TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE BROİLER YETİŞTİRİCİLİĞİNDE COCCİDİOSİSE NEDEN OLAN EİMERİA TÜRLERİNİN SAPTANMASI

Esin GÜVEN

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zafer KARAER

2010 ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE BROİLER YETİŞTİRİCİLİĞİNDE COCCİDİOSİSE NEDEN OLAN EİMERİA TÜRLERİNİN SAPTANMASI

Esin GÜVEN

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zafer KARAER

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2005K120140-9-6 proje numarası ile desteklenmiştir.

2010 ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Protozooloji ve Entomoloji Doktora **Programı**

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29.01.2010

İmza
Prof.Dr. Ayşe BURGU
Jüri Başkanı

İmza
Prof.Dr. Zafer KARAER
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof.Dr. Ayşe ÇAKMAK
Ankara Üniversitesi

İmza
Prof.Dr. Günay ALÇIĞIR
Ankara Üniversitesi

İmza
Prof.Dr. Hasan EREN
Adnan Menderes Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay		ii
İçindekiler		iii
Önsöz		vii
Simgeler ve Kısaltmalar		viii
Şekiller		x
Çizelgeler		xii
1.	**GİRİŞ**	**1**
1.1.	Coccidiosisin Tanımı ve Etkenlerinin Sınıflandırmadaki Yeri	1
1.2.	*Eimeria* Soyundaki Etkenlerin Hayat Döngüsü	2
1.2.1.	Merogoni (Şizogoni, Eşeysiz Çoğalma)	5
1.2.2.	Gametogoni (Eşeyli Çoğalma)	7
1.2.3.	Sporogoni (Eşeysiz Çoğalma)	7
1.3.	*Eimeria* Oocystlerinin Morfolojik Özellikleri	9
1.4.	Tavuk Coccidiosisinde Patogenez	10
1.4.1.	*Eimeria* Türlerinin Patojenitesini Etkileyen Faktörler	12
1.4.1.1.	Yerleşim Alanı	12
1.4.1.2.	Oocyst Dozu	13
1.4.1.3.	Oocyst Kültürünün Canlılığı ve Patojenitesi	13
1.4.1.4.	Konak Yaşı	14
1.4.1.5.	Konak Irkı	15
1.4.1.6.	Karışık Enfeksiyonlar	16
1.5.	Tavuk Coccidiosisine Neden Olan *Eimeria* Türlerinin Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri	16
1.5.1.	*Eimeria acervulina*	16
1.5.2.	*Eimeria brunetti*	19
1.5.3.	*Eimeria hagani*	21

1.5.4.	*Eimeria maxima*	22
1.5.5.	*Eimeria mitis*	25
1.5.6.	*Eimeria mivati*	26
1.5.7.	*Eimeria necatrix*	27
1.5.8.	*Eimeria praecox*	31
1.5.9.	*Eimeria tenella*	31
1.6.	Korunma ve Kontrol	37
1.6.1.	Sürü İdaresi	37
1.6.2.	Anticoccidial Uygulaması	38
1.6.3.	Aşılama	40
1.6.3.1.	Rekombinant Aşılar	40
1.6.3.2.	Canlı Aşılar	41
1.6.3.3.	Sitokinlerin adjuvant olarak kullanılması	42
1.6.3.4.	Alternatif Kontrol Metodları	43
1.7.	Coccidiosisde Tanı	44
1.7.1.	Tavuk Coccidiosisinde Moleküler Tanı Teknikleri ile Yapılan Çalışmalar	45
1.7.1.1.	Multilokus Enzim Elektroforezi (MEE)	46
1.7.1.2.	Southern Blot Tekniği	47
1.7.1.3.	Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PGFE) ve İlişkili Metotlar	48
1.7.1.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ile Bağlantılı Metodlar	49
1.7.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)	55
1.7.2.1.	PCR'ın Temel Mekanizması	56
1.7.2.2.	PCR'ın Temel Bileşenleri	58
1.7.2.3.	Agaroz Jel Elektroforezi	60
1.7.2.4.	Nested PCR	60
1.7.3.	Gen Klonlama	61
2.	**GEREÇ ve YÖNTEM**	**65**

2.1.	Gereç	65
2.1.1.	Dışkı Örnekleri	65
2.1.2.	Oocystlerin Toplanması, Sporlandırılması ve Dışkıdan Arındırılmasında Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	67
2.1.3.	Genetik Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	68
2.1.3.1.	DNA İzolasyonunda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	68
2.1.3.2.	DNA Ölçümünde Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	69
2.1.3.3.	PCR'da Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	69
2.1.3.4.	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	70
2.1.3.5.	Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	71
2.1.3.6.	Klonlamada Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	72
2.2.	Yöntem	74
2.2.1.	Sahadan Dışkı ve Altlık Örneklerinin Toplanması	74
2.2.2.	Dışkı Örneklerinin Modifiye McMaster Yöntemi ile İncelenmesi	74
2.2.3.	Türkiye Oocyst İnokulumunun Hazırlanması	75
2.2.4.	Oocystlerin Dışkıdan Toplanması ve Arındırılması	76
2.2.5.	DNA İzolasyonu	77
2.2.6.	DNA Miktarının Belirlenmesi	78
2.2.7.	PCR Yöntemi	79
2.2.7.1.	Klasik PCR	79
2.2.7.2.	Nested PCR	80
2.2.8.	Agaroz Jel Elektroforezi ve Spesifik Bantların Görüntülenmesi	82
2.2.9.	PCR Ürünün Jelden Ekstraksiyonu	82

2.2.10.	Gen Klonlama	83
2.2.11.	DNA Miktarının Belirlenmesi	84
2.2.12.	Restriksiyon Enzimi ile Plazmidin Kesilmesi	84
2.2.13.	Agaroz Jel Elektroforez ve Spesifik Bantların Görüntülenmesi	85
2.2.14.	Sekans Analizine Gönderilecek Örneklerin Hazırlanması	85
2.2.15.	Sekans Analizi	85
2.2.16.	Nükleotid Dizi Eşleme ve Filogenetik Analiz	85
3.	**BULGULAR**	**86**
3.1.	*Eimeria spp* Oocystlerinin Varlığı	86
3.2.	Pozitif Örneklerin Bir Gramında Bulunan Oocyst Sayıları	86
3.3.	Morfolojik Tür Tayini	102
3.4.	PCR	102
3.4.1.	Klasik PCR	102
3.4.2.	Nested PCR	103
3.5.	Klonlama	104
3.6.	Klonlama Sonrası Elde Edilen DNA Miktarları	106
3.7.	Filogenetik Analiz	106
4.	**TARTIŞMA**	**111**
4.1.	Türkiye İnokulumunda Bulunan *Eimeria* Türleri	111
4.2.	*Eimeria* Etkenlerinin Tür Tayininde PCR'ın Kullanımı	115
5.	**SONUÇ ve ÖNERİLER**	**123**
ÖZET		**125**
SUMMARY		**126**
KAYNAKLAR		**127**
ÖZGEÇMİŞ		**135**

ÖNSÖZ

Tavuk yetiştiriciliği, hayvancılık alanında en hızlı gelişen sektördür. Günümüzde gerek ekonomik koşullar, gerekse sağlıklı beslenme amaçlı, kanatlı hayvan eti kırmızı ete oranla daha çok tercih edilmekte ve hayvansal protein ihtiyacını karşılamada önemli bir rol üstlenmektedir. Türkiye'de tavukçuluk sektörü, 1990 yılında 217 bin ton üretim seviyesinde iken, 2000 yılında 752 bin ton, 2007 yılında 1.100.000 ton üretim düzeyine ulaşmıştır. 2007 yılı kanatlı eti üretiminin 1.012 bin tonu piliç eti, 33 bin ton hindi eti, 55 bin ton ise çıkma tavuk ve diğer kanatlı etleridir. Ayrıca, yılda ortalama 10 milyar adet yumurta üretilmektedir (Anon, 2009a). Ülkemizde tavukçuluk sektörü özellikle Marmara, Ege, İç Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde yoğunlaşmış durumdadır. Bunun nedenleri; bu bölgelerin büyük yerleşim merkezlerine yakınlığı nedeniyle tüketimin fazla oluşu, enerji temininin daha kolay olması, iklim, coğrafi yapı uygunluğu ve ulaşım imkanlarının daha kolay olmasıdır.

Tavuk coccidiosisi, dünya genelinde yaygın görülen bir hastalıktır. Hastalığın eradikasyonu söz konusu olmadığından, tavuk işletmelerinin temel hedefi anticoccidial etkili kimyasal ajanlar kullanarak, klinik hastalık oluşumunu engellemektir. Bu nedenle, anticoccidial ajanlar yoğun bir şekilde kullanılmakta, buna bağlı olarak da hastalık subklinik vakalar şeklinde seyretmektedir. Ancak, anticoccidial ilaç kullanılmasının da etkenlere direnç gelişmesi ve kalıntı problemi gibi olumsuz yönleri vardır. Bu kısıtlamalar nedeniyle çalışmalar aşı geliştirilmesine odaklanmıştır. Özellikle aşı çalışmalarında ve epidemiyolojik çalışmalarda olmak üzere *Eimeria* türlerinin spesifik olarak belirlenmesi çok önemlidir. Günümüzde geleneksel tanı kriterlerinin yaygın kullanımı söz konusu olmakla birlikte, daha duyarlı olan PCR temelli tanı yöntemlerinin kullanılması ile daha kesin sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarımdaki özverili katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Zafer Karaer`e, doktora eğitimim boyunca desteğiyle her zaman yanımda olan Prof. Dr. Ayşe Çakmak'a; tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Günay Alçığır'a; Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Serpil Nalbantoğlu'na; Amerika Birleşik Devletleri'nde yapmış olduğum çalışmalar sırasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Larry McDougald, Asist. Prof. Robert B. Beckstead ve Poultry Science Bölümü'ndeki çalışma arkadaşlarıma; tezimin moleküler çalışmalarında bilimsel destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Zati Vatansever'e; Etlik Araştırma Enstitüsü Parazitoloji Laboratuvarı'ndaki çalışmalarımda yardımcı olan Dr. Ahmet Deniz'e, saha çalışmaları ve istatistiki hesaplamalardaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Sefa Gürcan ve Dr. Aytaç Akçay'a; çalışmanın moleküler aşamasındaki desteğinden dolayı Araş. Gör. Özgecan Korkmaz Ağaoğlu'na; pozitif DNA örneklerini gönderen İsveç National Veterinary Instıtute'den Per Thebo'ya, sekans verilerini değerlendirmemde yardımcı olan Araş. Gör. Özkan Timurkan'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Asiye Koçak, Kemal Ekdal, Yasemin Çiçek, Ömer Orkun, Levent Yılmaz, Tahir Demir'e; her zaman yanımda olan değerli dostlarım Birten Emre, Sırrı Kar, Aycan Nuriye Gazyağcı ve Duygu Yılmazlar`a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca desteklerinden dolayı başta Mustafa Temelli olmak üzere Kanar ve Temelli ailelerine; hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimim sürecinde de, maddi ve manevi olarak yanımda olan ve bana güç katan annem Nuran Güven'e, kardeşlerim Ali Erdem Güven ve Betül Güven'e teşekkür ederim. Karekteristik tüm özelliklerini gururla taşıdığım babama, bizim için verdiği mücadele ve emek için sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AE	Elution Buffer (Yıkama Solüsyonu)
AL	Lysis Buffer (Lizis Solüsyonu)
ASL	Stool Lysis Buffer (Dışkı Lizis Solüsyonu)
AW	Wash Buffer (Yıkama Solüsyonu)
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
CLB	Cell Lysis Buffer (Hücre Lizis Solüsyonu)
°C	Degree Celsius
cDNA	Komplementer DNA
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
EB	Elution Buffer
EcoRI	*E. coli* suşlarından izole edilen Restriksiyon Enzimi
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Asit
FIGE	Field Inversion Gel Electrophoresis (Field inversion Jel Elektroforezi
g	Gravite
GPI	Glukoz Fosfat İzomeraz
gr	Gram
HCl	Hidroklorik asit
ITPG	Isopropyl thiogalactoside
KCl	Potasyum klorür
LB	Luria Bertani (agar)
LB	Lithium borate (buffer)
LP	Lamina propria
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis (Multilokus Enzim Elektroforezi)
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis (Değişken Alanlı Jel Elektroforezi)
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik asit

rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA tampon çözeltisi
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviole
V	Volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	*Eimeria* spp'nin hayat döngüsü	3
Şekil 1.2.	Sporlanmış *Eimeria* oocysti	8
Şekil 1.3.	PCR'ın basamakları	57
Şekil 1.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	58
Şekil 1.5.	Gen klonlamanın temel prensipleri	62
Şekil 1.6.	Klonlamada kullanılan vektör	63
Şekil 2.1.	İllerdeki toplam ve örnek alınan broiler kümeslerin oranları	66
Şekil 3.1.	Klasik PCR'la elde edilen *E. tenella*, *E. praecox, E. maxima ve E. acervulina*	103
Şekil 3.2.	Nested PCR'la elde edilen *E. mitis* ve *E. brunetti*	103
Şekil 3.3.	Carbenicillin selektif mediumda üreyen bakterilerin oluşturdukları beyaz (A) ve mavi (B) koloniler	104
Şekil 3.4.	Bakterilerin üremesine bağlı LB buffer renginde bulanıklaşma	105
Şekil 3.5.	Bakterilerin dipte toplanması	105
Şekil 3.6.	Türkiye *E.mitis* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi	107
Şekil 3.7.	Türkiye *E.brunetti* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi	107
Şekil 3.8.	Türkiye *E.tenella* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi	108

Şekil 3.9.	Türkiye *E.maxima* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi	109
Şekil 3.10.	Türkiye *E.praecox* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi	109
Şekil 3.11.	Türkiye *E.acervulina* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi	110

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	İllerdeki toplam ve örnek alınan broiler kümes sayıları	66
Çizelge 2.2.	Klasik PCR'da kullanılan tür spesifik primerler	79
Çizelge 2.3.	Klasik PCR programı	80
Çizelge 2.4.	Soy spesifik primerler	81
Çizelge 2.5.	Nested PCR programı	81
Çizelge 3.1.	*Eimeria spp* oocystlerinin varlığı	86
Çizelge 3.2.	Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları	87
Çizelge 3.3.	Klonlama sonrasi örneklerin DNA miktarı	106
Çizelge 3.4.	*E. mitis*'in nükleotid dizisi	106
Çizelge 3.5.	*E. brunetti*'nin nükleotid dizisi	107
Çizelge 3.6.	*E. tenella'*nın nükleotid dizisi	108
Çizelge 3.7.	*E. maxima'*nın nükleotid dizisi	109
Çizelge 3.8.	*E. praecox'*un nükleotid dizisi	109
Çizelge 3.8.	*E. acervulina'nın* nükleotid dizisi	110

1. GİRİŞ

Kanatlı coccidiosisi dünya genelinde yaygın olarak görülmekte ve tavuk yetiştiriciliği yapılan işletmelerde temel sorun olarak karşılaşılmaktadır. Etkin korunma programlarının olmadığı dönemlerde, ekonomik kayıp açısından salmonellosisden sonra ikinci sırada yer alan hastalık, kanatlı yetiştiriciliğinde büyük maddi kayıplara neden olmuştur. Sonraki dönemlerde, anticoccidial ilaçların kullanılması ve hastalıktan korunma programlarının geliştirilmesine bağlı olarak bu kayıplar azalsa da, zamanla direnç gelişimi ve kalıntı problemi gibi nedenlerle yeni anticoccidial etkenlerin ve korunma yöntemlerinin araştırılması gerekliliği doğmuştur. Klinik bulgular anticoccidial uygulamaları ile baskılansa da, subklinik coccidiosis vakaları yoğun şekilde devam etmekte ve hayvanlarda verim kaybına yol açmaktadır. Bu nedenlerle, coccidiosis kanatlı yetiştiriciliğindeki ekonomik önemini hala korumaktadır (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977; McDougald ve Reid, 1991).

Hastalık özellikle genç hayvanlarda etkili olmakta ve hastalığı atlatanlarda hızla şekillenen bağışıklık sonraki dönemlerde salgınların ortaya çıkmasına engel olmaktadır. Türler arasında çapraz bağışıklık olmamasından dolayı, her zaman başka bir türden kaynaklanan salgınların gerçekleşme ihtimali söz konusudur. Modern yetiştiricilik yapılan kümeslerde binlerce tavuğun bir arada yetiştirilmesi mümkün olmakla birlikte kısa, direkt hayat döngüsü ve yüksek üreme kapasitesi ile *Eimeria* türleriyle oluşacak salgınların ortaya çıkma olasılığı da artmaktadır (Ruff ve Reid, 1977; McDougald ve Reid, 1991).

1.1. Coccidiosisin Tanımı ve Etkenlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

Coccidiosis, *Eimeriidae* ailesinde yer alan zorunlu hücre içi protozoonların meydana getirdiği bir hastalık olup, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde dünya

çapında bir sorun teşkil etmektedir. Hastalık, etkilenen sürülerde değişik derecelerde ve şiddette bağırsak lezyonlarına, bağırsak mukozasında oluşan hasara bağlı besinlerin emiliminin azalmasına ve dolayısıyla kilo kaybına, ishale, yemden yararlanmanın azalmasına ve yüksek oranlarda mortaliteye sebep olabilmektedir (McDougald, 1997).

Tenter ve Schnieder (2006)'e göre coccidiosis etkenlerinin sınıflandırılması aşağıda verilmiştir.

Alem **:** *Animalia*
Alem altı **:** *Protista*
Kök **:** *Alveolata*
Kök altı **:** *Apicomplexa*
Sınıf **:** *Coccidea*
Sınıf altı **:** *Eucoccidia*
Dizi **:** *Eimeriida*
Aile **:** *Eimeriidae*
Soy **:** *Eimeria*
Türler **:** *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria mivati*, *Eimeria praecox*, *Eimeria hagani*

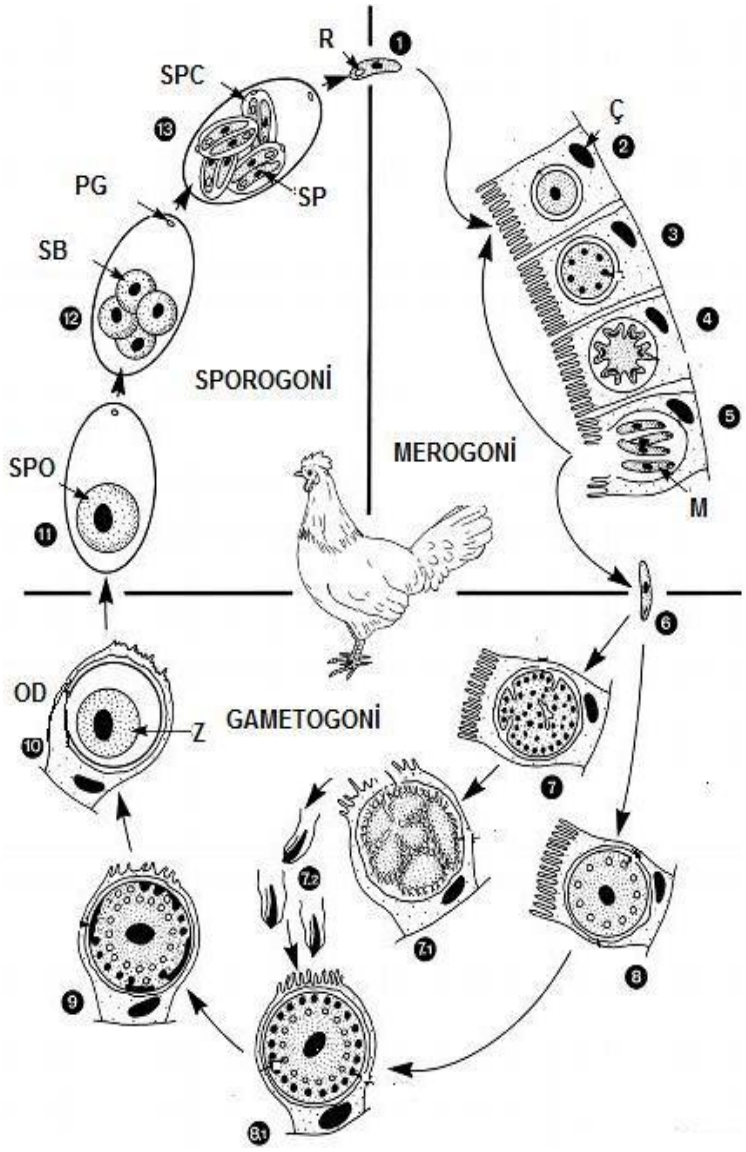
1.2. *Eimeria* Soyundaki Etkenlerin Hayat Döngüsü

Eimeria soyundaki türlerin hayat döngüsü Şekil 1.1.'de gösterilmiştir. Bu soyda yer alan türlerin hayat döngüsü 3 aşamadan oluşmaktadır:

i- Merogoni (Eşeysiz Çoğalma, Şizogoni)
ii- Gametogoni (Eşeyli Çoğalma)

iii-Sporogoni (Eşeysiz Çoğalma)

Merogoni ve gametogoni konak bağırsaklarında gerçekleşirken, sporogoni konak dışında meydana gelir (Kheysin, 1972; Hammond, 1973; Pellérdy, 1974).



Şekil 1.1. *Eimeria* spp'nin hayat döngüsü (Mehlhorn, 2001).

1. Sporozoit **2**. Merozoit **3-4-5**. 1. nesil meront gelişim evreleri **6.** Merozoit **7.** Çok çekirdekli mikrogametosit **7.1** Mikrogametosit **7.2** Mikrogametler **8**. Tek çekirdekli makrogametosit **8.1.** Makrogametosit **9-10.** Fertilizasyon ve zigot oluşumu **11**. Sporlanmamış oocyst **12-13**. Sporlanma ve sporlanmış oocyst **Ç:** Hücre çekirdeği, **M:** Merozoit, **OD:** Oocyst duvarı, **SPO:** Sporont, **SB:** Sporoblast, **SPC:** Sporocyst**, SP:** Sporozoit, **PG:** Polar granül **R:** Refraktil globül

Dışkı ile atılan oocystler uygun çevre koşullarında 2-3 gün içinde sporlanır. Oksijen ve nem varlığında 21-27 °C'lik çevre sıcaklığı oocystlerin sporlanması için en uygun ortamdır. Sporlanmanın ardından oocystler çevre şartlarına karşı dayanıklı hale gelirler ve duyarlı hayvanlar için etkenlerin enfektif formunu oluştururlar (Kheysin, 1972; Hammond, 1973).

Enfeksiyon sporlanmış oocystlerle kontamine gıda veya suyun alınmasıyla başlar. Alınan oocystler önce taşlıkta mekanik etkiyle, daha sonra da ince bağırsaklarda bulunan sindirim enzimleri ve safra tuzlarının etkisiyle parçalanır (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965; Kheysin, 1972; Ruff ve Reid, 1977). Sindirim salgılarının yardımı ile açığa çıkan sporozoitler, apikal kompleks organellerinin yardımıyla, her tür için spesifik olan bağırsak bölümündeki epitel hücrelerine girer ve endojen gelişimlerini geçirirler (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977).

