersi*'nin identifikasyonu amacıyla, ITS rRNA gen bölgesini amplifiye eden Nested PZR ile işlenmiştir. *E. bienersi* pozitif izolatların ITS rRNA gen bölgesi ampliconları genotiplendirme ve filogenetik analizler için sekanslanmıştır. Elde edilen sekanslar uygun genetik yazılımlarla işlenerek genotipik yapıları ve sonrasında da filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır.

Bulgular: Nested PZR ile incelemesi yapılan örneklerden 29'u (%19,3) *E. bienersi* yönünden pozitif bulunmuştur. Sekans analizleri sonucu beş ayrı genotip belirlenmiştir. En yaygın genotip olarak bulunan ERUSS1 genotipi ile ERUSS2-4 genotipleri yakın genotipler olarak karakterize edilmiş ve ilk kez rapor edilmiştir. İki izolatın ise Almanya'da bir sığırdan rapor edilmiş olan N genotipinde olduğu belirlenmiş ve diğer genotiplerden daha farklı olduğu görülmüştür. Filogenetik analizler çalışmada karakterize edilen tüm genotiplerin genogrup 2'de yer aldığını ortaya koymuştur.

Sonuç: Bu çalışma ile Türkiye'de sığırlarda *E. bienersi* enfeksiyonları üzerine ilk moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterocytozoon bienersi*, moleküler prevalans, filogenetik karakterizasyon, sağlıklı sığır, Türkiye

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to determine the molecular prevalence and genotypes of *Enterocytozoon* in healthy cattle.

Methods: Fecal samples were collected from 50 cattle in Sivas between October 2017 and March 2018 and genomic DNA (gDNA) isolations were performed. gDNA isolates were processed by Nested PCR specifically amplifying ITS rRNA gene region to identify *E. bienersi*. ITS rRNA region of *E. bienersi* positive isolates were sequenced for genotyping and phylogenetic analyzes. Obtained sequences were assembled with appropriate genetic software, then phylogenetic relationships were revealed.

Results: According to Nested PCR analyses, 29 (19.3%) out of totally examined samples were found positive for *E. bienersi*. As a result of the sequence analyses, five distinct genotypes were determined. The most frequent genotype ERUSS1 and the other ERUSS2-4 genotypes were characterized as close to each other, which was reported for the first time in the world. Two isolates were determined in N genotype that was reported from cattle in Germany and were more different from the other genotypes. Phylogenetic analysis revealed that all the genotypes characterized in the study belonged to the genogroup 2.

Conclusion: First molecular epidemiological data on *E. bienersi* in cattle from Turkey were obtained with this study.

Keywords: *Enterocytozoon bienersi*, molecular prevalence, phylogenetic characterization, healthy cattle, Turkey



Geliş Tarihi/Received: 02.03.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 05.03.2020

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

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

GİRİŞ

Microsporidialar zorunlu hücre içi parazitlerin geniş ve genetik çeşitliliği yüksek bir grubunu oluşturmakta olup hem hayvan hem de insan patojenleri olarak bilinmektedirler (1). Bu parazitik protistalar genetik olarak mantarlarla ilişkilidir ve çevresel dirençli spor formları ile karakterize olup konak dışı ile çevreye yayılarak ökaryotik hücre invazyonu için yeni bir siklusu başlatırlar (2). Günümüze kadar 200 soy içerisinde yaklaşık 1400 microsporidia türü rapor edilmiş olup bunlar arasında 8 soy içerisinde 14 türün insanlarda enfeksiyona yol açtığı bildirilmiştir (3). *Enterocytozoon bieneusi* insanlarda ishale yol açan fırsatçı bir patojen olarak ortaya çıkmış olup immün supresyonla ilişkilendirilmiş ve rapor edilen insan microsporidiosis olgularının yaklaşık %90'ından sorumlu tür olarak karakterize edilmiştir. İnsanların yanı sıra *E. bieneusi* enfeksiyonları primatlar, kedi, sığır, köpek, at, domuz, kuşlar ve çeşitli yabani memelilerden tekrarlı olarak dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmektedir (4). Enfekte insan ve hayvanlarla temas ve/veya kontamine gıda ve sular *E. bieneusi* enfeksiyonlarının bulaşmasında rol oynayan önemli faktörlerdir (1,5). Hem zoonotik hem de potansiyel konak adaptasyonu olan genotipler, birçok insan ve hayvan *E. bieneusi* enfeksiyonlarında sorumlu etkenler olabilirler ve hayvanlar insan enfeksiyonlarına yol açan genotipler için potansiyel rezervuardırlar (4,6).

Hayvan ve insanlardaki *E. bieneusi* izolatlarının genotiplendirilmesinde rRNA geninin internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin sekans analizi genel standart yöntem olarak kullanılmaktadır (5,7). Günümüze kadar çeşitli hayvan türlerinde 240'ın üzerinde genotip identifiye edilmiştir (8,9). ITS gen bölgesi sekanslarının filogenetik analizlerine göre *E. bieneusi* genotiplerinin 9 farklı genogruba bölündüğü ortaya konmuştur (10). Genogrup 1 en geniş grup olup günümüze kadar rapor edilen *E. bieneusi* genotiplerinin %94'ünü ihtiva etmekte ve buradaki genotiplerin insanlarda da enfeksiyon oluşturmalarından dolayı zoonotik grup olarak nitelendirilmektedir (11,12). Buna karşın diğer sekiz major genogruba (grup 2-9) yer alan genotiplerin ise çoğunlukla spesifik konaklarda ve atık sularda bulunduğu kaydedilmiştir (11,13,14). Bugüne kadar sığırlarda çoğunluğu genogrup 2'de olmak üzere 40'ın üzerinde *E. bieneusi* genotipi karakterize edilmiştir (15-17). Bunlar arasında 8'i genogrup 1'de 7'si de genogrup 2'de olmak üzere en az 15 genotip insanlarda da rapor edilmiş olup sığırların insan enfeksiyonları için önemli bir rezervuar olduğunun önemi vurgulanmıştır (5,8,16,18). Genotip 1, J ve BEB4'ün süt emen buzağularda dünya çapında yaygın *E. bieneusi* genotipleri olduğu (15,16,18-25) ve ilgili genotiplerin en az 13 insan olgusunda tespit edildiği kaydedilmiştir (26,27).

Parazitik etkenler içerisinde oldukça önemli olan microsporidia türleri üzerine ülkemizde günümüze kadar yapılan çalışmaların sınırlı olduğu bilinmektedir. Türkiye'de insan ve hayvan konaklarda microsporidia enfeksiyonlarına yol açan türlerin genotipik çeşitliliği üzerine sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır (28-32). Bu araştırmaların daha çok insanlarda yapıldığı buna karşın hayvanlardaki çalışmaların çok daha sınırlı olduğu görülmektedir. Evcil hayvanlar üzerinde yürütülen araştırmalarda; Düzlü ve ark. (31), Kayseri yöresinde moleküler olarak incelenen 282 köpek dışkılarında *Encephalitozoon intestinalis* ve *En. cuculii*'nin yaygınlığını sırasıyla %12,4 ve %2,1 olarak belirlemişler ve izolatların genotipik çeşitliliklerini ortaya çıkarmışlardır. Pekmezci ve ark. (32), Samsun yöresinde inceledikleri 72 ev kedisinde *E. bieneusi* ve *En. intestinalis* moleküler prevalansını sırasıyla %5,5 ve %4,1 olarak rapor etmişlerdir. Ercan (33),

Kayseri, Kırşehir ve Nevşehir yörelerinde 300 tavuktan alınan dışkı örneklerinde *E. bieneusi* ve *Microsporidia* sp. pozitifliğini moleküler olarak sırasıyla %7,3 ile %0,7 olarak belirlemiş ve elde edilen izolatların genotiplendirmesini yapmıştır.

Günümüze kadar Türkiye'de sığırlarda *E. bieneusi*'nin varlığı ve moleküler karakterizasyonu üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, sağlıklı görünümüne farklı yaş, cinsiyet ve ırklardaki sığırlarda *E. bieneusi*'nin moleküler olarak araştırılması ve enfeksiyona yol açan genotiplerin ortaya konarak filogenetik yapılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucu elde edilen çıktılar Türkiye'deki sığırlarda microsporidia enfeksiyonları üzerine ilk moleküler verileri sağlamış olup *E. bieneusi*'nin araştırma yöresinde oluşturduğu zoonotik risk potansiyeli üzerine de bilimsel veriler sağlamıştır.

YÖNTEMLER

Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma, Ekim 2017 ve Mart 2018 tarihleri arasında halk elinde yetiştiriciliği yapılan farklı yaş, cinsiyet ve ırklardan sığırlar üzerinde yürütülmüştür. Çalışma materyalini oluşturan dışkı örnekleri hayvanların dışkılamasını takiben yere temas etmeyen kısımdan alınmış olup hayvanlara temas olmaması sebebiyle Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.01.2016 tarih ve 04 sayılı Yönergesi kapsamında etik kurul onayına gerek duyulmamıştır. Çalışma süresince toplam 150 sığırdan dışkı örnekleri toplanmış ve steril dışkı kaplarına alınarak soğuk zincir altında laboratuvara intikal ettirilmiştir. Her örneğe protokol numarası verilerek hayvanlara ait bilgiler ile birlikte kayıt altına alınmıştır. Dışkı örneklerinden gDNA izolasyonları, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek total gDNA miktarları (ng/μL) belirlenmiş ve kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Ribozomal ITS Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Dışkı örneklerinden elde edilen gDNA izolatları *E. bieneusi* DNA'sının varlığı yönünden ribozomal ITS gen bölgesinin yaklaşık 390 bp kısmını spesifik olarak amplifiye eden primerlerle nested polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizlerine tabi tutulmuştur (34). Elde edilen PZR ürünlerinin her birinden 10 μL alınıp %1,5'lük agaroz jelde elektroforeze tabii tutulduktan sonra sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Sekans ve Genotiplendirme Analizleri