Enfeksiyona sporlanmış oocystlerin alınması yol açarken, sporlanmamış oocytler alındığında dışkı ile direkt atılır. Bu durum, kontamine olmayan diğer alanların kirlenmesine yol açabilir. Deneysel çalışmalarda hayvanlara parenteral yollarla sporlanmış oocyst, serbest sporocyst, sporozoit ya da diğer gelişim formları verildiğinde enfeksiyon şekillendiği görülmüştür. Bu uygulamalarda, kanla spesifik doku ya da organlara giden etken, burda gelişimini devam ettirebilmiştir (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977). Etkenin aynı dozda oral ve parenteral yollarla verilmesi durumunda, parenteral uygulama sonucu daha hafif bir enfeksiyon şekillendiği görülmüştür. Ancak, hayvanlarda bağışıklık şekillendirmek için parenteral enfeksiyon oluşturma düşünülmüşse de pratikte uygulanmasının mümkün olmadığına karar verilmiştir (Pellérdy, 1974).

Sindirim kanalında serbest kalan sporozoitler saydam, iğ şeklinde; yaklaşık 10 x 1.5 µm büyüklüğünde, hareketli yapılardır. Sporozoitler, çekirdeğe

ve arka uçta ışık kırma özelliğine (refraktil) sahip bir globüle sahiptir (Davies ve ark., 1963).

Uzun yıllar boyunca, sporozoitlerin mide ya da bağırsaklarda serbest kaldıktan hemen sonra, gelişimlerine devam ettikleri epitel hücrelerine direkt girdikleri düşünülmüştür. Daha sonraki incelemeler bazı türlerin indirekt bir yol izlediklerini ortaya koymuştur (Davies ve ark., 1963; Ruff ve Reid, 1977). Örneğin, *E. necatrix*'in sporozoitleri ince bağırsaklardaki villusların ucundaki epitel hücrelerine girdikten sonra makrofajlarca lamina propria boyunca taşınarak bağırsak bezlerinin epiteline ulaşmakta ve gelişimlerine burda devam etmektedir (Davies ve ark., 1963).

1.2.1. Merogoni (Şizogoni, Eşeysiz Çoğalma)

Uygun bir epitel hücre içine giren iğ şeklindeki sporozoit, burda daha yuvarlak bir şekil alır. Beslenerek büyür ve bu form "trofozoit" olarak adlandırılır. Paraziti barındıran epitel hücresi, büyüyen etkene yer sağlamak amacıyla değişime uğrar ve genişler. Hücrenin çekirdeği de genişler ve yer değiştirir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Trofozoitin konak hücrede bulunduğu pozisyon, türe göre değişmektedir. Örneğin, *E. adenoeides* trofozoitleri genellikle çekirdeğin altında bulunurken *E. furonis* trofozoitleri üstte, *E. alabamensis*'in erken gelişim formları ise çekirdeğin içinde yer alır (Davies ve ark., 1963).

Trofozoitin çekirdeği, birkaç saat içinde merogoni (şizogoni) ile bölünür. Yeni oluşan çok çekirdekli bu yapıya meront (şizont) denir. Kısa süre sonra yeni oluşan her bir çekirdeğin etrafını sitoplazma sarar ve 1. nesil merozoitler (şizozoidler) oluşmaya başlar. Başlangıçta yuvarlak yapıda olan bu merozoitler hızla uzayarak mekik şeklini alır (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965; Kheysin,

1972). Merozoitler 5 x 1,5 µm büyüklüğünde olup, granüler bir sitoplazmaya ve merkezi yerleşimli bir çekirdeğe sahiptir (Davies ve ark., 1963).

Olgunlaşmış merozoitleri içeren 1. dönem merontlar, konak hücresini şişirerek, hücrenin komşu hücrelere ya da bağırsak lumenine doğru çıkıntı yapmasına neden olur. Her bir meront içindeki merozoit sayısı türe göre değişir. Açığa çıkan olgun merozoitlerin sınırlı hareket yeteneği vardır. Merozoitler uygun bağırsak epitel hücrelerini yeniden istila eder ve yaşam döngülerine devam ederler. Merogoni sayısı, yine türlere göre değişmekte olup bir, iki ya da daha fazla sayıda olabilir (Davies ve ark., 1963; Kheysin, 1972; Ruff ve Reid, 1977).

Yeni bağırsak epitel hücresine giren merozoit, sporozoite benzer şekilde yuvarlaklaşır, beslenir, büyür ve sonra bölünerek 2. nesil merontu oluşturur. İkinci nesil merontlar, *E. tenella* gibi bazı türlerde 1. nesil merontlardan daha büyük olup dokularda daha büyük hasar oluştururken, *E. meleagrimitis* gibi bazı türlerde ise daha küçük olup az sayıda ancak daha büyük merozoitlere sahip olabilir. Merontların dokuda yerleştikleri yerler de değişiklik gösterir. Örneğin, sekumda yerleşen *E. tenella*'nın büyük 2. nesil merontları mukoza epitelinden submukozal dokulara doğru hatta kas katmanlarına yayılabilir. Buna karşılık, *E. adenoeides*'in küçük 2. nesil merontları bağırsak epitel hücrelerinin hemen uç kenarında, çekirdeklerin üstünde yer alır (Davies ve ark., 1963; Kheysin, 1972; Atasever, 1992).

İkinci nesil merontların bölünmesi de ilkine benzer şekilde gerçekleşir ve ikinci nesil merozoitler oluşur. Türlere göre değişmekle birlikte, bu merozoitler ya yeni epitel hücrelere girerek 3. nesil merontları oluşturur ya da farklılaşarak seksüel gelişim formlarına dönüşürler. Seksüel çoğalma genellikle merontun yakınındaki hücrelerde gerçekleşir. Ancak bazen *E. necatrix*'in 2. nesil merozoitlerinde olduğu gibi ince bağırsaklardan sekuma göç de mümkün olabilir (Davies ve ark., 1963).

1.2.2. Gametogoni (Eşeyli Çoğalma)

Merozoitlerin farklılaşması ile dişi ve erkek gametositler oluşur. Erkek gametositler diğer bir deyişle mikrogametositler genişleyerek çok sayıda bölünmeye uğrar. Bunun sonucunda çok sayıda mikrogamet oluşur (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965). Mikrogametler mekik şeklinde ve hareketlidir. Yaklaşık olarak 5 µm uzunluğunda olup aktif hareketlerini sağlayan 2 flagellaya sahiptirler (Davies ve ark., 1963).

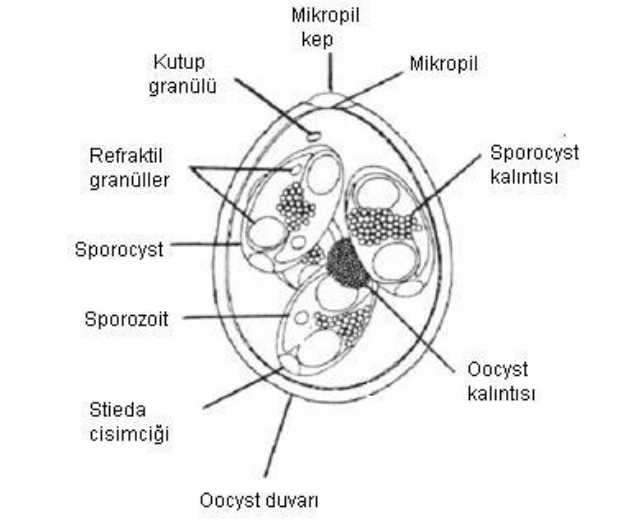
Genel bir kural olarak, dişi makrogametositler mikrogametositlere oranla daha büyük olur. Farklı olarak *E. maxima* bu genellemenin dışında kalır. Her bir makrogametositten tek bir makrogamet oluşur. Makrogametin merkezi yerleşimli bir çekirdeği ve granüler görünümde bir sitoplazması vardır (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965). Makrogametin mikrogamet tarafından döllenmesi ile zigot oluşur ve kalın bir duvarla çevrelenmesiyle ‘‘oocyst’’ adını alır (Pellérdy, 1965; Kheysin, 1972; Ruff ve Reid, 1977).

Kist duvarı tamamlandığında, oocyst konak hücresinden ayrılır ve dışkı ile dışarı atılır. Enfeksiyonun başlangıcı ile dışkıda ilk oocystin görülmesi arasındaki süreye ‘‘prepatent süre’’ denir. Bu süre türlere göre değişmekte olup tür ayrımında kullanılan karekteristik bir özelliktir. Örneğin, *E. praecox* için 84 saat, *E. mitis ve E. tenella* için 138 saat kadar sürebilmektedir (Davies ve ark., 1963; Kheysin, 1972; Ruff ve Reid, 1977).

1.2.3. Sporogoni (Eşeysiz Çoğalma)

Sporlanmış oocystlerin önem taşıyan biçimsel özellikleri Şekil 1.2.’de verilmiştir. Dışkıyla atılan oocystler, uygun sıcaklık ve nem koşullarına sahip dış ortamda sporlanma evresini geçirirler. Oocyst dış ortama atıldığında, içerisindeki zigot kist

duvarı içindeki boşluğu tamamen doldurur. Ancak bir kaç saat içinde protoplazma kitlesi kontraksiyona uğrar ve belirgin bir boşluk oluşur. Uygun sıcaklık ve nem koşulları oluştuğunda protoplazmada segmentasyon başlar. Bu ‘‘sporont’’ evresinde, nüklear materyal ve sitoplazma arasında gözle görülür bir ayrım yoktur. Daha sonra, 4 adet yuvarlak, ışık kırma özelligine sahip yapı oluşur ki bunlara ‘‘sporoblast’’ adı verilir. Sitoplazmadan kalan, ışık kırma özelligine sahip yuvarlak yığın ise ‘‘oocyst kalıntısı’’ olarak adlandırılır (Davies ve ark., 1963; Kheysin, 1972; Hammond, 1973).



Şekil 1.2**.** Sporlanmış *Eimeria* oocysti (Anon, 2009e).

Yuvarlak yapıdaki sporoblastlar kısmen uzar, oval hale gelirler. Çevrelerinde protein granüllerinin toplanıp kaynaşmasıyla da sporoblastların etrafında ince bir zar oluşur ve ‘‘sporocyst’’ olarak adlandırılırlar. Bazı türlerde, sporocystlerin sivri kutbunda, duvarın kalınlaşmasıyla oluşan ve “stieda cisimciği” olarak adlandırılan bir yapı bulunabilir. Sporocyst içindeki protoplazmanın bölünüp uzamasıyla iki adet ‘‘sporozoit’’ oluşur. Sporozoitler, granüler bir sitoplazmaya ve merkezi yerleşimli bir çekirdeğe sahiptir. Sporozoitin daha yuvarlak olan ucunda, ışık kırma özelliğine sahip, küremsi yapılar mevcuttur.

Bölünme sonrasında kullanılmamış sitoplazma kısmı “sporocyst kalıntısı” olarak adlandırılır. Sporlanmasını tamamlamış oocytlerin genellikle daha sivri olan uçlarında, kökeni ve görevi bilinmeyen, sayısı üçe varabilen ve ‘’kutup granülü’’ olarak tanımlanan küçük, ışık kırıcı granüller olabilir (Davies ve ark., 1963; Kheysin, 1972).

1.3. *Eimeria* Oocystlerinin Morfolojik Özellikleri

Oocystlerin morfolojik özelliklerinden yararlanılarak yapılan tür tayini, geleneksel ve en sık kullanılan tanı metodudur. Türe özgü morfolojik oocyst özelliklerinden en önemlileri: Oocyst şekli ve büyüklüğü; duvarının rengi, yapısı ve durumu; mikropil varlığı/yokluğu ile kep varlığı/yokluğudur. Bunlara ek olarak, ancak sporlanma sonrası görülebilen oocyst ve sporocyst kalıntısı, stieda cisimciği ile polar granül varlığı/yokluğu da diğer önemli özelliklerdir (Davies ve ark., 1963).

Oocyst şeklinde türler arasında farklılıklar söz konusu olabilirken herhangi bir türün oocystleri genellikle aynı şekle sahip olur. Oocyst şekilleri yuvarlak, yuvarlağa yakın, yumurta benzeri, elipsoit, silindirik veya armut benzeri olarak görülür (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965; Kheysin, 1972).

Oocyst büyüklüğü de türe göre değişir. Belirli bir türün çok sayıdaki oocytlerinin uzunluk ve en ölçümleri dikkate alındığında, o tür için karakteristik olan ortalama büyüklük elde edilir (Davies ve ark., 1963; Kheysin, 1972). Bununla birlikte enfeksiyon süresince, aynı türe ait oocystlerin büyüklüğünde farklılık olduğu da belirlenmiştir. Örneğin, *E. acervulina* oocystleri, hem aynı hem de farklı hayvanlarda, günlük olarak incelendiğinde oocyst büyüklüğünün değiştiği saptanmıştır. Yine tek bir oocyst ile enfeksiyon oluşturulduğunda oocyst büyüklüğünün daha fazla iken yüksek dozda oocyst kullanıldığında daha küçük

olduğu kaydedilmiştir. Daha küçük boyutlarda oocyst atılmasının oocyst yoğunluğuyla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Davies ve ark., 1963).

Çoğu türün oocyst duvarı renksiz, şeffaf olup belirgin çift katlı bir yapıya sahiptir. Duvarın dış yüzü pürüzsüz olup "ectocyst" adını alırken daha ince iç katman "endocyst" olarak adlandırılır. Bazı türlerde ise oocyst duvarı sarı, yeşilimsi, pembemsi renklerde olabilmektedir (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965; Kheysin, 1972). Duvarın kalınlığı da yine türlere göre değişmektedir. Örneğin, *E. bukidnonensis*'te mat, koyu kahverenkli olan oocyst duvarının kalınlığı 2 µm'a ulaşmaktadır (Davies ve ark., 1963).

Mikropil oocyst duvarının uç kısmında yer alan, ışık kırıcı özellikte bir alandır. *Eimeria intricata*'da olduğu gibi büyük ve belirgin olabildiği gibi *E. acervulina*'nınki gibi belirsiz de olabilir. Bazı oocystlerde mikropilin dış yüzeyini örten ince, membranöz yapıda ve kubbe şeklinde ''polar kep'' adı verilen duvar çıkıntısı da görülebilir (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1965; Kheysin, 1972).

1.4. Tavuk Coccidiosisinde Patogenez

Eimeria türlerinin bir kısmı patojen iken bir kısmı patojen değildir. Hepsi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, patojenite bazı faktörlere bağlıdır. Enfeksiyonu oluşturan oocyst sayısı başına yıkımlanan konak hücre sayısı, merogoni sayısı, merogoni sonucu açığa çıkan merozoit sayısı, etkenin konak dokularında ve hücrelerindeki yerleşim yeri gibi özellikler patojenitenin derecesini belirleyen başlıca faktörlerdendir. Bunların yanı sıra enfeksiyon dozu, reenfeksiyon derecesi ve zamanı, konağın doğal ya da kazanılmış bağışıklığının derecesi de patogenezi belirleyen diğer önemli faktörlerdir (Levine, 1985).

Eimeria türlerinin çoğu yaşamlarını bağırsak epitel hücrelerinde geçirdiklerinden, *Eimeria* türlerinin patojenitesi değerlendirilirken konak hücrelerinin normalde sürekli olarak yenilendiği unutulmamalıdır. Civcivlerde, Lieberkühn kript hücreleri 2 gün içerisinde yenilenirken ileri yaştakilerde bu olgu daha yavaş gelişir. Eğer bir bağırsak epitel hücresi doğal olarak dökülüyorsa, içerisinde yer alan parazitin konağa zarar verme olasılığı oldukça düşüktür. Bu nedenle tür patojenitesi belirlenirken parazitin istila ettiği hücre tipinin ve bu hücrenin normal hayat süresinin de dikkate alınması gerekir (Levine, 1985).

Coccidiosis, az sayıda hayvanın bir arada bulunduğu yaban koşullarında sorun oluşturmaz. Bu ortamlarda klinik hastalık oluşturmayan, hafif seyirli "coccidiasis" olguları ile karşılaşılır. Ancak, hayvanlar yüksek dozda etkeni alacak şekilde bir araya toplanırlarsa klinik hastalık bulguları ortaya çıkabilir. Diğer bir ifadeyle, coccidiosis kapalı alanda bir arada yetiştirilen hayvanların hastalığı olarak da tanımlanabilir (Levine, 1985).

Hastalığın başlıca klinik bulgusu ishaldir. Hastalığın oluşumunda rol alan *Eimeria* türüne bağlı olarak dışkıda kan da görülebilir. Yine etkenin türü ve enfeksiyon dozuna göre değişmek üzere, hayvanlarda kilo kaybı, güçten düşme ve hatta ölüm gözlenir. Genellikle genç hayvanlar hastalığa daha duyarlıdır. Yetişkinler hastalığı daha önceden geçirmiş olmaları nedeniyle enfeksiyona kısmen bağışıktırlar. Tekrarlayan enfeksiyonlar hafif seyrettiğinden hasar vermemekle birlikte, genç hayvanlar için enfeksiyon kaynağı teşkil eder. Ancak, stres yaratan koşullarda bağışıklığın baskılanmasına bağlı olarak, yetişkin hayvanlarda da hastalığın klinik tablosunun gelişmesi mümkündür (Levine, 1985).

E. tenella, *E. necatrix* ve *E. brunetti*'nin endojen gelişim aşamaları bağırsak dokusunda şiddetli lezyonlar oluşturur. İkinci merogoni sonrasında

açığa çıkan merozoitler, şiddetli doku hasarına ve hemorajiye neden olur. Akut olgularda hemoraji genç hayvanların ölümüne neden olabilir (Pellerdy, 1974).

Epitel hücrelere yerleşen etkenlerin gelişim formları daha sonra bu hücrelerde hasara sebep olur. Bağırsak mukozasının bütünlüğü bozulduğundan besinlerin emilimi önlenir; bakterilerin ve zararlı maddelerin dokulara yayılması kolaylaşır. Bu da yangının şiddetlenmesine yol açar (Pellerdy, 1974).

Enfeksiyonun klinik olarak ortaya çıkması, *Eimeria* türüne, enfektif oocyst sayısına, etkenin patojenitesine ve konağın direncine göre değişmektedir. Aynı yaştaki tavukların eşit oocyst dozu ile enfekte edildiği bir çalışmada; *E. acervulina* oocysti verildiğinde 4-5. günlerde, *E. brunetti*'de 5-6. günlerde, *E. maxima*'da 4-6. günlerde, *E. mivati*'de ise 3-4. günlerde patojenitenin en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Pellerdy, 1974).

1.4.1. *Eimeria* Türlerinin Patojenitesini Etkileyen Faktörler

1.4.1.1. Yerleşim Alanı

Etkenlerin konakta oluşturdukları hasar, yerleştikleri alandaki sayılarına bağlıdır. Alınan sporlanmış oocyst sayısına bağlı olarak bazı sınırlamalarla birlikte etkenlerin üreme kapasiteleri ve nihai sayılari tahmin edilebilir. Bu durum, sayıca konağı ele geçirene, bağışıklık sisteminin müdahalesiyle üreme durana ya da azalana kadar devam eder. Bu nedenle, etkenlerin konağa verdikleri zararın derecesi direkt olarak konak hücrelerinin yıkımı ile orantılıdır (Long, 1973).

E. praecox gibi bazı türler yalnızca yüzeysel villus epitelinde gelişirken, *E. acervulina* gibi türler ise öncelikle Lieberkühn kriptlerinde daha sonra da yüzeysel villus epitelinde gelişir. *E. tenella* ve *E. necatrix* ilk merogoni dönemini Lieberkühn kriptlerinde gerçekleştirirken, ikinci nesil merontları ise mukozadan

uzakta, tunica propriadaki fibrositlerde gelişir ve kılcal damar yırtılmasına bağlı olarak şiddetli kanamaya neden olur (Long, 1973).

Tür patojenitesini belirleyen bir başka faktör de etkenlerin endojen gelişim evrelerinin büyüklükleridir. Yüzeysel villusların epitel hücrelerinde, çekirdeğin üzerinde gelişen ve büyüklükleri 1-15 µ arasında değişen parazitik evreler sadece ömürlerinin sonuna gelmiş epitel hücrelerin yıkımına neden olur. Bu gelişim tarzına *E. praecox* enfeksiyonu iyi bir örnek olup, bu durumda hafif ya da orta şiddette hücresel bağışıklık cevabı oluşur. Konak hücresinde çekirdeğin altında gelişen ve büyük meront ile gametositler oluşturan *E. maxima* ve *E. brunetti* gibi türler konağa daha fazla zarar verir (Long, 1973).

1.4.1.2. Oocyst Dozu

Konakta *Eimeria* etkenlerinin üremesinin, alınan sporlanmış oocyst sayısına bağlı olduğu, reenfeksiyonun olmadığı durumlarda da oocyst oluşumu ile konaktaki enfeksiyonun son bulduğu bilinmektedir. Örneğin deneysel *E. acervulina* enfeksiyonlarında, konağa verilen sporlanmış oocyst sayısı arttıkça, etkenlerin gireceği yeterli sayıda epitel hücresi kalmadığından, oocyst üretiminde azalma olduğu saptanmıştır. Öte yandan, yüksek oocyst dozunun etken sayısında azalmaya neden olduğu kaydedilmekle beraber, *E. acervulina* enfeksiyonunun konakda daha ağır hasara neden olduğu da gözlemlenmiştir (Long, 1973).

1.4.1.3. Oocyst Kültürünün Canlılığı ve Patojenitesi

Sahadan toplanan aynı *Eimeria* türünün duyarlı hayvana verilmesi ile benzer etkilerin ortaya çıkmasını beklemek doğru değildir. Bazı oocystler uygun olmayan koşullarda uzun süre canlılığını koruyabilirken çoğu yıkımlanır ve kalanların da patojenitesi azalır. *Eimeria* oocystlerinin derin kümes altlığında sadece 3 hafta canlı kaldığını belirtilmiştir. Altlıktaki oocyst sayısı, dışkı ile atılan yeni oocystlerle

az ya da çok sabitlenmektedir. Oocystler bakteri ve mantarlardan etkilenmekle birlikte oocystlerin canlılığını belirleyen başlıca faktörler oksijen ve nemdir. Oocystler nem ve oksijen eksikliğinde hızla ölür. Sporlanmada çevre sıcaklığı öneme sahip olup, sporogoni için optimum sıcaklık 29 ºC'dir (Long, 1973).