E. bieneusi pozitif izolatların PZR analizleri sonrası ribozomal ITS amplikonları sekans analizleri için jel pürifiye (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) edilmiştir. Sekans analizleri ikinci PZR analizlerinde kullanılan gen spesifik forward ve reverse primer dizileri ile çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir (MacroGen Europe). Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar Geneious 11.0.2 (35) yazılımında De Novo Assemble ile işlenmiş ve kalite skoru yüksek olan final konsensus dizilimler belirlenmiştir. Bu dizilimden PZR primerleri çıkarılarak hedef bölge sekansları (350 bp) elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious 11.0.2 yazılımı (35) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması

kullanılarak GenBank'ta mevcut homolog izolatlarla ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılmış, moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve akabinde GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. İlgili sekanslar içinden 243 bp uzunluğundaki *E. bieneusi* complete ITS sekansları alınarak, BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması ile GenBank'ta kayıtlı tüm *E. bieneusi* genotiplerine ait nükleotid sekansları ile hizalama analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlarla izolatların genotiplendirmeleri yapılmıştır.

Filogenetik Analizler

Genogrup ve genotipler arasındaki genetik farklılıklar Kimura two-parameter uzaklık modeli (36-38) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (38) gerçekleştirilmiştir. *E. bieneusi* genotiplerine ait nesillerin, filogenetik yapılarının belirlenmesinde GenBank veri tabanında kayıtlı çeşitli genogruplara ait izolatların ITS gen bölgesi dizilimleri ile data seti oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun substitution modelinin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (39) kullanılmış ve en düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) değerine sahip model filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizleri Geneious 11.0.2 (35) yazılımı üzerinden PhyML (40) plugin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics 20.0 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen sığırlarda *E. bieneusi* moleküler prevalansı ile yaş ve ırk faktörlerinin ilişkisi Pearson's chi-square, cinsiyet faktörünün ilişkisi de Fisher's exact testi ile araştırılmıştır.

BULGULAR

E. bieneusi'nin Moleküler Prevalansı ve Risk Faktörlerinin Analizi

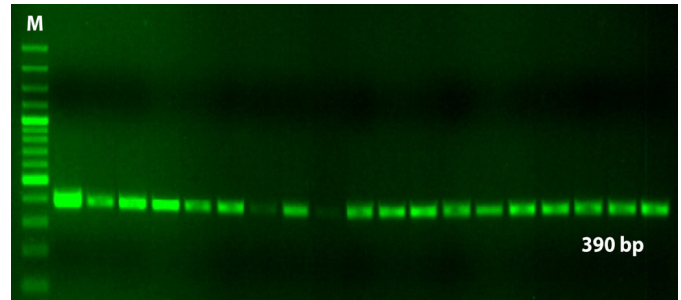
Farklı yaş grupları, cinsiyet ve ırklardan olan 150 sığıra ait dışkı örneklerinden elde edilen gDNA izolatlarının 29'u (%19,3) ITS bölgesini amplifiye eden tür spesifik primerlerle PZR analizleri

sonucu *E. bieneusi* DNA'sı yönünden pozitif belirlenmiştir. Nested PZR analizleri ile pozitif belirlenen bazı izolatların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 1'de verilmiştir.

E. bieneusi pozitifliği belirlenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırk gruplarına göre dağılımları ve istatistiksel analizleri Tablo 1'de verilmiştir. Yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %18,0 ile >3 yaş grubunda belirlenmiş bunu %0,7 oranlar ile ≤1 yaş ve 1-3 yaş grupları izlemiştir. Yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan >3 yaş grubu ile ≤1 yaş ve 1-3 yaş grupları arasındaki farklılık önemli ($p < 0,05$) bulunurken ≤1 yaş ve 1-3 yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz ($p > 0,05$) bulunmuştur. Sığırların cinsiyetine göre erkeklerde %2,7 dişilerde ise %16,7 oranında *E. bieneusi* pozitifliği tespit edilmiştir. Irka göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %6,0 ile Holstein ve Montofon ırklarında belirlenmiş, bunu %4,7 ile Simental ve %2,7 ile Melez ırkları izlemiştir. Yerli ırklarda *E. bieneusi* enfeksiyonu saptanmamıştır. Cinsiyet ve ırka göre *E. bieneusi* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Ribozomal ITS Gen Bölgesi Sekans ve Genotiplendirme Analizi Sonuçları

Nested PZR analizleri ile pozitif belirlenen 29 izolatın tamamı sekans analizlerine tabii tutulmuş ve tüm izolatlar için kalite soru yüksek ($q > 20$) final sekanslar elde edilmiştir. Çalışmada belirlenen *E. bieneusi* izolatlarının genotiplendirmede referans olan 243 bp uzunluğundaki ITS sekansları arasında 221 (%90,8) identik



Şekil 1. *E. bieneusi* izolatlarının parsiyel ITS rDNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PZR sonucu elde edilen ampiklonların jel elektroforezde görünümü M: 100 bp Marker

Tablo 1. *E. bieneusi* pozitifliği belirlenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırk gruplarına göre dağılımları ve istatistiksel analizleri

Faktör	İncelenen hayvan sayısı Sayı	Pozitif hayvan		χ^2	p	
		%				
Yaş	≤1 yaş	21	1	4,8 ^a	8,332	0,016
	1-3 yaş	22	1	4,5 ^a		
	>3 yaş	107	27	25,2 ^b		
Cinsiyet	Erkek	24	4	16,7	0,130	1,000
	Dişi	126	25	19,8		
İrk	Holstein	32	9	28,1	4,860	0,302
	Simental	38	7	18,4		
	Montofon	42	9	21,4		
	Melez	26	4	15,4		
	Yerli	12	0	0,0		

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

bölge belirlenirken 5 farklı genotipi ortaya koyan 22 polimorfik bölge saptanmıştır. *E. bieneusi* pozitif 29 izolatin genotiplere göre dağılımları GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 2'de verilmiştir. Belirlenen genotipler arasında intraspesifik nükleotid farklılığı ortalama $2,8 \pm 0,6$ olarak saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen ve en yaygın bulunan ERUSS1 genotipi ile birer sığırdan belirlenen ERUSS2, ERUSS3 ve ERUSS4 genotiplerine ait izolatların nükleotid sekansları arasında $0,3\%-0,6\%$ farklılık belirlenmiştir. ERUSS2 ile ERUSS3 ve ERUSS4 genotiplerine ait izolatların nükleotid sekansları arasında $0,6\%-0,9\%$, ERUSS3 ile ERUSS4 genotiplerine ait izolatların nükleotid sekansları arasında ise $0,9\%$ farklılık saptanmıştır. Yukarıdaki genotiplerden genetik olarak daha uzak belirlenen ve iki sığırdan izole edilen N genotipine ait izolatlar ERUSS1, ERUSS2 ve ERUSS3 genotiplerine $5,9\%$, ERUSS4 genotipine ise $6,2\%$ farklılık göstermiştir.