1.4.1.4. Konak Yaşı

Yaşlı hayvanlar *Eimeria* enfeksiyonlarını genç hayvanlara kıyasla daha kolay atlatabilmektedirler. *Eimeria tenella* coccidiosisi, primer olarak genç hayvanların hastalığı olup, özellikle bu hayvanlarda epidemilere rastlanmaktadır. *E. necatrix* coccidiosisi genellikle 5-7 haftalık hayvanlarda görülürken, *E. acervulina* yine yaşlı hayvanlarda görülen bir türdür (Pellérdy, 1974).

Bazı *Eimeria* türlerinin, belirli yaş dönemlerinde görülüyor olması yaş direnci olasılığını desteklemektedir. Bu bilgilere göre de, tavuklar bazı *Eimeria* türlerine ömürlerinin sadece belirli bir döneminde duyarlılık göstermekte, diğer evrelerde ise direnç göstermektedirler. *E. maxima*, *E. praecox*, *E. tenella* ve *E. acervulina* türleri ile yapılan bir çalışmada, değişik yaş gruplarındaki tavuklara verilen oocyst miktarı ile atılan oocyst miktarları kaydedilmiştir. Hayvanlarda hafif ya da orta şiddette enfeksiyon oluşturularak kalabalık etkisi ortadan kaldırılmıştır. Her dört olguda da yaşın en azından belli ölçüde de olsa oocyst üretimi üzerinde etkisi olduğu görülmüş, 1 haftalık yavruların 5-6 haftalık tavuklara kıyasla daha az oocyst çıkardığı belirlenmiştir. Yaşlı hayvanlardaki yüksek oocyst üretimi olasılıkla daha uzun bağırsağa sahip olmaları ve gençlerde oocyst verilmesi ile oluşan yangısal reaksiyonun daha şiddetli olması ile ilgilidir. Yangısal reaksiyon şizogoniyi engellemekte ve gametogoni başlamadan birçok oocyst hasar görmektedir. Buna bağlı olarakta oocyst üretimi azalmaktadır (Pellérdy, 1974). Hein'a atfen Pellérdy (1974), aynı sayıda *E. acervulina* oocysti ile enfekte edilen tavuklardan 2 haftalık olanlarda patojenik etkinin 6 haftalıklara oranla daha belirgin olduğunun kanıtlandığını kaydetmiştir. Bunun nedeni ise genç tavukların

kısa uzunluktaki bağırsaklarında etkenlerin daha yakın gelişmesine ve mukoza yüzeyindeki doku reaksiyonunun yaşlılara oranla daha güçlü olmasına bağlanmıştır. Bununla beraber, 20 milyon oocyst ile enfekte edilen genç hayvanlardaki kilo kaybı, aynı doz verilen yaşlılara oranla daha azdır. Bu iki bulgunun çelişmesi ise *E. acervulina*'nın hafif patojeniteye sahip olmasına ve bağırsak uzunluğu daha fazla olan yaşlı hayvanlarda oluşan tahribatın da daha fazla olması nedeniyle yemden beslenememeleri şeklinde açıklanmaktadır (Pellérdy, 1974).

1.4.1.5. Konak Irkı

Yapılan çalışmalar, tüm tavuk ırklarının *Eimeria* türlerine aynı ölçüde duyarlı olmadığını, bazı türlerin daha dirençli olduğunu ve buna bağlı olarak da hastalıktan en az düzeyde etkilendiklerini ortaya koymuştur. Örneğin, Pellérdy (1974), Rosenberg'un yaptığı deneysel çalışmalar sonucunda, Beyaz Leghorn, New Hampshire ve Rhode Island Red tavuk ırklarının coccidiosise daha dirençli olduklarını, Barred Plymouth Rock ve Jersey White Giant ırklarının ise daha duyarlı olduklarını belirlediğini bildirmiştir.

Long (1973), Rosenberg, Alicata ve Palafox'a atfen cinsiyet ve pasif bağışıklık arasında bağlantı olmadığının bildirildiğini ancak sonraki çalışmalarda bağışık annelerden yavrularına pasif bağışıklığın geçmesinde maternal antikorların önem taşıdığının anlaşıldığını vurgulamıştır. Long (1973), *E. tenella* ile çalışan Champion'un seçici yetiştirmenin enfeksiyona dirençli hayvan ırkları oluşturulmasında etkin bir yöntem olarak bildirildiğini ancak hastalık direncinde cinsiyetin etken olmadığını belirlediğini aktarmıştır.

1.4.1.6. Karışık Enfeksiyonlar

Evcil hayvanlarda konağa özgü coccidiosis etkenlerinin birden fazlasının eşzamanlı varlığı bilinmektedir. Bu türlerden bazıları çok, bazıları daha az patojen, bir bölümü ise apatojen olarak kabul edilir. Tek bir türden ileri gelen saf enfeksiyonlar doğada nadiren gerçekleşir. Dolayısıyla coccidiosis olguları, hastalığa neden olan türlere, konak vücudunda bulunan diğer parazitlerin etkilerine, konağın genel sağlık ve beslenme durumuna, hava koşulları ile bakım uygulamaları gibi çevresel etmenlerin ortak etkileşimine bağlıdır (Levine, 1985).

1.5. Tavuk Coccidiosisine Neden Olan *Eimeria* Türlerinin Morfolojik ve Biyolojik Özellikleri

Tavuk coccidiosis etkenlerinin sindirim sistemindeki gelişim yeri özel olup, bazı türler bağırsakların belirli bölümlerine yerleşirler. Bu nedenle Pellerdy (1965) tavuk coccidiosisini sekum coccidiosisi, ince bağırsak coccidiosisi ve rektum coccidiosisi olmak üzere 3 gruba ayırmıştır. Kaufmann (1996) ise *Eimeria* etkenlerini yerleşim alanında hemoraji oluşturanlar (*E. tenella, E. necatrix*) ve hemoraji oluşturmayanlar (*E.maxima, E. brunetti, E. mivati, E. acervulina, E.mitis, E. praecox*) şeklinde gruplandırmıştır. Bu türlere ait özellikler aşağıda verilmiştir.

1.5.1. *E. acervulina* Tyzzer, 1929
(Sinonim*: E. diminuta* Fernando ve Remmler, 1973)

Dünyada yaygın olarak karşılaşılan bu tür ince bağırsakların ön bölümüne yerleşir (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Oval, düzgün şekle sahip oocystler 12-23 x 9-17 (ortalama 16-18 x 13-15) µm büyüklüğündedir. Düzgün bir yüzeye sahip oocyst duvarı 2 tabakadan oluşur (Levine, 1985). Mikropil, oocyst ve sporocyst kalıntısı bulunmazken oocystlerin çoğunda kutup granülü mevcuttur. Kutup granülü bazılarının sporlanmamış evrelerinde de görülür (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Sporocystler oval şekilde, 9-12 x 4,5-7,5 (ortalama 10,5 x 5,5) µm büyüklüğünde olup stieda cisimciğine sahiptir (Pellérdy, 1974). Sporlanma 24 saatte tamamlanır (Davies ve ark, 1963; Kheysin, 1972; Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Yaşam Döngüsü: İnce bağırsaklarda serbest kalan sporozoitlerin büyük bölümü duodenum mukozasını örten epitel hücrelerini istila eder. Yoğun enfeksiyonlarda sporozoitler bağırsağın diğer bölümlerine de yerleşebilir (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977; Levine, 1985). Merogoni 4 nesil tekrarlanır. Birinci nesil merontlar 9-11 µm büyüklüğünde olup Lieberkühn bezlerinin tabanına yerleşir ve enfeksiyonun 36-48. saatlerinde olgunlaşır. Bu merontlar merkezi bir kalıntıyı çevreleyen, 8-16 adet 4-4,5 µm uzunluğunda merozoite sahiptir. Daha küçük olan 2. nesil merontlar ise Lieberkühn bezlerinin boyun bölümünde yerleşir ve enfeksiyonun 45-56. saatlerinde olgunlaşırlar. Büyüklükleri 5-5,5 µm olarak ölçülen bu merontlar, 16 adet 4-4,5 µm uzunluğunda merozoit içerir. Üçüncü nesil merontlar villusların tabanında olup 4-5,5 µm büyüklüğündedir ve enfeksiyonun 56-72. saatlerinde olgunlaşırlar. Bir kalıntıyı çevreleyen 8 adet 5-6 µm uzunluğunda merozoit içerirler. Dördüncü nesil merontlar villusların uç ve yan kısımlarına yerleşir, 7-9 µm büyüklüğünde olup enfeksiyonun 80-96. saatlerinde olgunlaşırlar. Olgunlaşan bu merontlar, 32 adet 9-10 µm uzunluğunda merozoit ve büyük bir kalıntı kitlesi içerir (Levine, 1985).

İnce bağırsakların ön kısmında özellikle villusları örten epitel hücreleri, daha az oranda da bez hücreleri içerisinde ve konak çekirdeğinin üstünde gerçekleşen gametogoni dönemi enfeksiyonun 4. gününde, 7-8 µm büyüklüğündeki mikrogametositlerin oluşumuyla başlar. Makrogametositler ise

14,5 x 19 µm büyüklüğündedir. Mikrogametosit içerisinde 2-3 µm uzunluğunda, çok sayıda üç kamçılı mikrogamet şekillenir. Prepatent süre 4 gün, patent süre ise daha uzun sürer (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Patojenite: Genellikle az patojen bir tür olarak değerlendirilen *Eimeria acervulina'*nın yüksek inokulasyon dozlarında şiddetli hastalık bulguları, hatta ölüm şekillenmesi mümkündür (Levine, 1985).

İmmunite: *E. acervulina* enfeksiyonlarında bağışıklık yavaş gelişir. Deneysel çalışmalarda, hayvanlarda etkin bir bağışıklık şekillenebilmesi için enfeksiyonun tekrarlanması gerektiği görülmüştür (Davies ve ark, 1963; Pellérdy, 1974). Pellérdy (1974) bir coccidiosis salgınında, reenfeksiyon durumunda hayvanlarda oocyst atılımının azalması ile sonuçlanan bir immunite şekillendiğini bildirmiştir. Bu immunojenik özellik *E. acervulina* ile *E. mivati*'nin ayrımını sağlamaktadır.

Klinik Bulgular: Nadiren ağır seyreden *E. acervulina* enfeksiyonlarında klinik bulgular belirsizdir. Ağır enfeksiyonlarda geçici ishal, büyüme geriliği, yumurta üretiminde azalma ve kilo kaybı gözlenebilir (Pellérdy, 1974). Bağırsak duvarına parazitlerin verdiği hasar sonucu emilim engellenir. Bu nedenle de kanda özellikle karoten, vitamin A ve proteinlerin konsantrasyonları düşer. Bu da karaciğerin kanda vitamin A'yı normal seviyede tutmasını zorlaştırır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde görülen bu fenomen, hastalık ilerledikçe daha belirginleşir (Pellérdy, 1974).

Patolojik lezyonlar: Lezyonlar özellikle duodenumda belirgin olmakla birlikte, jejenum ve ileuma da ilerleyebilir. Ayrıca rektum ve sekumda da lezyonlara rastlandığı bildirilmiştir. Merogoni evresinde ortaya çıkan merozoitler uzağa göç etmeyip, yığınlar halinde yakın hücreleri işgal eder ve bağırsak mukozası üzerinde makroskobik olarak görülebilen gri-beyaz odakların oluşmasına neden olur. Başlangıçta nokta tarzında olan bu odaklar yaygınlaşarak, birçok seksüel

evreyi ve gelişmekte olan oocystleri içeren lezyonlara dönüşür. Bu lezyonlar özellikle orta şiddetli enfeksiyonlarda rahatlıkla görülebilmekte, şiddetli enfeksiyonlarda ise birleştiklerinden seçilememektedir. Bağırsak içeriği hamur kıvamındadır. Ara sıra şiddetli vazodilatasyona bağlı olarak mukozada kızarıklık ve yüzeyinde kataral eksudat görülür. Ancak kanamaya nadiren rastlanır. Epitel döküntüsü seyrek olarak görülür (Davies ve ark, 1963; Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

1.5.2. *Eimeria brunetti* P.P. Levine, 1942

Tavuklarda yaygın olarak görülen bir türdür. İlk nesil merontları ince bağırsakların tamamında; geç kuşak merontlar, gametositler ve gametler ise ince bağırsağın posteriorunda; sekum, rektum ve kloakada gözlenir (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Oval yapıdaki oocystler 14-34 x 12-26 (ortalama 23-35 x 19-20) µm büyüklüğünde olup, pürüzsüz ve ince bir duvara sahiptir. Mikropil ve oocyst kalıntısı bulunmazken sporocyst kalıntısı ve genellikle bir kutup granülü mevcuttur. Uzun, oval yapılı sporocystler 13 x 7,5 µm ölçülerinde olup, stieda cisimciğine sahiptirler (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Sporlanma süresi 18 saat-2 gün arasında değişir (Levine, 1985).

Yaşam Döngüsü: Pellérdy (1974), Boles ve Becker'e atfen *E. brunetti* sporozoitlerinin ince bağırsağın anterior kısmında ve bazal membrana yakın olacak şekilde lokalize olduklarını; merogonik aşamaların ise daha posteriorda, ileumun terminalinde, rektum ve kloakada bulunduğunu bildirmiştir.

Etken, 3 merogoni evresi geçirir. İnce bağırsakların orta bölümünde, villusların tabanındaki epitel hücrelerine yerleşen 1. nesil merontlar, ortalama 28 x 21 µm büyüklüğündedir ve her biri ortalama 318 merozoit içerir. Daha küçük

olan 2. nesil merontlar ise inokulasyondan sonraki 3. günden itibaren villusların uç kısmında gözlenir ve ilk nesile benzer uzunlukta, 15-120 merozoit içerir. Üçüncü nesil merontlar inokulasyonu takiben 84. saatte oluşur ve olgunlaşmaları inokulasyon sonrası 4. günde tamamlanır. Gametositler inokulasyon sonrası 5. günden itibaren, villusların yan yüzleri ve uçlarında, ya konak çekirdeğinin üstünde ya da bazal membran üzerinde görülür. Gametositler, son nesil merontlara benzer şekilde ince bağırsakların son kısmı ile kalın bağırsaklarda bulunur. Mikrogametositler, “blastofor” olarak adlandırılan birkaç mikrogamet gelişme odağı içerir ve yaklaşık 25 x 22 µm ölçülerindeki makrogametositlerden daha büyüktürler. Prepatent süre 5 gündür (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Patojenite: Son derece patojen bir türdür. Patojenite özellikle büyük merontlarının ve gametositlerinin geliştiği evrelerde meydana gelmektedir (Pellérdy, 1974).

Klinik Bulgular: Özellikle genç tavukları etkilemekle birlikte yumurtacı tavuklarda da *E. brunetti* salgınını bildirmiştir. Tanı için klinik bulgular yeterli değildir. Hayvanlarda keyifsizlik, kanlı dışkılama ve tüylerde dışkıyla kirlenme görülür. Bağırsaklardaki hemoraji, sekal coccidiosise oranla daha az belirgindir. Kloaka ya da yakınındaki bağırsak bölümlerine yerleşen etkenlere bağlı, dışkı genellikle kanlı olup bazen fibrin tabakası içerir ve kötü kokuludur. Şiddetli hastalıklarda hayvanlar 5-6 gün içinde ölebilir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Patolojik lezyonlar: *E. brunetti* enfeksiyonlarında makroskobik görünüm karekteristiktir. Rektum ve kloaka mukozasında ve bazen de sekumun tubuler kısmı ile ileumun terminal kısmında iğne ucu kadar ya da daha büyük, birbirine karışmış hemorajik alanlar mevcuttur. Bağırsak mukozası şişkin, hiperemik; içeriği somon rengindedir. Bağırsak açılmadan önce seroza boyunca, kırmızı çizgi halinde hiperemik alanlar gözle görülebilir. Sekumun tubuler kısmında, kazeöz bir kitle lumeni tıkayabilir. İleumdan kloakaya kadar uzanan bölümde,

mukozadaki küçük hemorajiler segmentlere homojen kırmızı bir renk verebilir. Mukoza kıvrımlarının birleştiği noktalardaki rektal kanamalar, merdiven basamaklarına benzer şekilde tipik bir görünüm oluşturur. Rektum mukozası şişmiş ve duvarı belirgin olarak kalınlaşmıştır. Kloaka mukozası da şişer, mukoza ve serozası boyunca hiperemi ve hemoraji görülür. İlerleyen olgularda bazen nekrotik-fibrinöz enteritis şekillenebilir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Mikroskobik olarak mukozal hiperemi, şiddetli kapillar kanamalar, epitel döküntüsü ve yangı hücreleri reaksiyonu en yaygın lezyonlardır. Lezyonlar özellikle büyük merontların oluştuğu dönemde, açığa çıkan merozoitlerin neden olduğu doku hasarına bağlı, belirgin olarak görülmektedir. Merogonik aşamalar epitelin altında lokalizedir ve gametositler rektum epitelinin içindedir (Pellérdy, 1974).

1.5.3. *Eimeria hagani* P.P. Levine, 1938

Nadiren karşılaşılan bir türdür. Tavukların ince bağırsaklarının ön 1/3'lük bölümüne yerleştiği belirlenmiştir (Kheysin, 1972; Ruff ve Reid, 1977; Levine, 1985).

Genişçe, oval yapıdaki oocystleri 16-21 x 14-19 (ortalama 19 x 18) µm büyüklüğünde olup düzgün yapıda, tek katlı bir duvara sahiptir. Mikropil yoktur ancak sporlanmış oocystte kutup granülü mevcuttur. Sporlanma 18-48 saatte gerçekleşir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Prepatent süre 6-7 gün (Péllerdy, 1965; Kheysin, 1972; Levine, 1985), patent süre ise 8 gündür (Kheysin, 1972).

Etkenin gelişimini sürdürdüğü duodenum ve ince bağırsakların ön yarımında seroza yüzeyinden görülebilen, çok sayıda, yuvarlak hemorajik odaklar mevcuttur (Davies ve ark, 1963; Ruff ve Reid, 1977). Bağırsakların

posterior kısmında da az sayıda lezyona rastlanılabilir. Bağırsakların mukoz yüzeyinden alınan kazıntılarda oocystlere ve diğer gelişim evrelerine rastlanılır (Davies ve ark, 1963).

E. hagani az patojen bir tür olarak tanımlanmaktadır. (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Davies ve ark (1963), Levine'ın 10 haftalık tavuklara yüksek sayıda sporlanmış *E. hagani* oocysti verdiğinde, ilk 5 günde hayvanların bağırsağında sadece hiperemi şekillendiğini, 6. günün sonunda incelenen tavuklarda ise, duodenum ve ince bağırsakların ön kısmında şiddetli kataral yangı gözlemlediğini bildirmişlerdir.

1.5.4. *Eimeria maxima* Tyzzer, 1929
(Sinonim: *Eimeria indendata, Eimeria tyzzeri)*

Dünyada yaygın olan bu tür, tavuğun ince bağırsaklarına yerleşir (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Oval yapıdaki oocystler, 21-42 x 16-30 (ortalama 29-31 x 21-23) µm büyüklüğündedir. Oocyst duvarı tek katlı ve sarımsı renkte olup bazılarında kısmen pürüzlüdür (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Mikropil, oocyst ile sporocyst kalıntısı yokken 1 kutup granülü mevcuttur (Levine, 1985).

Uzun, oval şekle sahip sporocystler 15-19 x 8-9 µm büyüklüğünde ve stieda cisimciğine sahiptir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Sporozoitler 19 x 4 µm ölçülerinde, belirgin ve saydam bir refraktil globüle sahiptir. Sporlanma süresi 30 saat-2 gün arasında değişir (Levine, 1985).

E. maxima oocystleri sporlanma sürecinde yıkımlanabilir. Bunun, mekanik ve fiziksel hasarlara bağlı olarak kimyasal ajanların oocyst duvarından rahatça geçmesi nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Potasyum bikromat solüsyonu

bazen oocystlerin %50-90'ında yıkımlanmaya neden olabilmekte, bazen sporlanacak tek bir oocyst bile kalmamaktadır (Pellérdy, 1974).

Yaşam Döngüsü: Etken, ince bağırsakların tamamında yerleşim gösterse de özellikle duodenum epitel hücrelerini tercih eder. Merontlar genellikle hücre çekirdeğinin üzerinde, eşeyli gelişim evreleri ise çekirdeğin altında yer alırlar. Etkenin bulunduğu epitel hücre genişler, subepitelyal bir pozisyon almış gibi görünür ve çekirdeği hipertrofiye uğrar. Villusların epitel hücrelerine penetre olan sporozoitler, burada ya da daha sonra lamina propriada iken, makrofajlar tarafından fagosite edilerek bağırsak bezlerine taşınır (Kheysin, 1972; Pellérdy, 1974).

Merogoni 3 nesil tekrarlanır. Yirmibeş-50 merozoit içeren ilk nesil merontlar inokulasyonu takiben 48 saat içerisinde, duodenumdaki derin yerleşimli bezlerin epitel hücreleri içerisinde gözlenir. İkinci nesil merontlar ince bağırsak villuslarını örten epitel hücrelerinde, Lieberkühn kriptlerinin açılım bölgesine yakın konumda yer alır. İnokulasyonun 3. gününde ortaya çıkar ve yaklaşık 12 merozoit içerirler. Üçüncü nesil merontlar ise inokulasyonun 4. gününden itibaren ince bağırsaklardaki yüzeysel villusların yan kısımlarında ve bazen de uçlarında görülür ve yaklaşık 12 merozoit içerirler (Levine, 1985).

Granüler sitoplazmaya sahip olan mikrogametositler 30-48 x 22-33 µm'lik büyüklükleri ile bir oocyst büyüklüğünde hatta daha da büyüktür. Mikrogametler ise 4,5-12 µm uzunluğunda olup, enfeksiyonun 120. saatlerinde görülür. Makrogametler granüler sitoplazmalı ve olgunlaştıklarında 22-27 x 16-18 µm boyutlarındadır. İlk oocyst atılımı 120-121. saatlerde, çoğunluğunun atılımı ise 123-136. saatlerde gerçekleşir. Patent süre yalnızca birkaç gündür (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Patojenite: *Eimeria maxima* az ya da ılımlı patojen bir tür olarak tanımlanmaktadır. Eşeysiz gelişme dönemleri sınırlı düzeyde hasara neden olurken, eşeyli gelişme dönemleri ciddi hasarlara neden olur. Suşlar arasında patojenite farklılığı gözlenir (Levine, 1985).

Etken, şiddetli hastalık tablosu oluşturduğu durumlarda sadece gençleri değil daha yaşlı tavukları da etkiler ve bazılarında ölümlere yol açabilir (Pellérdy, 1974).

Klinik bulgular: Diğer kanatlı *Eimeria* etkenlerine benzer şekilde, *E. maxima* enfeksiyonlarında da iştah azalması, kilo kaybı, kas atrofisi, ara sıra ishal veya konstipasyon oluşumu, dışkıda kan görülmesi ve anemi gibi semptomlar görülür (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977).