Filogenetik Analiz Sonuçları

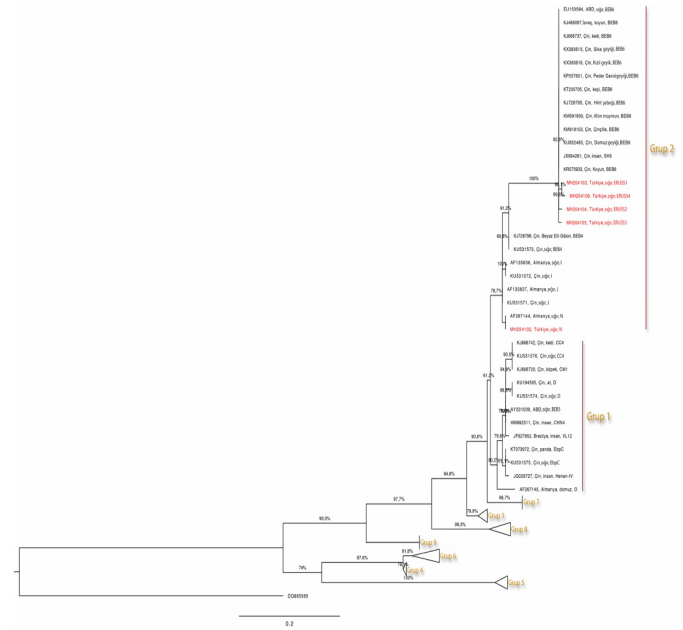
Moleküler olarak karakterize edilen *E. bieneusi* genotiplerinin Dünyada çeşitli bölgelerdeki farklı konaklardan bildirilen çeşitli genotiplere ait izolatlarla ilişkileri filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 2) gösterilmiştir. ML filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük genogrular bazında yüksek bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen genotiplere ait izolatların tamamının *E. bieneusi* genogrup 2'de yer aldığı belirlenmiştir. Birbirine yakın olarak belirlenen ve ilk kez bu çalışma ile karakterize edilen ERUSS1-4 genotiplerine ait izolatların Çin, İsveç ve ABD'de sığır, koyun, çeşitli geyik türleri, kedi, çinçilla ve çeşitli maymun türlerinden rapor edilen, konak spektrumunu geniş olan BEB6 genotipi ($99,2\%-99,6\%$) ve Çin'de bir insandan izole edilen SH5 genotipi ($99,2\%-99,6\%$) ile genetik olarak yakın oldukları ve birlikte kümelendikleri tespit edilmiştir (Şekil 2). Çalışmada iki sığırdan izole edilen ve araştırma sahasında belirlenen diğer genotiplerden daha uzak belirlenen N genotipine ait izolatların Almanya'da bir sığırdan izole edilen aynı genotipe ait izolatla $100,0\%$ identik olduğu ve ayrı bir küme oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 2). N genotipine ait bu izolatların en yüksek genetik yakınlığı $99,6\%$ ile Çin ve Almanya'da sığırlardan izole edilen J genotipine ait izolatlarla gösterdikleri, yine ilgili izolatların aynı ülkelerden rapor edilen 1 genotipine de $99,2\%$ benzer oldukları belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez sığırlarda microsporidia türlerinden *E. bieneusi*'nin varlığı ve yaygınlığı moleküler olarak ortaya konmuştur. Araştırma yöresinde incelenen sığırlarda *E. bieneusi* moleküler prevalansı $19,3\%$ olarak saptanmış olup elde edilen sonuçlar sekans analizleriyle de konfirme

edilmiştir. Saptanan bu moleküler prevalans oranının Çin'in farklı bölgelerinde sütçü sığır ve buzağılarda bildirilen (8,19-22) prevalans oranları ($17,7\%-29,3\%$) ile yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca ABD, Brezilya, Arjantin ve Çek Cumhuriyeti'nde yine sütçü sığırlardan $3,1\%$ ile $35,4\%$ arasında değişen *E. bieneusi* yaygınlığı rapor edilmiştir (16,23-25,41,42). Çeşitli ülkelerden bildirilen *E. bieneusi* prevalansındaki farklılıklarda, Qi ve ark.'nın (21) da belirttiği gibi farklı teşhis yöntemlerinin uygulanması, çalışma dizaynı, örneklenen hayvanların coğrafik bölgeleri ve yaşları, çiftlik yönetimi ve mevsimsel varyasyonlar gibi çeşitli faktörlerin önemli olduğu düşünülmüştür.

Çeşitli araştırmalarda (21,24) sığırlarda *E. bieneusi* prevalansında yaşla ilişkili bir azalış olduğu ve bunun da muhtemelen yaşın artması ile gelişen immünite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Jurankova ve ark. (24) Çek Cumhuriyeti'nde *E. bieneusi* prevalansını en yüksek $26,7\%$ ile <3 ay yaş grubu sığırlarda belirlemişler, bunu $18,3\%$, $6,7\%$, ve $10,0\%$ ile 6-8 ay, 14-16 ay ve 28-30 ay yaş gruplarının izlediğini rapor etmişlerdir. Benzer olarak Çin'de yapılan araştırmalarda (19,20) süt emen ve süttan



Şekil 2. *E. bieneusi* izolatlarının ITS rRNA gen bölgesi maximum likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. 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.

Tablo 2. *E. bieneusi* izolatlarının genotiplere göre dağılımı ve GenBank aksesyon numaraları

Microsporidia	Sekanslanan izolat sayısı	Genotip		
		Adı	Ait olan izolat sayısı	GenBank aksesyon
<i>E. bieneusi</i>	29	N	2	MH204102
		ERUSS1	24	MH204103
		ERUSS2	1	MH204104
		ERUSS3	1	MH204105
		ERUSS4	1	MH204106

kesilmiş buzağlarda düve ve ergin sütçü sığırlara oranla daha yüksek *E. bieneusi* prevalansı bildirilmiştir. Buna karşın ABD ve Brezilya'da sütçü sığırlar üzerinde yürütülen çalışmalarda (25,41) süttten kesilmiş buzağlarda süt emen buzağlara oranla daha yüksek enfeksiyon oranları rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise yaş gruplarına göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %18,0 ile >3 yaş grubu sığırlarda belirlenirken, ≤1 yaş ve 1-3 yaş gruplarındaki prevalans oranları %0,7 olarak tespit edilmiş ve bu farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur. Bu farklılığın yaş grupları arasında incelenen hayvan sayısı dağılımları ile ilişkili olduğu düşünülmüş olsa da elde edilen sonuçlar özellikle ergin sığırların *E. bieneusi* enfeksiyonlarının bulaşması için potansiyel rezervuar olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda dişi ve erkek sığırlar arasında *E. bieneusi* enfeksiyonlarının dağılımında bir farklılık belirlenmemiştir. Cinsiyetin *E. bieneusi* enfeksiyonu üzerine etkisinin bulunmadığı ayrıca sığırlar (43) ve atlar (44) üzerinde yapılan araştırmalarda da kaydedilmiştir. Buna karşın köpek, kedi ve yabani memeliler üzerinde yürütülen bazı araştırmalarda (45-47) ise erkeklerde dişilere oranla daha yüksek enfeksiyon oranları rapor edilmiştir. Sığır ırkları arasında enfeksiyon oranlarının sütçü sığır ırklarında besi sığırlarına oranla daha yüksek olduğu bazı çalışmalarla (20,43) rapor edilirken, Santin ve ark. (48), 6-18 aylık besi sığırlarında enfeksiyon oranlarını daha yüksek belirlemişlerdir. Çalışmamızda ırka göre *E. bieneusi* pozitifliği en yüksek %6,0 ile Holstein ve Montofon ırkında saptanmış olup bunu %4,7 ile Simental ve %2,7 ile Melez ırkları izlemiştir. Yerli ırklarda ise *E. bieneusi* enfeksiyonu saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analizde sığır ırkları arasında enfeksiyonun prevalansı açısından bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda sağlıklı sığırlarda moleküler olarak tanımlanmış 29 *E. bieneusi* izolatının ITS rRNA sekans analizleri ile 5 ayrı genotipe ait oldukları ve tüm genotiplerin genogrup 2'de yer aldığı belirlenmiştir. Bunlar arasında ERUSS1 en yaygın genotip olarak belirlenmiş olup daha sınırlı olduğu görülen diğer genotipler ERUSS2-4 ile genetik olarak çok yakın olduğu dikkati çekmiştir. İlgili genotipler dünyada ilk kez karakterize edilmiş olup, Çin (49,50-53), İsveç (54) ve ABD'de (55) sığır, koyun, çeşitli geyik türleri, kedi, çinçilla ve çeşitli maymun türlerinden rapor edilen ve konak spektrumunu geniş olan BEB6 genotipi (%99,2-%99,6) ve Çin'de bir insandan izole (56) edilen SH5 genotipi (%99,2-%99,6) ile genetik olarak çok yakın oldukları görülmüştür. Bu sonuç ilgili genotiplerin sığırlar dışında diğer hayvan türlerinde de bulunabileceğini ve zoonotik risk potansiyeline sahip olabileceklerini düşündürmüş olmakla birlikte araştırma yöresinde diğer hayvan türleri ve insanlar üzerinde yapılacak kapsamlı araştırmalarla ilgili genotiplerin moleküler epidemiyolojisi ve zoonotik risk potansiyellerinin aydınlatılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Araştırmamızda iki sığırdan bulunan izolatların N genotipine ait olduğu ve yörede saptanan diğer genotiplerden daha farklı olduğu görülmüştür. İlgili genotipin günümüze kadar yalnızca Almanya'da bir sığırdan bildirildiği (GenBank aksesyon: AF267144) görülmektedir. Elde edilen bu sonuç yalnızca sığırlardan rapor edilen ilgili genotipin konak spesifik karakterli olabileceğini desteklemektedir.

SONUÇ

Bu çalışma ile sığırlarda önemli zoonotik microsporidialardan biri olan *E. bieneusi*'nin varlığı ve yaygınlığı ortaya konmuştur.

Elde edilen sonuçlar Türkiye'de sığırlarda ilgili parazit üzerine ilk moleküler verileri sağlamıştır. Ayrıca çalışmada saptanan ERUSS1-4 genotipleri dünyada ilk kez bildirilmiş ve moleküler klasifikasyona kazandırılmıştır. Tespit edilen genotiplerin, zoonotik karakterli diğer bazı genotiplerle birlikte aynı grupta yer alması ve genetik olarak yakın olmaları bu genotiplere ait *E. bieneusi* nesillerinin insanlara bulaşma açısından risk potansiyeli taşıdığını da ortaya çıkarmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7384 nolu proje ile desteklenmiştir.

* Etik

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

Hasta Onamı: Sığır dışkı örneklerinde çalışılması nedeniyle hasta onayı alınmamıştır.