Patolojik Lezyonlar: Genellikle ince bağırsakların orta kısımında görülen lezyonlar, bazen etkilenmeyen kısımlardan keskin bir sınırla ayrılır. Bağırsak şişmiş, duvarı kalınlaşmış ve hiperemiktir. Mukozada peteşiyel kanamalara bağlı olarak içerik sulu ve kırmızımsı renktedir (Pellérdy, 1974).

Etkenin patojenitesi primer olarak çok sayıdaki büyük gametositlerinin varlığına bağlı olduğundan, hasarlı mukozanın mikroskobisinde çok sayıda mikrogametosit, makrogametosit, olgun ve olgunlaşmamış oocyst görülür. Genellikle villusların uç kısımlarında bulunan küçük yapılı merontlar şiddetli lezyonlara neden olmaz (Pellérdy, 1974).

E. maxima nedenli enfeksiyonlar kural olarak kısa sürelidir. Lezyonlar oluşur oluşmaz kaybolmaya başlar ve iyileşen hayvanlar kısa sürede toparlanır (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

1.5.5. *Eimeria mitis* Tyzzer, 1929
(Sinonim: *Eimeria beachi*)

İnce bağırsakların öncelikle posterior kısmında olmak üzere tamamında hatta sekumun tubuler bölümünde de gözlenebilen, dünyada yaygın olarak karşılaşılan bir türdür (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Yuvarlak ya da yuvarlağa yakın şekilli, 10-21 x 9-18 (ortalama 16 x 13-16) µm büyüklüğündeki oocystler düzgün yapıda, renksiz duvara sahiptir. Mikropil, oocyst ve sporocyst kalıntısı bulunmazken kutup granülü mevcuttur. Oval şekilli sporocystler 10 x 6 µm büyüklüğünde olup stieda cisimciğine sahiptir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Sporlanma 18 saat-2 gün arasında gerçekleşir (Levine, 1985).

Yaşam Döngüsü: Etkene ince bağırsakların anterior kısmında genellikle villus epitel hücrelerinde olmakla birlikte arasıra Liberkühn bezlerinde de rastlanılır. Merogoni sayısı bilinmemektedir. Olgun merontlarına villus epitelinde, hücre çekirdeğinin altında rastlanır. Enfeksiyonun 4. gününde merontlardan 6-24, belki daha fazla sayıda 5-1,5 µm uzunluğunda, yarımay şeklinde merozoitler açığa çıkar (Kheysin, 1972; Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Gametositler ince bağırsakların daha posteriorunda lokalize olur. Enfeksiyonun 120. saatinde yığınlar halinde epitel hücrelerinde supranüklear yerleşmiş olarak görülürler. Mikrogamatositler 9-14 µm büyüklüğündedir. Makrogametositler ise biraz daha büyüktür ve eozinofilik “plastik” granülleri çevrelerler (Pellérdy, 1974). Prepatent süre 4-5 gün (Kheysin, 1972; Levine, 1985), patent süre ise 10 gündür (Levine, 1985).

Patojenite: Daha önce patojen olmayan bir tür olarak tanımlanmakta iken, yapılan çalışmalar sonucunda hafif patojen bir tür olduğu anlaşılmıştır (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977).

1.5.6. *Eimeria mivati* Edgar ve Seibold, 1964

Dünyada oldukça yaygın olarak karşılaşılan bu tür başlıca ince bağırsakların ön bölümü olmak üzere, ince bağırsakların tamamında ve de kalın bağırsaklarda yerleşir. Bu türün geçerliliğine şüphe ile yaklaşılmaktadır (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Elipsoid ya da oval yapıdaki oocystler 11-20 x 12-17 (ortalama 16 x 13) µm ölçülerindedir. Düzgün yapılı, renksiz oocyst duvarı 0.4 µm kalınlığında ve tek katmandan oluşur. Oocystlerde mikropil ve yarıya yakınında kutup granülü bulunurken, oocyst kalıntısı yoktur. Uzun, oval yapıdaki sporocystler 7-12 x 5-6 µm büyüklüğündedir. Küçük bir stieda cisimciği taşıyan sporocystler, 2-3 µm'lik bir sporocyst kalıntısını çevreler (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Sporlanma 29 °C'de 11-12 saat sürer (Pellérdy, 1974).

Yaşam Döngüsü: Kursak, ön mide ve taşlıkta açığa çıkan sporozoitler, ince bağırsakların ilk üçte birlik bölümündeki bez ve kriptleri örten derin yerleşimli epitel hücrelerine girer. Daha sonra hücre çekirdeğinin üstünde yuvarlaklaşır ve 1. nesil merontları oluştururlar. İnokulasyondan sonraki 36. saatte olgunlaşmalarını tamamlayan 9-14 µm çapındaki bu merontlar, 10-30 adet 9-11 x 2 µm büyüklüğünde merozoit içerir. Merozoitler serbest kaldıklarında kriptlerde ve villusların tabanında yer alan epitel hücrelerini istila eder ve yine konak çekirdeğinin üstünde yerleşir. İnokulasyon sonrası 55-67. saatlerde olgunlaşan 2. nesil merontlar 5-11 x 4-8 µm ölçülerinde olup, 16-20 adet 6-9 x 1 µm büyüklüğünde merozoit içerir. İkinci nesil merontlardan açığa çıkan merozoitler başta duodenum olmak üzere ileum, sekumlar ve rektumda villus epitel

hücrelerine girer ve çekirdeğinin hem üstünde hem de altında yer alır. İnokulasyonu takiben 80. saatte olgunlaşmalarını tamamlayan 3. nesil merontlar, 6-8 x 4-7 µm ölçülerinde olup, 6-7 x 1 µm boyutlarında 10-14 merozoit içerir. Üçüncü nesil merontlardan serbest kalan merozoitlerin bir bölümü, 3. nesil merontların yerleşim bölgesindeki hücreler içerisine girerek 4. nesil merontları oluşturmak üzere gelişmelerini sürdürür. İnokulasyondan sonraki 96-168. saatlerde olgunlaşan 10-17 x 10-13 µm ölçülerindeki 4. nesil merontlar, 7-10 x 1-2 µm boyutlarında 16-20 merozoit içerir (Kheysin, 1972; Levine, 1985).

Üçüncü nesil merontların dağılmasıyla açığa çıkan merozoitlerin bir bölümü ile 4. nesil merontlardan açığa çıkan merozoitlerin tümü, duodenumdan rektuma kadar bağırsak kanalını örten tüm epitel hücreleri içerisine girer ve gametositleri oluşturur. İnokulasyondan sonraki 93-120. saatlerde olgunlaşmalarını tamamlayan mikrogametositler, 10-16 x 9-15 µm ölçülerindedir ve 2-4 µm uzunluğunda 50-100 mikrogamet içerir. Olgun oocystler inokulasyonun 93-96. saatlerinde görülür. Prepatent süre yaklaşık 4-5 gün, patent süre ise 6-12 gün arasında değişir (Levine, 1985).

Patojenite: *Eimeria mivati*, *E. acervulina*'ya kıyasla daha patojen bir tür olmasına karşın hafif enfeksiyonları patojenik özellik taşımaz ve şiddetli enfeksiyonlarında da ölüm oranı %10'u aşmaz (Levine, 1985).

1.5.7. *E. necatrix* Johnson, 1930

Dünyada yaygın olarak karşılaşılan bir türdür. Birinci ve 2. nesil merontlarına ince bağırsaklarda; 3. nesil meront, gametosit ve gametlerine ise sekumlarda rastlanılır (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Uzun, oval yapıdaki oocystler, 12-29 x 11-24 µm büyüklüğündedir. Oocyst duvarı renksiz, ince ve düzgün yapıdadır. Mikropil, oocyst ve sporocyst kalıntısı bulunmazken 1 kutup granülü mevcuttur. Uzun, oval yapılı, 9-15 x 4,5-7,5 µm ölçülerindeki sporocystlerde stieda cisimciği vardır (Pellérdy, 1974). Sporozoitler virgül benzeri şekilde, 7,9-11,3 x 1,3-2,1 µm büyüklüğünde olup refraktril bir globülü çevreler (Pellérdy, 1974). Sporlanma süresi 18 saat ile 2 gün arasında değişir (Levine, 1985).

Yaşam Döngüsü: Enfeksiyondan 6 saat sonra ince bağırsakların lumeninde serbest sporozoitlere rastlanılır. Burada epitel hücreleri içerisine giren ve epitel katmanını aşan sporozoitler 12 saatte lamina propriaya (LP) ya da villus merkezine ulaşır, ardından mukozanın kas katmanına göç eder. Bu göç esnasında çoğu makrofajlar tarafından yutularak fundus epitel hücrelerine taşınır. Makrofajlar bu süreç sırasında veya sonrasında parçalanır ve sporozoitler hasar görmemiş halde açığa çıkıp 1. nesil merontları oluşturmak üzere gelişmelerini sürdürür (Pellérdy, 1974, Levine, 1985).

Birinci ve 2. nesil merontlar fundus bezlerinin epitel hücrelerinde, konak çekirdeğinin üstünde konumlanır. Enfeksiyonun 36. saatinde görülebilen 1. nesil merontlar 17,1 x 12,9 µm büyüklüğünde olup 48 merozoit içerir. Muz benzeri şekle sahip 1. nesil merozoitler inokulasyondan 2,5-3 gün sonra serbest kalır ve yakındaki epitel hücrelerini istila ederek 39-66 x 33-54 µm ölçülerinde, öncekilerden daha büyük 2. nesil merontları oluşturmak üzere gelişmelerini sürdürür. Konak hücresinde belirgin bir şişkinliğe neden olan 2. nesil merontların dağılması ile 8-11 x 1,5-2 µm büyüklüğündeki toplam 32-132 merozoit açığa çıkar. Bu olay genellikle inokulasyon sonrası 5-8. günler arasında gerçekleşmekle birlikte 23. güne kadar uzayabilir. İkinci nesil merozoitler sekuma geçerek epitel hücreleri içerisine girer ve konak çekirdeği altında konumlanarak 3. nesil merontları oluşturur. İkinci nesil merozoitlerin büyük bölümü yüzeysel epitel hücrelerini, bazıları ise derin bez epitel hücrelerini istila eder. Üçüncü nesil

merontlar oldukça küçük olup yalnızca 6-16 merozoit içerir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Üçüncü nesil merozoitlerin tamamı ve 2. nesil merozoitlerin bir bölümü, sekum mukozasını örten sağlam epitel hücrelerine girerek konak çekirdeği altında yerleşir ve farklılaşarak gametositleri oluşturur. Gametositler, konak hücrenin şişkinleşmesine ya da yer değişimine neden olur. Makrogametosit 13,1 x 12,6 µm, mikrogametosit ise 12,5 x 14,3 µm büyüklüğündedir. Prepatent süre 6-7 gün, patent süre ise yaklaşık 12 gündür (Levine, 1985).

Patojenite: *Eimeria necatrix*, *E. tenella*'nın ardından tavuklarda en patojen ikinci türdür. Ancak, anticoccidial bileşiklerin kullanılmaya başlanması ile birlikte *E. tenella* enfeksiyonlarının önemi azalmış, *E. necatrix* enfeksiyonlarına bağlı kayıplar ise artmıştır (Levine, 1985).

E. necatrix enfeksiyonları ya ölümle sonuçlanan akut olgular ya da hemorajik lezyonların gelişimine olanak sağlayacak şekilde yavaş ilerleyen kronik hastalık tablosu şeklinde görülür. Kronik seyrin nedeni etken gelişiminin yavaş ilerlemesi değil, yoğun nedbe dokusu oluşumuna bağlı olarak hastalık etkilerinin daha kalıcı olmasıdır. Bağırsaklarda bez dokusunun yıkımlanarak kalıcı nedbe dokusunun oluşması, beraberinde kaçınılmaz olarak fizyolojik işlevlerde kalıcı aksamayı getirir (Davies ve ark., 1963; Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Klinik Bulgular: Etken, özellikle 5-7 haftalık tavukları etkilemekle birlikte, bir günlük civcivlerin bile hastalığa duyarlı oldukları deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur. Hastalığın akut formunda klinik tablo az ya da çok belirgindir. Dışkı sulu olup kanlı ya da kırmızımsı renktedir. Bağırsaktaki kanamalar sekal coccidiosisde olduğu kadar yoğun değildir. Tavuklar bitkin, kanatları düşmüş, kamburlaşmış ve uyuşuk görünümdedir. Bu görünümleri günlerce sürebilir ve eğer enfeksiyon şiddetli ise 5-7. günlerde ölüm gözlenebilir (Pellérdy, 1974).

Patolojik Lezyonlar: Yangısal değişiklikler ince bağırsakların özellikle orta 1/3'lük bölümünde belirgin olmakla birlikte, enfeksiyonun şiddetli olduğu durumlarda tüm bağırsak boyunca gözlenebilir. İnokulasyondan sonraki 4. günde, ince bağırsaklarda mat beyaz renkte, çapı 1 mm'yi aşmayan küçük odaklar görülür. Mukoza katmanının derinlerinde yer alan ve 2. nesil meront kümelerinden oluşan bu odaklar derin yerleşimli olduklarından bağırsakların seroza yüzeyinden bile rahatlıkla fark edilir (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977; Levine, 1985). Hastalığın 5-6. günlerinde şiddetli kanama ortaya çıkar. Bağırsak duvarı kırmızı renkte, şişkin olup değişiklikler tüm serozadan da görülebilir. Bağırsak içeriği kırmızı renktedir. Kan ve fibrin pıhtıları içerebilir. Bazen bağırsak lumeni fibrinli, kanlı pıhtı ile tıkanmış görülebilir. Enfeksiyona bağlı olarak, bağırsak duvarı kalınlaşmış; kasılma yeteneğini kaybetmesine bağlı da içeriği katılaşmış olabilir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Bağırsak kaslarındaki çözünmenin, parazit istilasına uğrayarak yıkımlanan bezlerden salınan sindirim enzimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bazen de 2. nesil merozoitleri içeren merontlara bağlı, ince bağırsakların tamamında peteşilyel kanamalar gözlenebilir (Davies ve ark., 1963).

Gametositler sekumda yerleşim gösterdiklerinden, sekumda kataral yangı gelişebilir ancak şiddetli olmadığı gibi buna bağlı hemoraji ya hiç yoktur ya da oldukça seyrektir (Pellérdy, 1974).

Mikroskobik bakıda, yangı hücrelerinin yıkımlanan mukozayı kapladığı görülür. İnce bağırsaklardaki epitel hücre değişimi, bölümden bölüme değişiklik gösterir. Şiddetli enfeksiyonlarda duodenum mukozasında kalınlaşma, bezlerde kistik değişim (özellikle posterior segmentte, bağırsağın orta 1/3'lük kısmında) görülür. Bazen, mukoza epiteli glandular yapısını kaybeder ve hücre kümeleşmeleri görülür. Lezyonlar özellikle 2. nesil merontların serbest kalması ile daha şiddetlenir. Genişlemiş, nekrotize olmuş epitel hücrelerinin etrafında şiddetli hemoraji odakları vardır. Rejenerasyon enfeksiyonun 6. günü başlar. Hasarlı

alandaki fibrin ve ölü hücreler, fibrositler tarafından ortadan kaldırılır. Devamında ya bağ doku üremesi ile iyileşme ya da sekonder bakteriyel komplikasyona bağlı nekrotitis şekillenir (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977; Levine, 1985).

1.5.8. *Eimeria praecox* Johnson, 1930

Dünyada yaygın olan bu tür, ince bağırsakların ön 1/3'lük bölümüne yerleşir (Levine, 1985).

Oocyst Morfolojisi: Küremsi ya da oval biçimdeki oocystler 20-25 x 16-20 (ortalama 21 x 17) µm büyüklüğündedir. İki katmanlı duvar, düzgün yapılı ve renksizdir. Mikropil, oocyst ve sporocyst kalıntısı bulunmazken, sporlanmış oocystlerde kutup granülüne rastlanır. Sporlanma 24 saatte tamamlanır (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

Yaşam Döngüsü: Sporozoitler enfeksiyonun 16. saatinde ön ince bağırsakta özellikle de duodenal kısımdaki yüzeysel epitel hücrelere penetre olur, sonra da lamina propriaya ulaşır. Merogoni sayısı 3 ya da 4 olarak belirtilmiştir. İkinci nesil merontlar inokulasyondan sonraki 32. saatte gözlenebilir. İkinci merogoni sonrasında biyolojik gelişme düzenli bir seyir izlemez ve eşeysiz ile eşeyli gelişme dönemleri birarada bulunur. Prepatent dönem 2,5-4 gün, patent dönem ise yaklaşık 4 gün sürer (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

1.5.9. *Eimeria tenella* (Railliet and Lucet, 1891) Fantham, 1909 (Sinonim: *Eimeria avium, E. bracheti, Coccidium tenellum, C. globosum*)

Tüm dünyada yaygın bir tür olup, tavukların kör bağırsaklarına (sekum) yerleşir (Levine, 1985).

Oocyct Morfolojisi: Oval şekle sahip oocystler 14-31 x 9-25 µm büyüklüğüne sahiptir. Düzgün yapıdaki oocsyt duvarı 1-1,5 µm kalınlığındadır. Mikropil, oocyst ya da sporocyst kalıntısı bulunmaz. Sporlanmış oocystlerin çoğunda kutup granülü vardır. Sporocystler, 7-11 µm uzunluğundadır ve uç kısımlarında stieda cisimciği mevcuttur. Virgül şeklindeki sporozoitler 9-10 µm uzunluğundadır. Sporlanma süresi 18 saat ile 2 gün arasında değişir (Pellérdy, 1974; Levine, 1985). Prepatent süresi 6 gün (Levine, 1985), patent süresi ise 10 gün kadardır (Kheysin, 1972).

Yaşam Döngüsü: Sindirim kanalına alınan oocsytler 1-2 saat içinde ekskistasyon geçirirler Ekskistasyonda pankreatik salgının önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Kursakta gerçekleşen mekanik etki de diğer önemli bir faktördür. Oocyst duvarının parçalanması ile sporocystler ve sonrasında da sporozoitler açığa çıkar. Ekskistasyon gerçekleşmeyen oocystler sporlanmış halde dışkı ile atılır ve diğer tavuklar için enfeksiyon kaynağı oluşturur (Pellérdy, 1974).

Bağırsaklarda açığa çıkan sporozoitler 12,8 µm uzunluğunda; hafifçe bükük, orak benzeri şekle sahiptir. Sekumların yüzeysel epitel hücrelerini istila eden sporozoitler, bazal membranı delerek tunica propria (TP) katmanına ulaşır. Makrofajlar içerisinde veya serbest halde bu katmanı da aşan sporozoitler, fundus bezlerinin epitel hücreleri içerisine yerleşir (Levine, 1985).

Sporozoitlerin büyük çoğunluğu sekal mukozaya penetre olsa da, bir kısmı da sekal açıklığın çeşitli bölümlerine penetre olur. Sekumu çıkarılmış tavuklarda yapılan bir çalışmada, sporozoitlerin daha sonra da merozoitlerin özellikle kolonlar olmak üzere sekumlara yakın ince bağırsak bölümleri ve bursa fabriciusta oluştukları belirlenmiştir. Rektal mukozaya da belli sayıda etkenin yerleştiği bilinmektedir. Endojen siklusun hepsi bu lokalizasyonlarda

gerçekleşmekte ve enfeksiyonun şiddetine bağlı olarak mukoz membranlarda yangısal değişiklikler ve peteşiyal kanamalar görülmektedir (Pellérdy, 1974).

Enfeksiyonun ilk 24-48 saati içerisinde sekum bezlerinin kript tabanında yaklaşık 24 x 17 µm ölçülerindeki 1. nesil merontlar gelişir. Her bir meront 900 kadar merozoit içerir. Enfekte konak hücre genişler, çekirdek normal büyüklüğünün beş katına ulaşacak derecede hipertrofiye uğrar ve sonuçta hücre sekum bezi lumenine doğru çıkıntı yapar. Oocyst alımından 60-72 saat sonra, 2-4 x 1,15 µm ölçülerindeki oldukça küçük, orak benzeri merozoitler sekal lumende görülür (Pellérdy, 1974; Levine, 1985).

İkinci nesil merontların büyük bir kısmı, enfeksiyonun 4-5. günlerinde ortaya çıkar. İlk nesil merontlardan büyük olan bu merontlar 21-30 µm'den 50-55 µm büyüklüğüne kadar ulaşabilir. Konak hücre meront büyüdükçe inanılmaz şekilde genişler ve parazit hücreye sığmayacak ölçüde büyüdüğünde, konak hücre epitel altına baskı yapar. Çok sayıda 2. nesil merontun eşzamanlı dağılması kanama şekillenmesine neden olur. Bu merontlardan 16 µm uzunluğunda çok sayıda merozoit ortaya çıkar. Sekal içerikte çok sayıda bulunan ikinci nesil merozitlerin bir kısmı eradike edilirken, çoğunluğu yeni epitel hücrelere girerek 3. nesil merontları ya da gametositleri oluşturur. Üçüncü nesil merontlar subnüklear yerleşim gösterir. Büyüklükleri 9 x 7,6 µm olup bunlardan 4-30 adet, 6,8 x 1 µm büyüklüğünde merozoit açığa çıkar. Konağın verdiği savunma tepkisi 3. nesil merogonide 2. nesile kıyasla daha hafif olduğundan, hücreler epitel katmanından ayrılmaz. Merogoninin 3 nesilden daha fazla tekrarlandığı düşünülmektedir (Péllerdy, 1974).

İkinci nesil merozoitlerin bir kısmı istila ettikleri epitel hücrelerinde, yaklaşık 12,4 x 8,7 µm büyüklüğündeki mikrogametositleri ve oocyst büyüklüğündeki makrogametositleri oluşturmak üzere farklılaşır (Davies ve ark., 1963). Gametogoni mukozal ve submukozal epitel hücrelerde, enfeksiyonun 6.

gününde gerçekleşirken oocyst atılımı ise 7. günde başlar (Pellérdy, 1974). Patent süre 10 gün olarak bildirilmiştir (Kheysin, 1972).

Patojenite: Tavuk *Eimeria* etkenleri arasında en patojen tür olan *E. tenella* sekum coccidiosisine neden olmaktadır. Özellikle genç hayvanlarda gözlenirse de günlük civcivlerde de hastalık oluşturabilmektedir. Hayvanların sekum coccidiosisine duyarlılığı 4 haftalık yaşta iken en fazla olup, 1-2 haftalık civcivler daha dirençli kabul edilir. Yaşlı hayvanlarda ise daha önce geçirmiş oldukları enfeksiyonlara bağlı olarak bağışıklık gelişir (Levine, 1985).

Hayvanların aldıkları oocyst dozu, suş patojenitesi, hayvan ırkı ve yaşı, konağın beslenme durumu, coccidiosis ile eşzamanlı olarak bulunan diğer hastalık etkenleri ve stres etkenlerinin varlığına bağlı olarak *E. tenella* enfeksiyonlarının seyri, belli belirsiz hafif enfeksiyonlardan akut ve yüksek ölüm oranlı enfeksiyonlara değin değişir (Levine, 1985). Şiddetli enfeksiyonlarda eğer hayvanlar gençse tüm sürü ölebilir. Hafif bir enfeksiyon tablosu olduğunda ise ekonomik kayıplar dikkat çekecek boyuttadır (Pellérdy, 1974).

Klinik Bulgular: Sekum coccidiosisi şiddetli kanlı ishal ile tanınan akut seyirli bir hastalık şekli olup, klinik bulgular ilk olarak 2. nesil merontların büyümesine bağlı olarak sekum lumenine kan sızması ile ortaya çıkar (Levine, 1985).

İkinci nesil merontların hızla büyüdüğü enfeksiyonun 4. gününde, olgunlaşan ya da merozoit salınımı yapan bu merontlara bağlı olarak sekal duvarda şiddetli kapillar kanamalar şekillenir ve dışkıda kan görülür. Hayvanlarda anorexia, kanatlarda düşme, haraketsizlik, yem tüketiminde azalmaya karşın su tüketiminde artış gözlenir (Pellérdy, 1974; Ruff ve Reid, 1977).

Yoğun bir enfeksiyonun ardından, 5-6. günlerde hayvanlar sadece yavaşça hareket eder. Sporadik ölümler görülebilir ki bu ölümler bir salgının

habercisi olabilir. Dışkılar suludur ve akut olmayan olgularda dışkı sarı renkli olup daha sonra çikolata kahve ya da kırmızı renge döner. Tüyler kloaka etrafında yapışmıştır ve kloaka kirli kırmızı bir renktedir (Pellérdy, 1974).

Mortalite enfeksiyonun 4-8. günlerinde pik yapar. Bazen ölüm yoğun bağırsak kanamasını takip eder. Ölüm şekillenmeyen olgularda hayvanlar günlerce hastadır. Bacaklarda güçsüzlük hatta paraliz şekillenir, kan kaybına bağlı olarak mukozalarda ve ibikte soluklaşma görülür (Pellérdy, 1974).

Canlı kalmayı başaran hayvanlarda, kanamanın şiddetini yitirmesi ile birlikte 7. günde dışkı ile oocyst atımı başlar. Dışkı ile atılan oocyst sayısı 8-9. günlerde en yüksek düzeye ulaştıktan sonra kısa sürede azalır. Hastalığın 8-9. günlerine kadar hayatta kalmayı başaran hayvanlar genellikle iyileşir (Levine, 1985).

Patolojik Lezyonlar: Hastalığın şiddetine göre değişen lezyonlar sekum ve yakınındaki bağırsak alanlarına lokalizedir. İkinci nesil merontların olgunlaşmasıyla birlikte, doku hasarı ve kanama şiddeti en üst düzeye ulaşır. İnokulasyondan sonraki 4. günde LP katmanında eozinofil sızıntısı, belirgin kan birikimi, sekum duvarında kalınlaşma, epitel katmanında dökülme ve lumende etkenler, kan ve dökülmüş doku hücrelerinin karışımından oluşan içerik gözlenir. Sekum mukozası boyunca kanamalar göze çarpar (Levine, 1985). Sekum coccidiosisinde kan pıhtılaşmasının aksamaya uğradığı tahmin edilmektedir (Davies ve ark., 1963). Enfeksiyon şiddetli ise hemorajik lezyonlar sekal açıklıklara yakın kalın bağırsak bölümlerine doğru yayılır (Pellérdy, 1974). Beşinci günde epitel hücre dökülmesi daha da yoğundur, lumende fazla miktarda kan bulunur. Kanama miktarı 6. günde daha da artar ve sekum içeriği yoğun bir kitle oluşturacak şekilde birleşir. Başlangıçta sekum mukozasına sıkıca bağlı olan bu kitle zamanla gevşer ve lumende serbest halde bulunur (Levine, 1985).

Beşinci-6. günlerde mukozadan alınan kazıntılarda ve sekal içerik numunelerinde meront ve merozoit yığınları mikroskobik olarak görülebilir. Gametosit ve oocystlere ise 6-7. günlerde rastlanır (Pellérdy, 1974). Oocyst oluşumuna bağlı olarak, oldukça kalınlaşmış olan sekum duvarının rengi kırmızıdan benekli kırmızıya veya süt beyazına döner. Lumende yer alan kitlenin rengi başlangıçta kırmızımsı iken zamanla sarımsı ve nihayetinde beyazımsı olur. Kitle eğer yeterince küçükse parçalanmadan, genelde ise ufak parçalar halinde dışkı ile atılır. Devamında mukozalarda aşamalı olarak rejenerasyon şekillenir ve sekal duvar normal şekline döner. Kazeöz yapılar seyrek olarak yerinde kalır. Yangısal reaksiyon bazen ilerler ve adheziv peritonitis şekillenebilir ki bu durumda sekal ruptur da oluşabilir (Pellérdy, 1974, Levine, 1985).

Mikroskobik incelemelerde 2. nesil merontların lamina propriaya kadar derine ilerleyebildiği belirlenmiştir. Bunların çevresinde şiddetli bir hücresel bağışıklık reaksiyonu gelişir; eozinofiller, lenfoid hücreler, plazma hücreleri ve dev hücre infiltrasyonu görülür. Yangısal reaksiyona bağlı bağırsak duvarı kalınlaşır, kapillar hemorajiler şiddetli bir doku yıkımı olduğuna işaret eder. Mukoza epiteli birçok alanda ayrılır ve yıkımlanan hücreler intestinal içerikte yüzer. İkinci nesil merontların varlığında ve bunlardan merozoitler açığa çıktığında, epitel dökülmesi en yüksek seviyededir. Rejenerasyon çok sayıda dev hücrelerin ortaya çıkması ve fibröz dokunun artması ile başlar. Bağırsak içeriğinin mekanik hareketine bağlı olarak epitel onarımı yavaşça şekillenir. Büyük lezyonlarda ise fibrozisle iyileşme görülür (Pellérdy, 1974).

Hafif seyirli enfeksiyonlarda epitel katmanı tamamen yenilenebilmesine karşın şiddetli olgularda yenilenme kısmen gerçekleşir. Gelişen yangısal tepkime oldukça şiddetli olup yaygın lenfosit ve plazma hücresi ile az sayıda dev hücresi infiltrasyonu gözlenir. Bağdokuda artış ve bezler arasında yer alan epitel dokunun yenilenmemesine bağlı olarak yangısal evrede bez kasılması sonucu kist oluşumu gözlenir. Şiddetli kanamalar anemiye neden olur. İyileşen

hayvanlarda geçirilmiş olan şiddetli enfeksiyonun olumsuz etkileri uzun süre ve hatta daimi olarak hissedilebilir (Levine, 1985).

1.6. Korunma ve Kontrol

1.6.1. Sürü İdaresi

Coccidiosis etkenlerinin her yerde bulunmaları, kümes içinde kolayca yayılmaları ve yüksek üreme potansiyeline sahip olmaları gibi nedenlerle entansif tavuk işletmelerinde *Eimeria* etkenlerinden ari olarak yetiştiricilik yapılması mümkün değildir (Williams, 1998).

Monoksen bir hayat siklusuna sahip olan *Eimeria* etkenlerinin kümesler arasında yayılmasında mekanik nakil önem taşır. İklim şartlarına ve dezenfektanlara karşı dirençli olan oocystler, toprakta haftalarca hatta aylarca canlı kalabilirken, fermentasyon ya da dışkı kaynaklı amonyak nedeniyle oluşan sıcaklığa maruz kaldıklarında ise birkaç gün içinde canlılıklarını yitirirler (Morris ve Gasser, 2006).

Anticoccidial ilaçların keşfinden önce, hastalığın kontrolü amacıyla kümes altlığının değişimi ve dezenfeksiyon programları kullanılmıştır. Ancak oocystlerin dezenfektanlara karşı dirençli olmaları ve altlık değişse bile enfeksiyon başlatacak düzeyde oocyst kalması nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Hayvanların yerde yetiştirilmesindense ızgaralı kafeslerin kullanımı çözüm olarak denenmiş ve oocyst alımını azaltmıştır. Ancak bu sefer, hayvanların göğüs bölgesinde yaralar oluşması, dışkının ya da ölü hayvanların çıkarılmasının zorluğu ve maddi nedenlerle ızgaralı kafesler kullanım alanı bulamamıştır (Ruff ve Reid, 1977).

Oocystlerin mekanik naklini engellemek için hijyen kurallarına önem verilmelidir. Kümesler arası geçişlerde kıyafetlerin değiştirilmesi ve botların yıkanması, rodentlerin ve artropodların eradikasyonu gibi önlemler alınmalıdır. Çiftlik idaresi etkili bir şekilde yürütülmeli, örneğin altlığa su dökülme oranını azaltan nipel sulukların kullanımı ve oocystlerin sporlanmasını olumsuz etkileyen kurutma işlemi gibi teknik konulara dikkat edilmelidir (Allen ve Fetterer, 2002; Morris ve Gasser, 2006).

1.6.2. Anticoccidial Uygulaması

Modern, ticari kanatlı sektörünün gelişiminde anticoccidial ilaçların kullanımı büyük öneme sahiptir. Koruyucu tedavi olmaksızın, çok sayıda hayvanın bir arada bulunduğu entansif yetiştiriciliğin yapılmasına imkansız gözüyle bakılmaktadır. (Chapman, 1997).

Kemoterapi coccidiosis kontrolünde temel uygulamadır. Bir kümeste coccidiosise bağlı klinik bulguların ortaya çıkması beklenip kimyasal maddeler kullanılırsa, hastalığa bağlı morbidite ve mortalite artacak dolayısıyla ekonomik zarar da büyük olacaktır. Bu nedenle anticoccidial ilaçlar temel olarak korunma amacıyla kullanılmaktadır. Ticari entansif tavuk işletmelerinin neredeyse hepsi bu nedenlerle profilaksi amaçlı anticoccidial ilaç kullanmaktadır. Koruyucu dozda verilen bu ilaçlar *Eimeria* türlerinin hayat sikluslarını daha az sayıda oocyst üretimi ile tamamlamalarına olanak sağlar. Böylece de gelişen subklinik enfeksiyon hayvanlarda güçlü, spesifik ve doğal bağışıklığın gelişmesine yol açar (McDougald, 2003).

İngiltere'de 2000 yılından itibaren yılda 230 tondan fazla anticoccidial ilacın satıldığı bildirilmiştir. Ticari olarak satışa sunulan bir ilaca karşı kısa sürede direnç gelişmekte ayrıca tavuk ürünlerinde ilaç kalıntısı varlığına ilişkin endişeler

kemoterapotik ilaçların kullanımını etkilemektedir. İlgili kanunlar giderek ilaç kullanım süresi ve kullanılabilir kimyasal sayısını kısıtlamaktadır. Örneğin, 2002 yılında İngiltere'de 17 kimyasal gruptan elde edilen anticoccidial ajanlar kullanılmakta iken, 2004 yılında bu sayı 10'a düşürülmüştür (Shirley ve ark, 2007).

Anticoccidial ajanlar kanatlı sektörünün son 50 yıllık gelişiminde önemli bir rol oynamış ve tüketiciye yüksek kalitede ürün sunulmasına olanak sağlamıştır. Kullanılan bu anticoccidial ajanlar parazitin metabolizmasına etki edenler (amprolium, clopidol, decoquinate, halofuginone gibi) ve iyon taşınmasını, ozmotik basıncı bozanlar (monensin, lasalocid, salinomycin, narasin, maduramycin gibi polieter iyonoforlar) olmak üzere 2 grupta sınıflandırılabilir. Günümüzde coccidiosis kontrolü temel olarak polieter iyonoforların kullanımına dayanmaktadır (Jeffers, 1997).

İyonoforlar dahil tüm anticoccidial ajanlara karşı değişen derecelerde direnç geliştiği bilinmektedir (Ruff ve Danforth, 1966; Chapman, 1994; Chapman, 1998). Bu direncin etkilerini minimum seviyeye indirmek için kanatlı hayvan üreticileri farklı kimyasal ajanların rotasyonla kullanılması, kimyasal maddelerle iyonoforların kullanılması ya da bir yetiştirme periyodunda shuttle programının uygulanması gibi yöntemleri kullanmaktadır. Bu programların uygulanması mevsimsel koşullara ve *Eimeria* etkenlerinin prevalansına bağlıdır (Williams, 1998). Son yıllarda firmalar yeni anticoccidial maddelerin geliştirilmesi üzerinde eskisi gibi yoğun çalışmamaktadır. Bununla birlikte, sporozoit mannitol siklus enzimleri ve trofozoit histon deacetylase gibi iki yeni potansiyel madde belirlenmiştir ve bunlar üzerinde çalışılmaya devam edilmektedir (Schmatz, 1997).

1.6.3. Aşılama

Kanatlı *Eimeria* etkenleri, oldukça immunojenik özellikte olduklarından primer enfeksiyonlar homolog türlerle oluşacak enfeksiyonlara karşı konakta tam bir bağışıklık oluşmasını sağlarlar. Bu nedenle coccidiosisin kontrolünde aşı uygulamasının ilaçlara karşı iyi bir alternatif yöntem olacağı düşünülmektedir. Değişik tiplerde aşı üretim çalışmaları devam etmekle birlikte çok yavaş ilerlemeler kaydedilmektedir (Lillehoj ve ark, 2000a; Lillehoj ve Lillehoj, 2000b; Lillehoj ve Trout, 1993).

1.6.3.1. Rekombinant Aşılar

Son yıllarda üzerinde yoğun çalışılan bir konu olmasına rağmen henüz kullanıma sunulmuş ticari rekombinant aşı bulunmamaktadır. Rekombinant aşı üretiminde çapraz türler arasında immun korumanın şekillenmemesi gibi çözülmesi gereken büyük bir engel vardır. Başarılı bir aşı üretimine engel diğer önemli bir faktör de koruyucu antijenlerin tanımlanmasıdır. Birçok potansiyel antijen karakterize edilerek klonlanmış, farklı türlere ve gelişim aşamalarına ait 29 DNA dizisi belirlenmiştir (Jenkins, 1998). Bu antijenlerin çoğu yüzey proteinlerinden ya da rhoptri, mikronem, refraktil yapılar gibi iç antijenlerden oluşmaktadır (Allen ve Fetterer, 2002).

Tekrarlayan enfeksiyonlara karşı optimum direnç sağlayacak aşı dağıtım mekanizması henüz belirlenememiştir. Immunojenik *Eimeria* antijenleri adjuvantlarla izole edilmiş protein olarak (Vermeulen, 1998), patojen olmayan *Escherichia coli*, *Salmonella enteric* serovar typhimurium, poxvirus, fowl poxvirus gibi canlı vektörler kullanarak recombinant antijen olarak (Tomley ve ark, 1991) ve direkt plasmid DNA enjeksiyonu (Kopko ve ark, 2000) şeklinde uygulanmış ve değişen derecelerde başarı elde edilmiştir.

1.6.3.2. Canlı Aşılar

Coccidiosis kontrolünde, yaklaşık 50 yıllık bir süredir, sınırlı bir seviyede olsa da canlı aşılar kullanılmaktadır. Bu aşıların etkinlikleri ilk başta verilen düşük dozdaki oocystlerin yeniden kullanımına ve yavaş yavaş tam bir bağışıklığın oluşmasına bağlıdır. Özellikle damızlıklarda ve yerde yetiştirilen sürülerde kullanılmakla birlikte broilerlerde de kullanımı artmaktadır (Allen ve Fetterer, 2002).

Canlı aşılar attenüe ya da virulent *Eimeria* suşlarını içerir: Attenüe aşılar patojeniteleri azaltılmış suşlar içerir. Paracox (biyolojik gelişimini erken tamamlayan [(precocious)] suşlar) ve Livacox (precocious ve embriyolu tavuk yumurtasında pasajlanmış suşlar) attenü canlı aşı olup içerdikleri suşların hepsi ilaç duyarlılığı gösterir. Yine Eimeriavax Plus, Paracox 5 gibi attenüe canlı aşılar da mevcut olup bunlar da patojeniteleri yani üreme kapasiteleri azaltılmış ancak halen güçlü immunojeniteleri olan oocyst içermektedir (Williams, 1998).

Virulent aşıların içeriklerinde, doğal patojeniteleri herhangi bir işlem ile değişikliğe uğratılmamış laboratuvar veya saha suşları bulunur. Coccivax D, Coccivax E, Immuncox, Nobilis gibi virulent canlı aşılar kullanılmaktadır (Danforth,. 1998). Konak bağışıklığı *Eimeria* türüne spesifik olduğundan aşıların etkili olması için belirli türleri (genellikle 3-7 tür) içermesi gerekir. Kontrollü olarak hayvanlarda düşük dozda virulent oocyst verilerek, altlık yüksek oranda oocyst ile kontamine olmadan önce, hayvanlarda koruyucu bağışıklık oluşturulması amaçlanır (Morris ve Gasser, 2006).

Attenüe aşılardaki etkenler, üreme potansiyelleri düşük olduğundan mukoza yüzeyinde kalabalık etkisi oluşturmadan minimal doku zararı ile optimal bağışıklık oluşumunu sağlar. İlaçlara duyarlı attenüe suşların yerel populasyonlardaki virulent, doğal suşlarla melezlendiğine ve hem virulent hem de ilaçlara dirençli suşların ortaya çıktığına inanılmaktadır. Bu nedenle, anticoccidial

ilaçların yararlı olacağı periyodu uzatmak için anticoccidial kullanımı canlı aşı uygulamaları ile rotasyon şeklinde kullanılabilir (Williams, 1998).

Eimeria etkenlerinin antijenik özellikleri coğrafik bölgelere göre değişiklik gösterebilir (Martin ve ark, 1997). Bu nedenle, canlı aşılar yerel sürülere uygulanmadan önce incelenmelidir. Immunovariant suşlar izole edilerek değiştirilmeli, böylece bölgeye spesifik, otojen aşılar elde edilmelidir. Canlı aşılar ilaçlara dirençli suşlarla birleştirilerek modifiye de edilebilir. Yerde beslenen ve bir günlük yaşta ilaç dirençli *Eimeria* suşlarıyla aşılanan broilerlere anticoccidial uygulanmasının, hayvanları aynı türle enfeksiyona karşı nerdeyse tamamen koruduğu belirlenmiştir. Bu aşı uygulamasının ilaç direnci sorunu olan ya da coccidiosis kontrolünün sorun olduğu coğrafik alanlarda anticoccidiallerin kullanım ömürlerini uzatma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (Danforth, 1998; Williams, 1998).

1.6.3.3. Sitokinlerin Adjuvant Olarak Kullanılması

Sitokinler enfeksiyonlara karşı immun yanıtların oluşmasında en önemli modülatörlerden olduklarından, immun uyarımının doğal kaynaklarını oluşturur ve bu nedenle de aşılarda adjuvant olarak kullanılabilirler. Sitokinlerden özellikle IFN-γ üzerinde çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda, recombinant IFN-γ'nın *E. acervulina* ve *E. tenella* enfeksiyonlarında kilo kaybını ve *E. acervulina* enfeksiyonlarında oocyst atılımını azalttığı belirlenmiştir (Lillehoj ve Choi, 1998).

Sitokinlerin in vivo ortamda kullanılmalarındaki en büyük dezavantaj hızla bozulmalarıdır. DNA formunda ya da viral/bakteriyel bir vektör içinde uygulanmaları ile bu problemin üstesinden gelinebileceği bildirilmiştir (Morris ve Gasser, 2006).

1.6.3.4. Alternatif Kontrol Metodları

Coccidiosis kontrolünde alternatif metodlar üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları da antibakteriyel etkili peptidil membran molekülleri üzerine yapılmıştır. Bu testlerde, in vitro ortamda 5 µm konsantrasyonda 5-10 dk uygulandığında bu moleküllerden bazılarının, sporozoitlerin hücre zarlarında ultra yapısal düzeyde hasar oluşturdukları belirlenmiştir. Yine, proteolizisi engelleme özelliğindeki bazı peptidil membran moleküllerinin *E. acervulina*, *E. tenella* ve *E. maxima* ile yinelenen enfeksiyonlarda, lezyon skorlarını azalttığı tespit edilmiş olup bu moleküllerin coccidiosis kontrolünde kullanılabilecek potansiyel ürünler olduğu düşünülmektedir (Morris ve Gasser, 2006).

Anticoccidial yem katkı maddesi olarak test edilen birçok doğal ürün de bulunmaktadır. Balık yağı, keten yağı, keten gibi yüksek oranda omega yağ asitleri (docosahexaenoik asit, eicosapentaenoik asit ve linolenik asit) içeren yağ kaynakları hayvanların başlangıç yemine katılıp, bir günlük yaştaki hayvanlara verildiğinde, *E. tenella* ile enfeksiyon sonrası bağırsak lezyonlarında önemli düzeyde azalma sağlandığı belirtilmiştir. Balık yağı ve keten yağı diyetleri *E. tenella*'nın aseksüel ve seksüel gelişme evrelerinde ultrayapısal bozulmaya yol açarak, parazitin gelişimini önemli düzeyde azaltmıştır (Allen ve ark, 1996; Allen ve ark, 1997a). Bu maddelerin, parazitlerin gelişimine zarar veren oksidatif strese yol açtıkları belirtilmiştir.

Artemisinin, *Artemisia annua* adlı bitkiden elde edilmekte olup anti-malarial etkiye sahip bir ilaçtır. Bu ilacın civcivlerin başlangıç yemine 8,5 ve 17 ppm dozlarında katılması sonucu, *E. acervulina* ve *E. tenella* enfeksiyonlarında oocyst atılımının önemli düzeyde azaldığı gözlemlenmiş olup ilacın oksidatif strese yol açarak bu etkiyi oluşturduğu düşünülmektedir (Allen ve ark, 1997b). Asya kıtasına özgü bitkilerin ekstraktlarıyla yapılan çalışmalarda *E. tenella*'ya karşı anticoccidial etkinlik ortaya konmuş ve bu bitkilerden *Sophora flavescens*

aiton'un oocyst üretimi ve kilo kaybını azaltmada en etkini olduğu bildirilmiştir (Youn ve Noh, 2001).

Gama-tocopherol gibi anti-oksidant özellikli yem katkı maddeleri mısır, buğday, soya ve kürkümin gibi tohum yağlarında çok miktarda bulunmakta olup *E. acervulina* ve *E. maxima* nedenli üst ve orta bağırsak coccidiosis olgularının şiddetini azaltmaktadır. Doğada birçok bitki ve organizma tarafından sentezlenen, osmoprotektan etkili betaine kanatlı hayvanların büyümesine ve performansı üzerine yararlı etkilere sahiptir. Bu maddenin tek ya da salinomisin ile birlikte kullanıldığı bir çalışmada her iki durumda da betaine mortaliteyi düşürmüş, kilo alma ve yemden yararlanma üzerine olumlu etkide bulunduğu saptanmıştır. Doku kültürü çalışmalarında betaine ve salinomisin kombinasyonunun hücrelere *E. acervulina* invazyonunu azalttığı görülmüştür. Bu kombinasyonun *Eimeria* etkenleri ile enfekte hayvanlarda, *E. acervulina* gelişimi üzerine direkt olarak, bağırsak yapısı ile fonksiyonunu destekleyen osmoprotektan etkisi ile de indirekt olarak etkide bulunduğu var sayılmaktadır (Augustine ve ark, 1997; Augustine ve Danforth, 1999).