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

* Yazarlık Katkıları

Konsept: T.B., A.Y., Dizayn: T.B., A.Y., Veri Toplama veya İşleme: T.B., S.U., G.K.K., M.O., G.Y., Analiz veya Yorumlama: T.B., A.Y., S.U., Literatür Arama: T.B., S.U., G.K.K., M.O., G.Y., Yazan: T.B., A.Y., M.O., S.U.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7384 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev. 2005;18:423-445.
- Vávra J, Lukeš J. Microsporidia and 'the art of living together'. Adv Parasitol. 2013;82:253-319.
- Keeling P. Five questions about microsporidia. PLoS Pathogens. 2009;5:e1000489.
- Santin M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. Res Vet Sci. 2011;90:363-371.
- Matos O, Lobo ML, Xiao L. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. J Parasitol Res. 2012;2012:981424.
- Thellier M, Breton J. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. Parasite. 2008;15:349-358.
- Santin M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. J Eukar Microbiol. 2009;56:34-8.
- Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, et al. 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.
- Zhao W, Yu S, Yang Z, Zhang Y, Zhang L, Wang R, et al. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. Infec Gen Evol. 2016;40:151-154.
- Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, et al. Predominance and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive nonhuman primates

- in zoos in China: high genetic diversity and zoonotic significance. *PloS One*. 2015;10:e0117991.
11. Deng L, Li W, Zhong Z, Gong C, Liu X, Huang X, et al. Molecular characterization and multilocus genotypes of *Enterocytozoon bienersi* among horses in southwestern China. *Parasit Vectors*. 2016;9:561.
 12. Li W, Deng L, Yu X, Zhong Z, Wang Q, Liu X, et al. Multilocus genotypes and broad host-range of *Enterocytozoon bienersi* in captive wildlife at zoological gardens in China. *Parasit Vectors*. 2016;9:395.
 13. Karim MR, Wang R, Dong H, Zhang L, Li J, Zhang S, et al. Genetic polymorphism and zoonotic potential of *Enterocytozoon bienersi* from nonhuman primates in China. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:1893-8.
 14. Li N, Xiao L, Wang L, Zhao S, Zhao X, Duan L, et al. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bienersi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Neg Trop Dis*. 2012;6:e1809.
 15. Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, et al. Zoonotic and potentially host-adapted *Enterocytozoon bienersi* genotypes in sheep and cattle in Northeast China and an increasing concern about the zoonotic importance of previously considered ruminant-adapted genotypes. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81: 3326-3335.
 16. Del Cocco VF, Cordoba MA, Bilbao G, de Almeida Castro P, Basualdo JA, Santín M. First report of *Enterocytozoon bienersi* from dairy cattle in Argentina. *Vet Parasitol*. 2014;199:112-5.
 17. Zhao W, Zhang W, Yang F, Zhang L, Wang R, Cao J, et al. *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle in the northeast of China: genetic diversity of ITS gene and evaluation of zoonotic transmission potential. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62:553-560.
 18. Tang C, Cai M, Wang L, Guo Y, Li N, Feng Y, et al. Genetic diversity within dominant *Enterocytozoon bienersi* genotypes in pre-weaned calves. *Parasit Vectors*. 2018;11:170.
 19. Li J, Luo N, Wang C, Qi M, Cao J, Cui Z, et al. Occurrence, molecular characterization and predominant genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle in Henan and Ningxia, China. *Parasit Vectors*. 2016;9:142.
 20. Ma J, Li P, Zhao X, Xu H, Wu W, Wang Y, et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. *Vet Parasitol*. 2015;207:220-7.
 21. Qi M, Jing B, Jian F, Wang R, Zhang S, Wang H, et al. Dominance of *Enterocytozoon bienersi* genotype J in dairy calves in Xinjiang, Northwest China. *Parasitol Int*. 2017;66:960-3.
 22. Wang XT, Wang RJ, Ren GJ, Yu ZQ, Zhang LX, Zhang SY, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in dairy and native beef (Qinchuan) calves in Shaanxi province, northwestern China. *Parasitol Res*. 2016;115:1355-1361.
 23. Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res*. 2012;111:1349-1355.
 24. Juránková J, Kamler M, Kovarcík K, Koudela B. *Enterocytozoon bienersi* in Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) infected and noninfected cattle herds. *Res Vet Sci*. 2013;94:100-4.
 25. Santin M, Fayer R. A longitudinal study of *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle. *Parasitol Res*. 2009;105:141-4.
 26. Sak B, Brady D, Pelikanova M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, et al. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1064-1070.
 27. Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, Peng S, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in China. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2006-8.
 28. Çetinkaya Ü, Yazar S, Kuk S, Sivcan E, Kaynar L, Arslan D, et al. The high prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in patients receiving chemotherapy and children with growth retardation and the validity of real-time PZR in its diagnosis. *Turk J Medical Sci*. 2016;46:1050-8.
 29. Oğuz İ, Doğruman AF, Mumcuoğlu İ. İshalli olgularda microsporidia sıklığının Calcofluor Beyazı ve Uvitex 2B kemolüminesans boyama yöntemleriyle araştırılması ve tiplendirilmesi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2013 28 Eylül-4 Ekim; Denizli. Türkiye; 2013.
 30. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Akısü Ç. Evaluation of pulmonary microsporidiosis in iatrogenically immunosuppressed patients. *Tuberk Toraks*. 2016;64:9-16.
 31. Duzlu O, Yildirim A, Onder Z, Çilöglu A, Yetismis G, İnci A. Prevalence and Genotyping of Microsporidian Parasites in Dogs in Turkey: Zoonotic Concerns. *J Eukaryot Microbiol*. 2019;66:771-777.
 32. Pekmezci D, Pekmezci GZ, Yildirim A, Duzlu O, İnci A. Molecular Detection of Zoonotic Microsporidia in Domestic Cats in Turkey: A Preliminary Study. *Acta Parasitol*. 2019;64:13-18.
 33. Ercan N. Tavuklarda *Enterocytozoon Bienersi* ve *Encephalitozoon* spp. türlerinin moleküler prevalansı, genotiplendirilmesi ve insan sağlığı açısından risk potansiyelleri. Doktora Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Kayseri. 2019.
 34. Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:2595-2599.
 35. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28:1647-9.
 36. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-120.
 37. Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Ann Rev Gen*. 1996;30:371-403.
 38. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870-4.
 39. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253-6.
 40. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52:696-704.
 41. da Silva Fiuza VR, Lopes CW, de Oliveira FC, Fayer R, Santin M. New findings of *Enterocytozoon bienersi* in beef and dairy cattle in Brazil. *Vet Parasitol*. 2016;216:46-51.
 42. Fayer R, Santin M, Trout JM. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. *Parasitol Res*. 2003;90:383-386.
 43. Fiuza VR, Lopes CW, Cosendey RI, de Oliveira FC, Fayer R, Santin M. Zoonotic *Enterocytozoon bienersi* genotypes found in Brazilian sheep. *Res Vet Sci*. 2016;107:196-201.
 44. Santin M, Vecino JA, Fayer R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bienersi* in horses. *J Parasitol*. 2010;96:157-161.
 45. Sak B, Salat J, Horka H, Saková K, Ditrich O. Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol*. 2006;28:95-9.
 46. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:4495-4501.
 47. Santin M, Cortes Vecino JA, Fayer R. *Enterocytozoon bienersi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:215-217.
 48. Santin M, Dargatz D, Fayer R. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in weaned beef calves on cow-calf operations in the USA. *Parasitol Res*. 2012;110:2033-2041.
 49. Karim MR, Dong H, Yu F, Jian F, Zhang L, Wang R, et al. Genetic diversity in *Enterocytozoon bienersi* isolates from dogs and cats in China: host specificity and public health implications. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3297-3302.
 50. Du SZ, Zhao GH, Shao JF, Fang YQ, Tian GR, Zhang LX, et al. *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, and *Enterocytozoon bienersi* in captive non-human primates in Qinling Mountains. *Korean J Parasitol*. 2015;53:395-402.