1.7. Coccidiosisde Tanı

Coccidiosisten korunma amacıyla yapılacak uygulamalarda en önemli nokta öncelikle hastalığa hangi türlerin yol açtığının belirlenmesidir. Türlerin teşhisinde anemnez, klinik bulgular, makroskobik ve mikroskobik bulgular göz önünde bulundurulmalıdır (Pellerdy, 1974).

Rutin tanı dışkı örneklerinin ışık mikroskobu altında incelenmesi ile oocyst varlığının belirlenmesine dayanır. Ancak oocyst varlığı tek başına hastalık varlığını göstermez. Hastalığı atlatan hayvanlarda ya da subklinik vakalarda dışkıda oocyst görülebilir. Bunun yanı sıra perakut seyreden *E. tenella*

olgularında dışkıda oocyst görülmeden hayvanlarda ölümlere rastlanabilir. Dolayısıyla dışkı bakısı dışında nekropsi bulgularının da değerlendirilmesi daha doğru sonuçlar verecektir (Pellerdy, 1974, Levine, 1985).

1.7.1. Tavuk Coccidiosisinde Moleküler Tanı Teknikleri ile Yapılan Çalışmalar

Bir sürüde coccidiosis etkenlerinin spesifik tanısının konması, hastalıktan korunmanın ve kontrolün temelini oluşturur. Tanı amacıyla rutin kontroller yaparak coccidiosis salgınının araştırılması ve canlı aşı uygulamasının etkinliğinden emin olunması gereklidir. Teorik olarak, çok sayıda fenotipik özellik eş zamanlı olarak değerlendirilerek *Eimeria* türlerinin tür tayini yapılabilir. Her türün bağırsaklarda yerleşim gösterdiği spesifik bir alan ve buralarda oluşturduğu karekteristik makroskobik bulgular vardır. Ek olarak, oocyst büyüklüğü ve şekli de tür bazında değişiklik gösterir. Örneğin, *E. tenella* sekum ve yakınındaki bağırsak bölümlerinde çoğalır ve kanlı lezyonlara sebep olurr. *E. maxima* ve *E. necatrix*, ince bağırsakların orta kısmında gelişim göstermekle birlikte, değişik büyüklüğe sahip oocystleri ile ayırt edilebilecekleri teorik olarak belirtilmektedir. Deneysel olarak oocystlerin tavuklarda pasajlanması ile referans suşları temel alarak prepatent süre ve immunojenitelerinin değerlendirilmesi tür tanısı açısından daha kesin bir bilgi sağlar (Shirley ve ark, 2005). Ancak uygulamada oocyst büyüklüğü ve şekli, prepatent süre, makroskobik lezyonlar ya da bağırsakta yerleşim yeri gibi kriterlerle tür tayini yapmak mümkün değildir. Çoğunlukla mix enfeksiyon şeklinde görülen coccidiosis olgularında, çok sayıda türe bağlı, etkilenen bağırsak bölümünde lezyonlar birbirine karışmakta ve türe özgü patolojik bulgular ayırt edilememektedir. Yine oocyst şekli ve büyüklüklerinde de karışıklıklar olmaktadır. Bu nedenlerle de geleneksel metodlar tür spesifik tanı yapılması için yeterince güvenilir değildir. Geleneksel tanı yöntemlerindeki sorunlar çok sayıda

biyokimyasal ve moleküler metodların geliştirilmesi ile çözümlenmiştir (Morris ve Gasser, 2006).

1.7.1.1. Multilokus Enzim Elektroforezi (MEE)

Multilokus enzim elektroforezinde prensip, denatüre olmayan enzim gibi proteinlerin elektrik akımı ile jelde yürütülerek ayrılmasıdır. Homolog enzimler, orjinal olarak kopyalanmış DNA dizilimlerindeki temel farklılıklar nedeniyle, yük ve büyüklük olarak farklılık gösterebilir. Bir proteinin jeldeki göçü de yük ve büyüklüğüne göre değişiklik gösterdiğinden, farklı bireylere ya da türlere ait enzimler bu yöntemle ayrılabilir. Böylece de göreceli pozisyonları enzim spesifik boyalarla ortaya konabilir (Andrews ve Chilton, 1999). MEE için gerekli ekipman ve spesifik boyalar kolaylıkla bulunabilmekte ve bu teknik başarılı olarak tavuk *Eimeria* etkenlerinin genetik varyasyonunun hem türler arası hem de tür içinde araştırılmasında uygulanmaktadır (Morris ve Gasser, 2006).

Morris ve Gasser (2006), Shirley'in MEE tekniği ile 6 *Eimeria* türüne ait 11 suş üzerinde çalıştığını, her türün identifikasyonu ve ayrımsal tanısında 4 farklı enzim kullandığını ve sonuçta belli bir düzeyde tür içi varyasyon belirlediklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada laboratuvar suşlarıyla olduğu gibi karışık saha suşlarıyla da başarılı sonuçlar alınmıştır. Morris ve Gasser (2006), Chapman'ın *E. acervulina*, *E. praecox* ve *E. mivati*'de glukoz fosfat izomeraz enziminin elektroforetik hareketliliğini incelediğini, pasajlanmış saha suşlarının elektroforetik bandları ile laboratuvar suşlarınınkini karşılaştırdığını ve her ikisinde de başarılı sonuçlar aldığını bildirmişlerdir.

Diğer organizmalarla karşılaştırıldığında *Eimeria* türlerinin bu teste çok uygun olduğu, dışkıdan çok sayıda oocystin elde edilebilir olduğu ve gerektiğinde az sayıda oocyst eldesi için toplanan oocystlerin tavuklarda pasajlanabildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, oocyst sayısının yeterli olmadığı durumlarda

pasajlama işlemi hem masrafa hem de geç sonuç alınmasına neden olur, ayrıca da işlem uzun sürer (Procunier ve ark, 1993; Fernandez ve ark, 2003). Proteinlerin amino asit diziliminde oldukça sınırlı oranda varyasyon oluşur. MEE bu tarz varyasyonları belirlediğinden ve mevcut varyasyonun sınırlı değerinden dolayı testin uygulanabilirliği kısıtlanmaktadır. Buna ek olarak eğer DNA diziliminde oluşan varyasyon, amino asitlerde bir varyasyona çevrilmeyebilir ya da çevrilirse de elektroforezde çeşitli hareketlere neden olmayabilir (Shirley, 1994a; Fernandez ve ark, 2003).

1.7.1.2. Southern Blot Tekniği

Elektroforez ile ayrılmış spesifik DNA fragmanlarını belirleyen teknik 1975 yılında Southern tarafından geliştirilmiştir. Genomik DNA bir ya da daha fazla restriksiyon enzimi ile parçalanır. Daha sonra bu parçalar jel elektroforezle ayrıştırılır, bir ya da daha fazla spesifik prob ile melezleştirilir ve pozisyonları otoradyografi ya da fluografi ile belirlenir. Bu metodun kullanılabilirliği, kesim enzimlerinin nükleotid dizilimindeki spesifik tanıma noktalarından DNA'yı ayırma becerilerine bağlıdır (Morris ve Gasser, 2006).

Southern blot hibridasyon tekniği, ilk kez Ellis ve Bumstead (1990) tarafından tavuk *Eimeria* türlerine uygulanmıştır. *E. tenella*, *E. acervulina* ve *E. necatrix*'in genomik DNA'ları endonükleaz *Eco*RI ile parçalanmış ve daha önce sporlanmış oocystlerden ekstrakte edilen total hücresel RNA'dan elde edilen RNA probu ile problanmıştır. Bu şekilde her 3 tür de ayırt edilebilmiştir. Shirley (1994b), *E. tenella*'nın 7 suşunu *Hin*fI, *Rsa*I, *Hpa*II ve *Eco*RI endonükleazları ile incelemiştir. *E. tenella*'nın genomik DNA'sının tekrarlayan dizilimlerinden 4 prob üretmiş ve endonükleazlarla ayrı ayrı parçalayarak elde edilen kesim parçalarını melezlemede kullanmıştır. Test sonucunda, *E. tenella*'nın daha önce çeşitlilik belirlenemeyen Houghton ve WIS suşları da dahil tüm suşlar arasında varyasyon belirlenmiştir. Bu şekilde tür içi varyasyonun

belirlenmesi, bu testin MEE testinden daha duyarlı olduğu göstermektedir. Teknikte bilinen ayıraçlar kullanılmakla birlikte, ayrıştırılan DNA parçalarını spesifik olarak melezleyecek uygun bir probun dizayn edilmesi şarttır.Bunun yanı sıra işlem için çok sayıda oocyst gerekmesi ve daha kompleks bir test olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Procunier ve ark, 1993; Shirley, 1994b; Fernandez ve ark, 2003).

1.7.1.3. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PGFE) ve İlişkili Metotlar

Geleneksel jel elektroforez metodlarının belirli bir büyüklüğün (15-20 kilobaz üstü) üstündeki DNA moleküllerini ayırma yeteneği sınırlıdır. Bununla birlikte, elektroforez protokolünde bazı küçük değişiklikler yapılarak DNA molekülleri 50 kb'dan farklı mb'lara kadar ayrılabilir. Bu metodlardan biri, değişken alanlı jel elektroforezidir. Bu teknikte belli aralıklarla akım yönü değiştirilir. Böylece moleküller daha kolay döner ve molekül ağırlıklarına göre ayrışırlar. Daha sonra, DNA moleküllerinin pozisyonu etidyum bromür boyama ya da radyoaktif bir probla melezleme yapılarak belirlenir (Shirley, 1994b).

Shirley ve ark. (1990), bu tekniği kullanarak *E. tenella*'nın karyotipini karakterize etmişlerdir. Daha önceleri, haploid *E. tenella* nüklear genomunun 5 kromozomu olduğu belirtilirken, PGFE en az 12 adet kromozom olduğunu ortaya çıkarmıştır. Daha sonra yine Shirley (1994b), suşlar arasında kromozomal büyüklük varyasyonunu belirleyerek, *E. tenella* karyotipinde farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Field inversion jel elektroforezi (FIGE), birçok noktada değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) ile benzerlik gösterirken farklı olarak bunda elektrik akımı ileri ve geri olmak üzere birbirini takip edecek şekilde değiştirilerek belli aralıklarla uygulanır (Carle ve ark, 1986). Bu teknikte orta büyüklükteki fragmentler hiç

hareket etmeden kalabildikleri halde çok küçük ve çok büyükler öne veya ileriye doğru ayrılabilmektedir. Fernando ve Pasternak (1991), bu metodu tavuk *Eimeria* etkenlerinden 5'inin moleküler karyotipini araştırmak için kullanmıştır.

1.7.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ile Bağlantılı Metodlar

Kullanılan diğer moleküler tekniklerde, etkili bir analiz ve/veya tanı için büyük miktarlarda etkene ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, bazı durumlarda etkenlerin tavuklarda pasajlanarak yeterli miktarda oocyst elde edilmesi gerekebilir. Bu uygulama masrafın ve laboratuvar işinin artmasına neden olduğu gibi zaman kaybı da söz konusudur. Çok az miktarlardaki parazit materyali ile çalışılabilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nun geliştirilmesiyle bu dezavantajlar ortadan kaldırılmıştır (Morris ve Gasser, 2006).

PCR, kompleks genomdan istenen DNA'nın amplifikasyonuna olanak sağlayan bir tekniktir. Prensibi, çift sarmala sahip genomik DNA kalıbının sıcaklık ile denatüre edilerek sarmalın açılması; daha sonra sıcaklığın düşürülerek primerlerin karşıt sarmal üzerinde kendi komplementer dizilerine bağlanması; termostabil DNA polymeraz enzimi ile primerlerin her iki yöne doğru uzayarak yeni DNA'nın sentezlenmesi şeklindedir. Bu sentez genellikle 20-30 kez tekrarlanır ve sonuçta hedef DNA'nın milyonlarca kopyası oluşur. Kanatlı *Eimeria* etkenlerinde uygulanan PCR temelli tanı yöntemlerinden bazıları şunlardır:

i- DNA Parmak İzi (DNA Fingerprinting) Tekniği

İncelenen örneğin, genetik parmak izinin üretilmesine olanak tanıyan bir metottur. Prensip olarak, genomun dizilimini ve/ya da organizasyonunu varyasyon açısından taramaya dayalıdır. Tür ya da populasyon için üretilen bu veriler spesifik benzerlikleri, genetik farklılığı ve/ya da akrabalığı araştırmada

kullanılabilir. Bu uygulamanın avantajı, çalışılacak olan parazit genomuna dair daha önceden yapılmış sekans bilgisine ihtiyaç duyulmamasıdır (Morris ve Gasser, 2006).

ii- Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

Genomik DNA'nin kesilmiş parçalarının selektif amplifikasyonuna ve sonrasında bu amplifikasyon ürünlerinin denatüre edici jel elektroforez analizi ile görüntülenmesine dayalı bir tekniktir. Teknik 3 ana basamaktan oluşur: 1) Genomik DNA'nın parçalanması ve bu parçalara oligonükleotid adaptörlerinin bağlanması, 2) kesilen fragmanların belirli bölgelerinin selektif amplikasyonu, 3) amplike fragmanların jel elektroforezle analizinin yapılması. İşlem kesim parçalarının ucuna bağlanacak primer seçimi ile selektif hale getirilir. Böylece sadece primer uzantılarının kesim alanı yanındaki nükleotidlerle eşleştiği kesim parçaları amplifiye edilmiş olur ve daha sonra bunlar jel elektroforez ile ayrılarak "DNA parmak izi" elde edilir. Bu teknikde oldukça spesifik primer bağlanması ve amplifikasyonu kullanılmasına rağmen, genom dizilimine dair geçmiş bilgiye ihtiyaç duyulmamaktadır (Vos ve ark, 1995). AFLP, *E. tenella*'nın genetik bağlantı haritasının yapımı için polimorfik markerların türetilmesinde kullanılmıştır (Shirley ve Harvey, 2000).

iii- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) ve Belirli Dizileri Çoğaltılan Bölgeler (Sequence-characterized Amplified Regions, SCARs)

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemi, genom üzerindeki rastgele bölgelerin DNA fragmanlarının, 6-10 nükleotid uzunluğundaki bir başlatıcı primer kullanılarak amplifikasyonu ve daha sonra amplikonların elektroforezle ayrılmasına dayanmaktadır. RAPD'nin avantajları hızlı ve basit

olması, oldukça az miktarda genomik DNA'ya ihtiyaç duyulması ve tüm genomun incelenebilmesidir. Kullanışlı bir metot olmasına rağmen PCR'da sıklıkla kullanılan düşük bağlanma ısıları nedeniyle sonuçların spesifitesinde ve/ ya da tekrarlanabilirliğinde problem olabilme riski vardır (MacPherson ve Gajadhar, 1993).

RAPD yöntemi, *Eimeria* türleri arasındaki varyasyonun araştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Shirley ve Bumstead (1994), bu yöntemle değişik biyolojik fenotiplere sahip 7 *E. tenella* suşunu incelemiştir. İncelenen örneklerden 3'ü laboratuvar suşu, 1'i yumurta embriyosu pasajına adapte suş, 2'si precocious suş ve 1 tanesi de saha suşundan oluşmaktadır. Ayrı PCR'larda DNA amplifiye edilmiş, profillerin görüntülenmesi için amplikonlar agoroz jelde ayrılmıştır. Suş-spesifik markerlar sayesinde, yürütülen 199 banttan 4 (%2)'ünün incelenen 7 örnekte değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Barta ve ark (1998), RAPD testi uygulayarak *E. maxima*'nın 5 suşunun kimlik doğrulamasını yapmış ancak suşlar arasındaki ilişkiyi belirlemek için yeterli özgün bant elde edememişlerdir.

RAPD suşların tanımlanması ve diğer suşlardan ayrımlarının yapılmasında da kullanılmaktadır. MacPherson ve Gajadhar (1993), ilk kez bu tekniği kullanarak, biri de *E. tenella* olmak üzere, 7 *Eimeria* türü arasındaki ayrıma bakmışlardır.

RAPD'nin diğer bir kullanım alanı da tür spesifik ya da suş spesifik genetik marker olabilen SCARs (belirli dizileri çoğaltılan bölgeler) bölgelerinin tanımlanmasıdır. Elektroforetik bir jelde görüntülenen RAPD bantları kesilip çıkarılır, purifiye edilip klonlanır ve sekans analizi yapılır. Belirlenen bu sekanslara SCAR adı verilir. Bunlar için dizayn edilen primerler, türlerde ya da suşlarda, hedeflenen PCR amplikasyonu için kullanılabilir. Fernandez ve ark (2003), *E. acervulina*, *E. tenella* ve *E. maxima* örneklerini RAPD ile incelemişlerdir. Kullandıkları 150 farklı primerden 110'u tür spesifik bant vermiştir.

Tür ayrımına ek olarak çok sayıda primer suş spesifik marker oluşturmuş; *E. tenella* ya da *E. maxima* suşlarına oranla *E. acervulina* suşları arasındaki değişkenliğin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Tür spesifik SCAR'lar 7 kanatlı *Eimeria* türünden her biri için tanımlanarak her biri için bir primer seti dizayn edilmiştir. Bu primer setlerinin her biri, hatasız ve tekrarlanabilir şekilde, uygun türlerden DNA amplifiye etmiş ve sonuçta elde edilen PCR ürünü jelde tek bir bant olarak görülebilmiştir.

iv- Ribozomal DNA (rDNA) 'yı Hedef Alan Çalışmalar

PCR, genomik DNA'nın belirli kısımlarının, tanımlanmış oligonükleotidler ile amplifikasyonuna dayanan bir amplifikasyon metodudur. Örneğin Stucki ve ark (1993), *E. tenella*'nın 5 S ribosomal RNA ünitesini amplifiye edecek primerler dizayn etmişlerdir. Bu çalışmada, 2 *E. tenella* oocysti bile amplifiye edilebilirken, test edilen *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* ve kanatlıya ait olmayan 2 tür olmak üzere toplam 5 *Eimeria* türünden amplifikasyon ürünü elde edilememiştir. Benzer şekilde, Molley ve ark (1998) sporozoit antijen genine spesifik primer dizayn etmişlerdir. Bu testte hazırlanan primerler *E. acervulina*'ya spesifik olup diğer 6 kanatlı *Eimeria* etkeni ile çalışıldığında amplifikasyon ürünü alınamamıştır. Her iki olguda da tek bir *Eimeria* türünün tanımlanması için etkili bir yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen, heterolog türlerin belirlenememesi gibi bir dezavantaj söz konusu olmuştur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ribosomal DNA (rDNA)'nın çekirdeğinin genlerini ayıran ITS-1 ve ITS-2'yi hedef almaktadır. Ribozomal genler korunma eğiliminde olmakla birlikte, bu ayırıcılar türler arasında uzunluk ve dizilim açısından oldukça heterojen yapıda olup, komşu gen dizilimlerine spesifik primerler dizayn edilebilir. rDNA'nın diğer kısımları gibi, bu ayırıcılarda uyumlu biçimde evrimleşmiş ve tekrarlanan yapıda olup, buna bağlı olarak, kullanıldıkları PCR testini duyarlı yaparlar (Morris ve Gasser, 2006).

Schnitzler ve ark (1998; 1999) ITS-1'i hedef alan PCR yönteminde, 7 kanatlı *Eimeria* türünün her birinden ürün amplifiye etmek üzere, ITS-1'e komşu korunmuş alanlara yönelik soy-spesifik primerler kullanmışlardır. Daha sonra her türden elde edilen amplikon pürifiye edilmiş, klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. Her tür için, ITS-1 diziliminin özgün bölümlerine yönelik farklı primer çifti dizayn edilmiştir. Lew ve ark. (2003) ile Su ve ark. (2003)'da önce soy spesifik primer kullanmış, daha sonra bu ürünlerin klonlanma ve sekanslanma işlemlerinin ardından tür spesifik primer dizaynı yapmışlardır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütülmüş, büyüklükleri görüntülenmiştir.

Bu çalışmalarda (Schnitzler ve ark., 1998; 1999; Lew ve ark., 2003; Su ve ark., 2003) uygun türler her primer çifti ile, spesifik ve tekrarlanabilir şekilde, amplifiye edilirken heterolog türlerde başarı elde edilememiştir. Bununla birlikte; tek, multipleks bir reaksiyonda tüm primerlerin değerlendirilmesine ilişkin bir bilgi sunulmamıştır. Bundan dolayı, bu tür çalışmalarda, öncelikle her bir örnekle çok sayıda PCR reaksiyonu yapılıp hangi türlerin olduğunun anlaşılması gerekir. Ancak, bu da zahmetli bir iştir ve de zaman kaybına yol açar. Eğer tek bir primer çifti ile 7 *Eimeria* türünden her biri eşzamanlı olarak amplifiye edilip, türler arasında büyüklüklerine göre rahatlıkla ayırt edilebilen spesifik amplikonlar üretilebilinirse daha az iş gücü gerekir ve masraf azalmış olur.

v- PCR Temelli Manuel ve Yarı Otomatik Elektroforetik Metodlar

Tavuk *Eimeria* türlerinde ITS1 ve ITS2 amplikonlarının direkt sekanslanması, izolatların kendi içinde bireysel farklılık göstermesine bağlı sekans heterojenitesi söz konusu olduğundan mümkün değildir (Schnitzler ve ark., 1998; 1999; Lew ve ark., 2003; Su ve ark., 2003). Bu nedenle, bu ayırıcılarda tür spesifik marker oluşturmak için en çok kullanılan metod klonlanmış amplikonların sekanslanmasıdır.

Woods ve ark (2000b), PCR temelli RFLP analiz yöntemini kullanarak, Avustralya tavuklarında görülen 6 farklı *Eimeria* türüne ait örneğin, kendi içlerinde ve birbirleri arasında ITS2 bölgelerinin sekans varyasyon karekterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmanın amacı, bu rDNA bölgesinin *Eimeria* türlerinin spesifik tanımlanmasında genetik marker olma durumunun incelenmesidir. Yapılan PCR'da, genomik DNA'dan ITS-2 bölgesinin amplifikasyonu için işaretlenmiş *Eimeria* spesifik forward (WW2) ve reverse (WW4) primerler kullanılmış; 3 kesim enzimi (C*fo*l, S*au*3AI ya da *Taq* I) ile ürünler parçalanmış ve parçalar jel elektroforezle ayrılmıştır. Buna göre; 6 *Eimeria* türünü (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox* ve *E. tenella*) temsil eden izolatlardan ayrı ayrı amplifiye edilen PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucunda ITS2 bölgelerinin 370-620 baz çifti (bp) arasında değişen büyüklüklere sahip oldukları, türler arasında bant sayısı ve büyüklüğü açısından farklılıklar görüldüğü ancak tek tür içindeki varyasyonun sınırlı olduğu saptanmıştır.