51. Peng XQ, Tian GR, Ren GJ, Yu ZQ, Lok JB, Zhang LX, et al. Infection rate of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in cashmere, dairy and meat goats in China. *Infect Gen Evol.* 2016;41:26-31.
52. Ye J, Xiao L, Wang Y, Guo Y, Roellig DM, Feng Y. Dominance of *Giardia duodenalis* assemblage A and *Enterocytozoon bienersi* genotype BEB6 in sheep in Inner Mongolia, China. *Vet Parasitol.* 2015;210:235-239.
53. Zhang XX, Jiang J, Cai YN, Wang CF, Xu P, Yang GL, et al. Molecular characterization of *Enterocytozoon bienersi* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Northeastern China. *Korean J Parasitol.* 2016;54:81-85.
54. Stensvold CR, Beser J, Ljungstrom B, Troell K, Lebbad M. Low host-specific *Enterocytozoon bienersi* genotype BEB6 is common in Swedish lambs. *Vet Parasitol.* 2014;205:371-374.
55. Fayer R, Santin M, Trout JM. *Enterocytozoon bienersi* in mature dairy cattle on farms in the eastern United States. *Parasitol Res.* 2007;102:15-20.
56. Wang L, Xiao L, Duan L, Ye J, Guo Y, Guo M. et al. Concurrent infections of *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi*, and *Clostridium difficile* in children during a cryptosporidiosis outbreak in a pediatric hospital in China. *PLoS Neg Trop Dis.* 2013;7:e2437.