Hızlı ve yüksek verimlilikte tanı, genetik analiz ve in siliko veri analizine artan talep nedeniyle otomatik elektroforetik prosedürlerin etkinliğinde artışlar olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalar genişletilerek, tavuklarda hastalık yapan 7 *Eimeria* türünün spesifik identifikasyonu ve ayrımı için yarı otomatikleştirilmiş elektroforetik yaklaşımlar hazırlanmıştır (Gasser ve ark, 2001; 2005). Sonuçta da 7 *Eimeria* türünün ITS-2 bölgeleri, WW2 ve WW4R primerlerinin kullanıldığı PCR ile amplifiye edilmiştir. WW2 primeri floresans boya ile işaretlenmiştir. PCR ardından amplikonlar spesifik bir loading buffer içinde 1:30 oranında dilue edilerek ısı ile denatüre edilmiş ve direkt olarak slab jele ya da kapillar elektroforeze tabii tutulmuştur. Alınan kromatogramlar elektronik olarak saklanmış ve spesifik bir yazılım programı kullanılarak analiz edilmiştir. Monospesifik *Eimeria*'ların oluşturduğu kontrol DNA'ları kullanılarak kromatogramdaki belirli pikler 7 *Eimeria* türünün her birinin saptanması ve kesin farklılıklarının ortaya konması için tanımlanmıştır. Bu testin etkinliği, doğal yolla çok sayıda *Eimeria* türü ile enfekte tavuklardan alınan örneklerin incelenmesi ve

tür kompozisyonunun monospesifik referans örneklerle karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Bu şekildeki otomatikleştirilmiş bir uygulama *Eimeria* aşılarının kalite kontrolünde, coccidiosis salgınlarının izlenmesinde, post mortem tanıda ve epidemiyolojik çalışmalarda oocyst örneklerinin analizi için kullanılabilir. Normal elektroforez prosedürlerine kıyaslandığında zamanda, işlenen örnek sayısında, veri depolamada ve analiz kapasitesinde büyük avantajları vardır (Gasser ve ark 2005).

1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Karry Mullis tarafından 1983 yılında icat edilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasına ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. Mullis, bu fikri ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel ödülü kazanmıştır (Mullis, 2009)

Hastalıkların teşhisinde klinik ve nekropsi bulguları, etken izolasyon ve identifikasyonu, antijenik materyallerin saptanması ve serolojik teknikler gibi direk tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler bazen başarılı sonuçlar vermediği gibi, latent enfeksiyonlarda da hatalı pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu gibi olgularda, etkene ait genetik materyallerin (DNA ya da RNA) veya proteinlerin saptanmasını amaçlayan, kesin sonuçlar veren biyoteknoloijik teşhis yöntemlerinin kullanılmaları oldukça faydalıdır. Bu biyoteknolojik yöntemler içerisinde en yenilerinden biri olan PCR, spesifite ve sensitivitesinin oldukça yüksek olması gibi nedenlerle araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Türkyılmaz ve Esendal, 2002; Pelt-Verkuil ve ark, 2008).

1.7.2.1. PCR'ın Temel Mekanizması

PCR, birbirini takip eden 3 basamaktan oluşur. Uygun şartlarda meydana gelen amplifikasyon işleminden sonra iki primer arasında kalan DNA miktarı ikiye katlanır. Eğer bu 3 siklus tekrarlatılırsa, yani zincirleme reaksiyon başlatılırsa, her siklusta bir öncekinin iki katı DNA molekülü elde edilir. Bu düzen dahilinde yapılan yaklaşık 30 siklus sonunda 1 DNA molekülünden teorik olarak $2^{30} = 5x10^{8}$ yeni ürün (amplikon) elde edilir (Sambrook ve ark, 1989; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009), (Şekil 1.3., Şekil 1.4.).

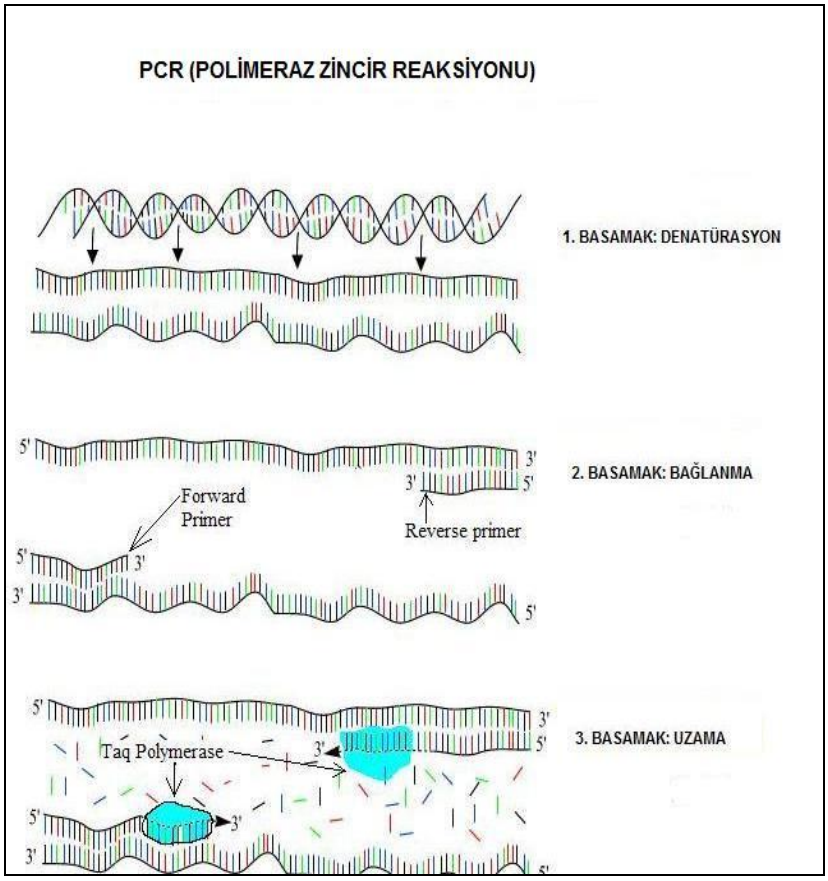
Denatürasyon (Denaturation): Bu basamakta yüksek ısı etkisiyle, çift iplikçikli kalıp DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Test ortamında buffer, dNTP'ler, primerler ve ısıya dayanıklı bir enzim (Taq polimeraz) bulunur. Bu aşamada ısı 90-95 $^{\circ}$C, süre ise 0,5-2 dakika arasında değişir (Sambrook ve ark, 1989; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009).

Bağlanma (Annealing): Birinci basamağın sonunda, birbirinden ayrılmış olan DNA zincirlerine primerlerin bağlanması işlemi gerçekleşir. Bağlanma sıcaklığı, PCR'ın başarısında önemli bir parametre olduğundan optimal bağlanma ısısı belirlenmelidir. Sıcaklığının çok yüksek olduğu durumlarda primer bağlanması şekillenmezken, sıcaklığın çok düşük olduğu durumlarda primerler yanlış yerlere bağlanabilir veya primer dimerleri oluşabilir. Bu aşama genellikle 45-65 $^{\circ}$C arasında değişir ve reaksiyon 2-5 dakika sürer (Sambrook ve ark, 1989; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009).

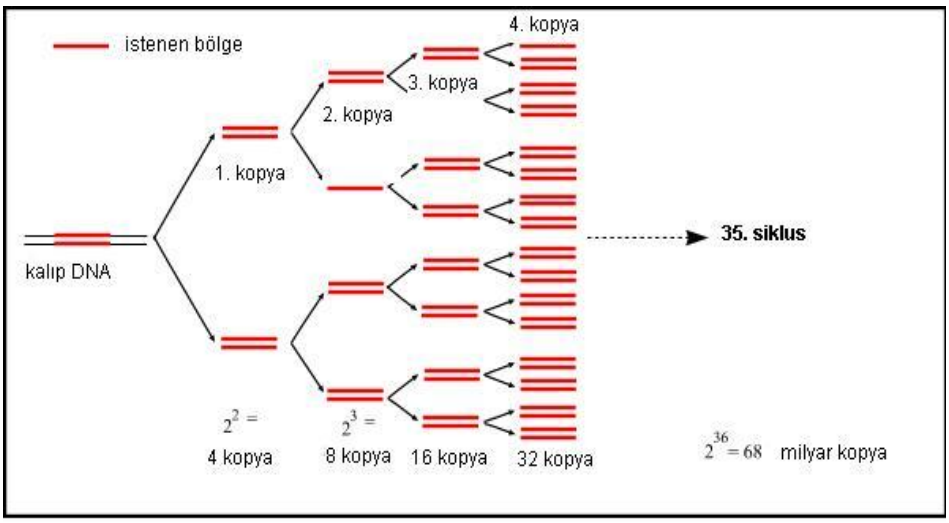
Uzama (Extension): Isıya dayanıklı polimeraz enzimi, primerler ve tek iplikçikli DNA kullanılarak in vitro koşullarda çift iplikçikli DNA'nın sentezlenmesinin sağlandığı aşamadır. Polimeraz enzimi nükleotidleri 5´ ucundan 3´ ucuna doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve sonuçta hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. Reaksiyon 70-72 $^{\circ}$C arasında yani Taq DNA polimeraz

enzimi için optimal sıcaklıkta, 2-3 dakikada tamamlanır. Reaksiyon ısısı tekrar yükseltilerek final ekstensiyon sıcaklığı 94°C'ye çıkarılır. Böylece bir siklus tamamlanmış olur ve her siklusta DNA miktarı bir kat artar (Sambrook ve ark, 1989; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009).

Üç aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden döngü sonunda 1 amplifikasyon siklusu tamamlanmış olur. Etkin bir DNA amplifikasyonu için gerekli olan siklus sayısı genellikle 25-40 arasındadır. PCR sonunda elde edilen ürün DNA'ları görüntülemek için jel elektroforezisi (ultraviole altında DNA bantlarının gözlenmesi), kolorimetrik yöntemler (ELISA ve Reverse Dot Blot gibi) ve fluorometrik (Light cycler sistemleri) yöntemlerden yararlanılır (Caner ve Çarlı, 2001).



Şekil 1.3. PCR'ın basamakları (Anon, 2009b).



Şekil 1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Anon, 2009b).

1.7.2.2. PCR'ın Temel Bileşenleri

Kalıp DNA (Template): PCR için başlangıç materyali çoğaltılacak baz dizisine sahip genetik materyaldir. Bu bakteri, virus, genomik DNA, plazmid ve faj DNA'sı, çeşitli genler veya başka bir hücrenin genomik DNA'sının bir bölümü olabilir. PCR için her türlü kaynaktan temin edilen DNA (veya RNA) kullanılabilir. Kan, serum, vücut sıvıları, dokular, organlar, fikse edilmiş dokular çok fazla yararlanılan materyaller arasındadır. PCR'ın çok duyarlı olması nedeniyle çok az miktardaki örneklerle çalışılabilir. Eğer hedef zincir olarak RNA'dan faydalanılacaksa, reaksiyon başlamadan önce revers transkriptaz enzimi kullanılarak RNA komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir, sonra da bu cDNA, PCR için kalıp olarak kullanılır (Sambrook ve ark, 1989; Alkan ve ark, 1997; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009; Anon, 2009d).

Primerler (Oligonükleotidler): DNA öncüleri olarak da adlandırılılır. Hedef DNA'dan yeni DNA sentezini başlatan ufak DNA parçacıklarıdır. İşaretlenmiş nükleotidlerden oluşmuş sekanslar olup sentez için basamak oluşturan, DNA'yı PCR tekniği ile amplifiye edebilmek için kullanılan başlatıcı yardımcı

oligonükleotidlere primer denir. Bu kısa, tek sarmallı DNA molekülleri DNA matriksinin belli bir bölümünün sonu ile komplementer yapıya sahiptir. Bunlar hedef DNA'nın öyle sekanslarına karşı hazırlanmışlardır ki, başka kontaminant DNA'lar ile çapraz reaksiyon vermezler. Bu nedenle de hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi gerekir. PCR uygulamaları her zaman iki primere ihtiyaç duyar. Birinci primer dizini 5'→ 3' yönünde sentezi başlatırken, diğeri tam ters yönde yani 3'→5' yönünde sentezi başlatır (Sambrook ve ark, 1989; Alkan ve ark, 1997; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009; Anon, 2009d).

Polimeraz Enzimleri: PCR teknolojiisinde ilk önceleri *E.coli*'den izole edilen DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti kullanılmıştır. Bu enzim termolabil özellikte olması nedeniyle sıcaklığın 95°C'ye çıkarılması halinde inaktive olur. Bu dezavantajı gidermek için, her periyotta yeniden enzim katılması yerine ısıya dayanıklı bir enzim bulunması amaçlanmıştır. PCR'da ilk termostabil DNA polimeraz enzimi, 1987 yılında Thermus aquaticus'tan elde edilen ve sıcaklığa dirençli olan Taq-DNA polimerazdır. Yapay olarak rekombinant yapıda olanları da bulunur. Enzim sıcaklığa dayanıklıdır ve 95 °C'de yarılanma ömrü 40 dakikadır. Bu nedenle de DNA denatürasyonunda yıkımlanmaz (Sambrook ve ark, 1989; Alkan ve ark, 1997; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009; Anon, 2009d).

Deoksinükleotid-Trifosfat (dNTPs): Nükleik asit ya da yeni DNA sarmallarının sentezlenebilmesi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP'ye gereksinim duyulur. Nötralize edilmiş, molaritesi belirlenmiş dörtlü setler halinde kullanılmaları reaksiyonun güvenilirliğini arttırır. Primerler ve dNTP'ler, hedef DNA'nın amplifikasyonu için gerekli olan hammaddeyi sağlar. PCR'da dNTP'lerin optimal konsantrasyonu her reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmalı ve Mg konsantrasyonu ile uyumlu olarak kullanılmalıdır (Sambrook ve ark, 1989; Alkan

ve ark, 1997; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Araz ve Tanyüksel, 2009; Anon, 2009d).

Tampon Solüsyonlar (Buffer): PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/ Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler için de benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10x konsantrasyonda bulunur. Polimeraz enziminin aktivitesi için ortam pH'sı ve bivalent katyon (Magnezyum) varlığı çok önemlidir. Standart tampon çözeltisinde 10 mM Tris Cl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, % 0,001 (w/v) jelatin, % 0,01 NP_4O ve Tween 20 olmakla beraber çeşitli modifikasyonlara rastlanmaktadır. Reaksiyona katılan Mg önemli bir enzim kofaktörü olup, dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturur ve çift iplikli DNA'nın Tm (erime sıcaklığı) değerini arttırır. Ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlayarak hedef dizine primerlerin bağlanmasında da ayarlayıcı rolü vardır (Sambrook ve ark, 1989; Alkan ve ark, 1997; Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Anon, 2009d).

1.7.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Primerlerin sınırladığı sekansın uzunluğu bilindiğinden, amplifiye ürünlerin uzunluklarına göre ayrıştırılması amacı ile uygulanır. Uygulanan elektrik akımı etkisiyle, negatif yüklü DNA'nın pozitif yüklü anoda doğru hareketi esasına dayanır. Hareket hızı DNA'nın büyüklüğüne, agaroz konsantrasyonuna, uygulanan voltaja ve tampon solüsyonunun konsantrasyonuna göre değişir (Alkan ve ark, 1997; Anon, 2009d).

1.7.2.4. Nested PCR

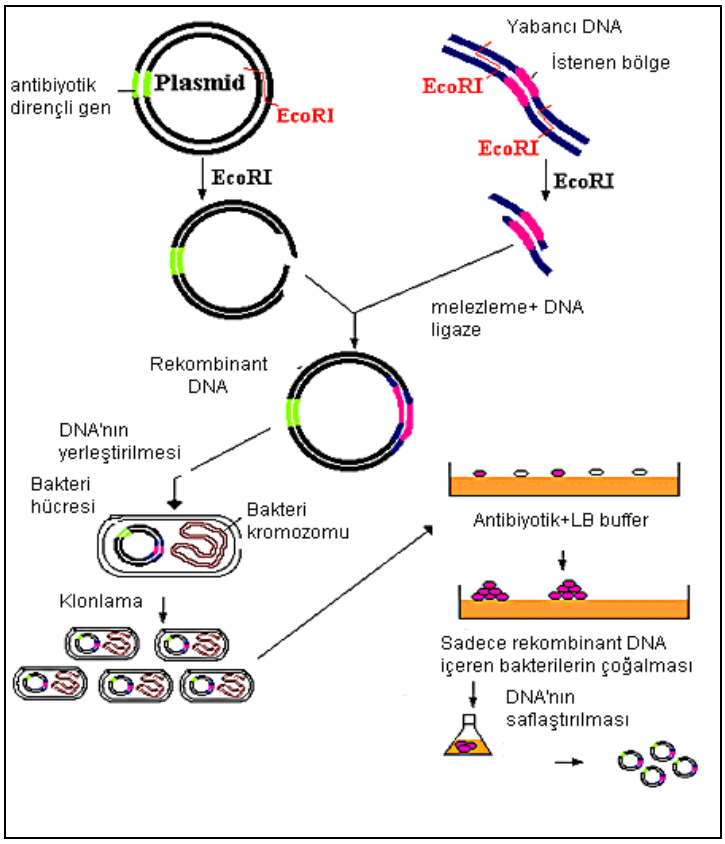
Bu yöntemde üst üste iki PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. Bunun içinde iki çift primer seti kullanılır. İlk PCR'da kullanılan primerlerle istenilen gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra, elde edilen PCR ürününden ikinci primer seti ile tekrar PCR

yapılır. Bu şekilde PCR'da elde edilen ürünün daha spesifik bir bölgesi çoğaltılmış olur (Özdağ, 2007; Pelt-Verkuil ve ark, 2008; Anon 2009c).

1.7.3. Gen Klonlama

Klonlama, gen içeren bir DNA fragmentinin, vektör olarak adlandırılan çembersel bir DNA molekülünün içine sokularak rekombinant DNA molekülleri oluşturulması ve konak hücreye (çoğunlukla *E. coli*) transformasyonudur. Konak hücre içindeki vektör çok sayıda kendi kopyasını oluştururken taşıdığı geni de kopyalar. Konak hücre bölündükçe rekombinant DNA molekülü de nesilden nesile geçer. Daha sonra rekombinant DNA hücrelerden seçilip saflaştırılır, varlığı doğrulandıktan sonra da çeşitli amaçlar için kullanılabilir. Gen klonlama, DNA klonlama, moleküler klonlama veya rekombinant DNA teknolojisi terimlerinin hepsi bu olayı açıklamak için kullanılmaktadır (Sambrook ve ark.,1989; Kuk ve Erensoy, 2009).

Günümüzde gen klonlama çalışmaları; gen izolasyonu, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, genlerin üzerindeki mutasyonların belirlenmesi, gen bankalarının oluşturulması, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA ve rekombinant protein aşılarının oluşturulması gibi amaçlarla yapılmaktadır. Ayrıca gen klonlama, gen içeren DNA parçalarının kuvvetlendirilmesi ve DNA'nın promotorlar, kodlanmamış diziler, kimyasal sentezlenmiş oligonükleotidler gibi kısımlarını ve nadiren kırılmış DNA'yı kuvvetlendirmek için de kullanılabilir (Kuk ve Erensoy, 2009; Anon., 2009f). Gen klonlamanın temel prensipleri Şekil 1.5.'de gösterilmiştir.

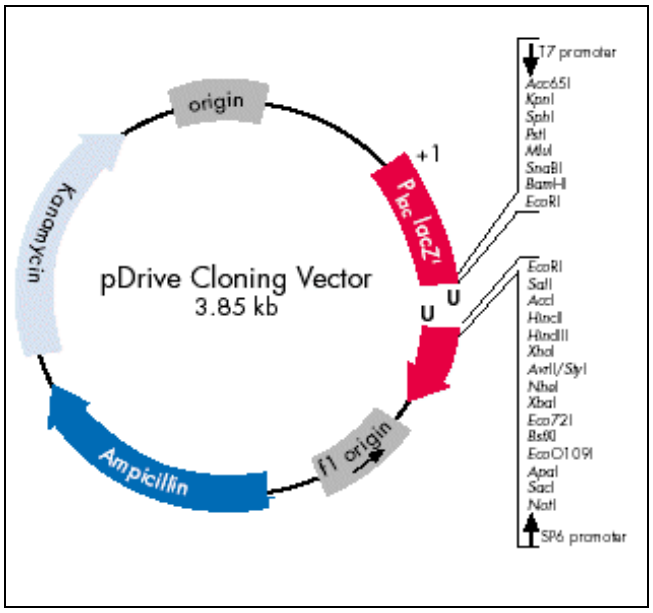


Şekil 1.5. Gen klonlamanın temel prensipleri (Jakubowski, 2006).

Klonlamada vektör olarak virus, bakteri, bakteriofaj, plazmid, kozmid ve mayalar kullanılabilir. Bunlardan plazmidler kullanıldığı takdirde, klasik olarak genler genomik DNA veya mRNA'dan izole edilerek PCR ile çoğaltılmakta, gen ve genin yerleştirileceği plazmid bir veya daha fazla enzim ile kesilerek in vitro şartlarda genin plazmide yerleştirilmesi sağlanmaktadır (Anon., 2009f).

Plazmidler, birçok bakteri türünde ekstrakromozomal olarak bulunan, hücreden bağımsız replikasyonun yapabilen, yuvarlak yapılı, 7-9 kb büyüklüğünde çift zincirli DNA moleküleridir (Şekil 1.6.). Gen klonlamada kullanılan plazmidler (pBR322, pUC, pSP64, pGEM-3Z gibi), doğal plazmidlerin belli sayıda kesim bölgesi ve antibiyotiğe direnç genleri içermesi için modifiye edilmeleriyle elde edilir. Antibiyotiğe direnç geni taşıyan plazmidler, hem konağı bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli kılar hem de transfer edildikleri

hücrelerin direnç kazanmasına yol açar. Plazmidlerde genellikle ampisilin, kloramfenikol, carbenicillin, streptomisin ve sulfonamid gibi antibiyotiklerden bir ya da ikisine yönelik direnç geni bulunur. Bunun yanısıra plazmidlerin üzerinde T3, T7, SP6 ve tac promotorları ile çeşitli restriksiyon enzimleri için tanıma bölgeleri de yer alır. Örneğin pUC plazmidinde bu tanıma bölgeleri Lac Z gen bölgesi üzerinde toplanmıştır ve plazmidin birçok farklı restriksiyon enzimiyle kesilebilmesini sağlar (Sambrook ve ark., 1989; Anon., 2009f; Kuk ve Erensoy, 2009).



Şekil 1.6. Klonlamada kullanılan vektör (Qiagen, 2009).

Restriksiyon endonükleaz olarak adlandırılan ve bakterilerden elde edilen bir grup enzim rekombinant DNA teknolojisinde önemli bir yere sahiptir. DNA'yı kesen bu enzimler izole edildikleri bakterilere göre isimlendirililirler. Örneğin, EcoRI enzimi *Escherichia coli*'den elde edilir. Restriksiyon enzimleri spesifik DNA dizisini veya kesim bölgesini tanıyıp, spesifik fosfodiester bağını katalizleyerek, plazmid DNA'sını keser. Bir marker taşıyan (örneğin antibiyotiğe direnç geni) plazmid ile klonlanacak DNA aynı restriksiyon endonükleazla kesilmelidir. Sonuçta, her iki yapıda da birbirinin komplementeri olan uçlar meydana gelir. İki

yapı aynı ortama konup, DNA ligaz enzimi ile muamele edilirlerse ortaya rekombinant bir DNA molekülü çıkar. DNA ligaz, bir nükleotidin 3' hidroksil ucu ile diğer nükleotidin 5' fosfat grubu arasında kovalent fosfodiester bağı oluşturarak iki DNA dizisini birleştirir (Sambrook ve ark., 1989; Anon., 2009f; Kuk ve Erensoy, 2009).

Vektöre yerleştirilen genin çoğaltılması için bakterilere transformasyonu gerekirir. Kompetan hücrelere transforme edilen rekombinant plazmidlerin, antibiyotik ve laktoz içeren (X-gal) besleyici ortama konarak hücrelerle birlikte çoğalması sağlanır. Sonuçta yüzlerce bakteri kolonisi oluşur. Bu kolonilerden hangilerinin rekombinant plazmid içerdiğinin tespit edilebilmesi için plazmidlerin yapısında yer alan antibiyotik direnç genlerinden yararlanılırabilir. Ayrıca, bazı vektörlerde Lac Z geni üzerinde β-galaktosidaz enzimini kodlayan dizilim mevcuttur. Rekombinant DNA elde edilirken, çoğaltılmak istenen DNA, plazmidin Lac Z gen bölgesi içerisine sokulur. Kromozomal DNA'nın bu gen içerisine sokulması β-galaktosidaz enziminin üretilmesini engeller. Antibiyotik içeren besi yeri sadece antibiyotiğe direnç geni içeren plazmidlerin ortamda kalmalarına olanak sağlar. Kromozomal DNA içermeyen vektörde, besi yerinde bulunan laktoz beta-galoksidaz enzimi tarafından hidrolize edilir ve mavi koloniler oluşturur. Oysa rekombinant plazmidleri taşıyan *E.coli*'lerde laktozu parçalamayı sağlayan gen olmadığından dolayı bu bakteriler beyaz koloniler oluşturur. Klonlamanın doğrulanması amacıyla PCR, kolonilerin agaroz jelde yürütülmesi, restriksiyon enzimi ile plazmidin kesilip agaroz jelde yürütülmesi ve DNA dizi analizi yapılabilir (Sambrook ve ark., 1989; Anon., 2009f; Kuk ve Erensoy, 2009).

Bu araştırmada, istatiksel olarak Türkiye'yi temsil edecek sayı ve dağılımdaki broiler kümeslerinden toplanan dışkı numunelerinde, coccidiosise neden olan *Eimeria* türlerinin Türkiye'de ilk kez bir moleküler amplikasyon yöntemi olan PCR ile saptanması ve bu türlerin filogenetik konumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji ve Entomoloji Laboratuvarı ve Georgia Üniversitesi Poultry Science Bölümü Laboratuvar'larında yürütülmüştür.

2.1. Gereç

2.1.1. Dışkı Örnekleri

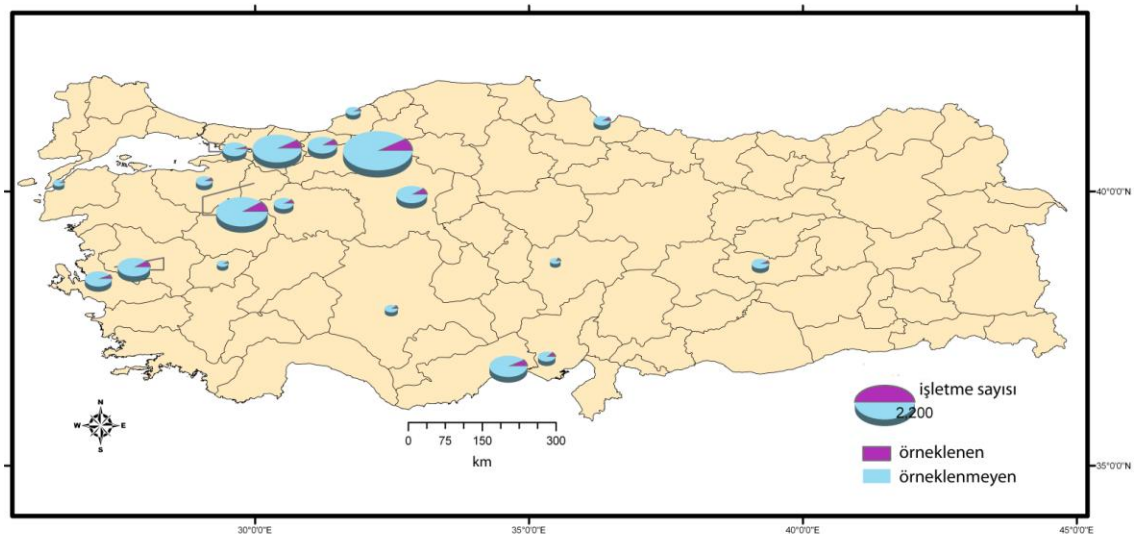
Çalışmanın materyalini, TÜBİTAK tarafından desteklenen 105 O 451 no'lu "Kanatlı Coccidiosisine Karşı Oocystlerin İrradiye Edilmesi Esasına Dayalı Aşı Üretimi" isimli proje kapsamında toplanan dışkı ve altlık örnekleri oluşturdu. Örneklem genişliği Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı ile belirlendi.

Tarım Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü 2004 yılı verilerine göre, Türkiye'de broiler üretimi yapan toplam 9 758 işletme ve 12 652 broiler kümesi bulunmaktadır. Çalışmada popülasyon Türkiye'deki tüm broiler üretimi yapan kümesler olarak belirlenmiş; broiler yetiştiriciliği yapılan bölgeler, bölgeyi temsil eden iller ve her ili temsil edecek broiler kümes sayıları saptanmıştır. Buna bağlı olarak örneklem genişliği, coğrafi bölgelere tabakalı rastgele örnekleme yöntemi ve genişliğe orantılı olasılıkla seçilen illerden rastgele seçilecek 1 200 kümes olarak belirlenmiştir. Çalışmanın örneklem genişliği 0.02 duyarlılık düzeyinde ve Türkiye'deki toplam broiler kümes sayısının %10'unu kapsayacak şekildedir. İşletmelerle önceden iletişime geçilerek ziyaret planı oluşturulmuş ve Eylül 2006-Eylül 2007 tarihleri arasında bu kümeslere gidilerek, yaşları 1 ile 50 gün arasında değişen broilerlerden dışkı örnekleri alınmıştır. İllerdeki toplam ve

örnek alınan kümes sayıları Çizelge 2.1.'de, oranları ise Şekil 2.1.'deki harita üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. İllerdeki toplam ve örnek alınan broiler kümes sayıları.

Bölge	İl	Toplam Kümes Sayısı	Örnek Alınan Kümes Sayısı
Akdeniz Bölgesi	MERSİN	970	95
	ADANA	250	25
Ege Bölgesi	İZMİR	535	55
	MANİSA	744	75
	UŞAK	122	10
İç Anadolu Bölgesi	ANKARA	671	70
	ESKİŞEHİR	313	30
	KONYA	151	15
	KAYSERİ	104	10
Karadeniz Bölgesi	BOLU	2804	280
	DÜZCE	631	65
	SAMSUN	237	25
	ZONGULDAK	191	20
Marmara Bölgesi	BALIKESİR	1676	170
	SAKARYA	1532	150
	KOCAELİ	447	45
	BURSA	231	25
	ÇANAKKALE	123	15
Doğu Anadolu Bölgesi	ELAZIĞ	247	20
	TOPLAM	**11 979**	**1 200**



Şekil 2.1. İllerdeki toplam ve örnek alınan broiler kümeslerin oranları (ESRI, 2009).

Laboratuvara getirilen 1 200 örnekten 90'ında, nakil ve laboratuvar çalışmaları aşamasında meydana gelen kayıplara bağlı olarak, parazitolojik muayene yapılamamış ve çalışma dışı bırakılmıştır.

2.1.2. Oocystlerin Toplanması, Sporlandırılması ve Dışkıdan Arındırılmasında Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- **Laboratuvar Malzemeleri**

  - Plastik dışkı kabı (100 ml)
  - Pens ve spatül
  - Cam baget
  - Pastör pipeti
  - Falkon tüp (50 ml)
  - Elek (gözenek büyüklükleri: 1000, 250, 85 µm)
  - Santrifüj (Sigma, 6-15)
  - Işık mikroskobu (Leica CME)
  - Hassas Terazi (Sartorius)
  - Beher
  - Manyetik karıştırıcı (IKAMAG^{R} RCT)
  - McMaster lamı
  - Buzdolabı (Altus, AL 345,+4 °C)
  - Soğutucu (Şenocak, -20 °C)

- **Kimyasal Maddeler**

  - Doymuş şekerli su
  - Doymuş tuzlu su
  - Distile su

- ❖ Potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$)
- ❖ Çamaşır suyu (sodyum hipoklorit, % 4 chlorine)
- ❖ Buz

2.1.3. Genetik Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

2.1.3.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- **Laboratuvar Malzemeleri**

  - ❖ Hassas Terazi (Mettler Toledo)
  - ❖ Su Banyosu (Precision)
  - ❖ Santrifüj (Sigma-202MK)
  - ❖ Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Ikamag® RCT)
  - ❖ Soğutucu-Dondurucu Kombinasyonları (+ 4/-20 ^{o}C, VWR, USA)
  - ❖ Vortex (Vortex-Genie 2, USA)
  - ❖ Otomatik Pipet (10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Eppendorf-Reference)
  - ❖ Pipet Ucu ((10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Cornig Incorperated)
  - ❖ Ependorf Tüp (1.5 – 2.0 ml, QIAGEN GmbH)
  - ❖ Erlenmayer (200 ml, Cole-Parmer®)
  - ❖ Mezür (100 ml, Cole-Parmer®)

- **Kimyasal Maddeler**

  - ❖ QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Ürün Kodu: 51 504)
  - ❖ SDS (%10, Sodium Dodecyl Sulfate, AMRESCO, Ürün Kodu:E719)
  - ❖ Proteinase K (10 ml, >600 mAU/ml, QIAGEN, Ürün Kodu: 19133)

- HCl (Hidroklorik asit, AMRESCO, Ürün Kodu: K831-2G)
- Tris Base (AMRESCO, Ürün Kodu: 0497)
- EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit, 0,5 M, AMRESCO, Ürün Kodu: E177)

2.1.3.2. DNA Ölçümlerinde Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- Spektrometre (ND-1000 Spectrometer NanoDrop)
- Bilgisayar (Dell)
- EB buffer (Qiagen)
- Distile su

2.1.3.3. PCR'da Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- **Laboratuvar Malzemeleri**

- Thermocycler (Applied Biosystems Veriti, USA)
- Soğutucu-Dondurucu kombinasyonları (+ 4/-20 ^{o}C, VWR, USA)
- Vorteks (Vortex-Genie 2, USA)
- Otomatik Pipet (10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Eppendorf-Reference)
- Pipet Ucu ((10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Cornig Incorperated)
- PCR reaksiyon tüpü (QIAGEN GmbH)
- Ependorf Tüp (1.5 – 2.0 ml, QIAGEN GmbH)

- **Kimyasal Maddeler**

- Boncuk (Bead) (1.5 mM Mg Cl_2, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL, 200 mM x4 dNTP, ± 2.5 U pure Taq DNA polymerase; GE Healthcare UK, Ürün Kodu: 27-9559-01)
- Primer F (BSEF, MGIF DNA, 38 813 pmol)
- Primer R (BSER, MGIF DNA, 37 081 pmol)

- Primer F (EAF2, MGIF DNA, 38 763 pmol)
- Primer R (EAR3, MGIF DNA, 43 061pmol)
- Primer F (EMaF, MGIF DNA, 36 403 pmol)
- Primer R (EMaR, MGIF DNA, 36 027 pmol)
- Primer F (EmiF2, MGIF DNA, 44 192 pmol)
- Primer R (EmiR3, MGIF DNA, 30 013 pmol)
- Primer F (EPF2, MGIF DNA, 34 983 pmol)
- Primer R (EPR3, MGIF DNA, 32 915 pmol)
- Primer F (EBF5, MGIF DNA, 39 995 pmol)
- Primer R (EBR3, MGIF DNA, 40 385 pmol)
- Primer F (ENF4, MGIF DNA, 40 351 pmol)
- Primer R (ENR3, MGIF DNA, 43 241pmol)
- Primer F (ETF2, MGIF DNA, 48 092 pmol)
- Primer R (ETR, MGIF DNA, 48 046 pmol)
- Pozitif DNA, *E. acervulina* (170 ng/µl,National Veterinary Institute, İsveç)
- Pozitif DNA, *E. brunetti* (45 ng/µl, National Veterinary Institute, İsveç)
- Pozitif DNA, *E. maxima* (200 ng/µl, National Veterinary Institute, İsveç)
- Pozitif DNA, *E. mitis* (875 ng/µl, National Veterinary Institute, İsveç)
- Pozitif DNA, *E. necatrix* (265 ng/µl, National Veterinary Institute, İsveç)
- Pozitif DNA, *E. praecox* (40 ng/µl, National Veterinary Institute, İsveç)
- Pozitif DNA, *E. tenella* (140 ng/µl, National Veterinary Institute, İsveç)
- DNase-RNase içermeyen su (1000 ml, Qiagen)

2.1.3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- **Laboratuvar Malzemeleri**

  - Hassas Terazi (Mettler Toledo)
  - Mikrodalga Fırın (GE Profile)

- ❖ Elektroforez Cihazı (Bio-Rad Power Pac Basic)
- ❖ Güç Kaynağı (Biometra- Pack P25)
- ❖ Transilluminatör (Biospectrum MultiSpectral Imaging System UVP)
- ❖ Dijital kamera ve Ölçüm Düzeneği-PC (Launch Vision Works LS)
- ❖ UV Koruyucu gözlük (UVP, Upland, CA)
- ❖ Soğutucu-Dondurucu kombinasyonları (+ 4/-20 °C, VWR)
- ❖ Otomatik Pipet (10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Eppendorf-Reference)
- ❖ Pipet Ucu ((10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Cornig Incorperated)
- ❖ Parafilm (American National Can™)
- ❖ Mezür (50 - 100 ml, Cole-Parmer®)
- ❖ Erlenmayer (200 ml, Cole-Parmer®)

- **Kimyasal Maddeler**

- ❖ Ethidium bromid (10 mg/ml, Sigma)
- ❖ Agarose (Prona-E.U)
- ❖ Tris-Borat-EDTA (TBE, 5 X Promega, USA)
- ❖ Loading Dye (Gel Pilot Loading Dye, 5x Qiagen)
- ❖ 10X FastDigest® Green Buffer (Fermentas, Ürün Kodu: FD0274)
- ❖ DNA Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas)
- ❖ Distile su

2.1.3.5. Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- **Laboratuvar Malzemeleri**

- ❖ Güç Kaynağı (Biometra- Pack P25)
- ❖ Transilluminatör (Biospectrum MultiSpectral Imaging System UVP)
- ❖ Dijital kamera ve Ölçüm Düzeneği-PC (Canon TV 200M)

- ❖ UV Koruyucu Gözlük (UVP)
- ❖ Otomatik Pipet (10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Eppendorf-Reference)
- ❖ Pipet Ucu ((10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Cornig Incorperated)
- ❖ Vorteks (Vortex-Genie 2)
- ❖ Hassas Terazi (Mettler Toledo)
- ❖ Dondurucu (-20 °C, VWR)
- ❖ İnkubatör (VWR Digital Heatblock)
- ❖ Santrifüj (Eppendorf S415 R)
- ❖ Ependorf tup (1,5 ml)
- ❖ Jilet (Single Edge Razor Blades N:9)

- **Kimyasal Maddeler**

- ❖ Qiaquick Jel extraksiyon kiti (Qiagen, Ürün Kodu: 28706)

2.1.3.6. Klonlamada Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- **Laboratuvar Malzemeleri**

- ❖ Güç Kaynağı (Biometra- Pack P25)
- ❖ Transilluminatör (Biospectrum MultiSpectral Imaging System UVP)
- ❖ Dijital kamera ve Ölçüm Düzeneği-PC (Canon TV 200M)
- ❖ UV Koruyucu Gözlük (UVP)
- ❖ Otomatik Pipet (10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Eppendorf-Reference)
- ❖ Pipet Ucu ((10µl – 20 µl - 200µl – 1000 µl, Cornig Incorperated)
- ❖ Vorteks (Vortex-Genie 2)
- ❖ Çalkalayıcı (Max Q 4000)
- ❖ Su Banyosu (Precision)
- ❖ Soğutucu-Dondurucu (+4/-20/-80 °C, VWR)
- ❖ Ependorf tüp (1,5 ml)
- ❖ Petri (VWR petri dish, 100x15 mm)

- Pasteur pipeti
- Isı kaynağı
- Kürdan
- Inkubatör (VWR)
- Cam tüp (18x150 mm, VWR)
- Isıtıcı blok (VWR Digital Heatblock)
- Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415 R)

- **Kimyasal Maddeler**

- PCR Cloning*plus* Kit (Qiagen^{R}, Ürün Kodu 231224)
- Gene Jet^{TM} Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Ürün Kodu: K0503)
- IPTG solution(100 mM, Fermentas, Ürün Kodu: R1171)
- Xgal solution(20 mg/ml, Fermentas, Ürün Kodu: R0941)
- Luria Bertani (LB) agar (1000 ml: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar)
- LB buffer (1000 ml: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl)
- Carbenicillin (100 mg / ml)
- Buz
- EcoRI Enzyme (FastDigest® EcoRI, 800 µl, Ürün Kodu: FD0274, Fermentas)
- 10 x Buffer (10X FastDigest® Buffer, Ürün Kodu: FD0274, Fermentas)
- Vortex (Vortex-Genie 2)
- Su banyosu (37 °C, Precision)

2.2. Yöntem

2.2.1. Sahadan Dışkı ve Altlık Örneklerinin Toplanması

Dışkı örnekleri, sürüyü temsil edecek şekilde kümesin farklı noktalarından pens yardımıyla toplandı. Dışkı örneklerinin taze olmasına, ishalli örneklerin yanı sıra normal görüntülü dışkılardan da alınmasına dikkat edildi. Altlık örnekleri ise kümes zemininin farklı kesimlerinden, spatül ile kazınarak toplandı. Toplanan örneklerin her biri 100 mililitre (ml) hacimli plastik dışkı kaplarına konarak, ağızları kapatıldı. Kapların üzerine protokol numaraları, hayvanların yaşı, dışkı örneğine ilişkin notlar yazılıp buz sandığına yerleştirilerek laboratuvara getirildi. Numuneler parazitolojik yönden incelenene kadar +4 °C'de saklandı.

2.2.2. Dışkı Örneklerinin Modifiye McMaster Yöntemi ile İncelenmesi

Anabilim Dalı Protozooloji ve Entomoloji laboratuvarında geliştirilen modifiye arındırma yöntemi (Karaer ve ark, 2009) uygulanarak örnekler *Eimeria* oocystleri yönünden incelendi. Bu yönteme göre, boş bir dışkı kabının darası alındıktan sonra dışkı ve altlık dolu kap tartılarak içindeki dışkı miktarı kaydedildi. Daha sonra örnek behere alınarak üzerine $1x10^3$ ml çeşme suyu eklendi. Karışım iyice homojenize edilene dek manuel çırpıcı ile karıştırıldı ve gözenek aralığı 1 mm olan süzgeçten geçirilerek kaba partiküller ayrıldı. Karışım darası alınan bir behere aktarıldı, tartıldı ve ağırlığı kaydedildi. Karışımın yoğunluğuna göre, gerektiği durumlarda çeşme suyu eklenerek karıştırıldı ve sırasıyla, gözenek aralığı 250 ve 85 µm'lik süzgeçlerden geçirildi.

Santrifüj godelerine aktarılan süzüntü, 2 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülürken dipteki tortuya 100 ml çeşme suyu eklenerek homojinasyonu sağlandı. Daha sonra, 1 gr dışkıda bulunan oocyst sayısının

hesaplanmasında modifiye McMaster yönteminden yararlanıldı (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986). Buna göre, behere aktarılan bu yeni karışımdan, içinde 4 gr dışkı barındıracak hacimde sıvı alınarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve 2 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülürken dipteki çökelti temiz bir dışkı kabı içinde, 56 ml doymuş tuzlu su ile pipetlenerek homojenize bir karışım elde edildi. Pastör pipeti ile bu karışımdan alınarak McMaster lamının her iki gözü dolduruldu. Oocystlerin yüzeye çıkması için 5 dakika beklendikten sonra ışık mikroskobun 10'luk objektifi altında, McMaster lamının 1'er cm^2 hacmindeki her iki odasında bulunan oocystlerin tamamı sayıldı. Bir gr dışkıda bulunan oocyst sayısı, aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\mathbf{X=}\ \frac{\text{Toplam oocyst sayısı}}{0{,}15} \times \frac{\text{Örneğin hacmi (ml)}}{\text{Örnekteki dışkı miktarı (gr)}}$$

X: 1 gr dışkıda bulunan toplam oocyst sayısı
0,15: McMaster lamının bir bölmesinin hacmi
Örnekteki dışkı miktarı: 4 g
Örneğin hacmi: 60 ml

2.2.3. Türkiye Oocyst İnokulumunun Hazırlanması

Bir işletmeye ait kümeslerin hepsinde, gerek yetiştiricilik uygulamalarında gerekse korunma ya da tedavi amaçlı kimyasal uygulamalarında tek örneklik söz konusudur. Bu nedenle, 624 adet pozitif örnekten önce işletme bazında total inokulumlar oluşturuldu, daha sonra da bunların uygun şekilde biraraya getirilmesi ile total Türkiye inokulumu hazırlandı.

İlk etapta, arındırma protokolüne tabi tutulmuş ve gram dışkıdaki oocyst sayısı hesaplanmış dışkı karışımlarından oocyst yoğunlukları dikkate alınarak uygun miktarlarda alındı. Bu uygulamada, az sayıda oocyst içeren numunelerden örnek alınırken dışkı karışım miktarının daha fazla, yoğun oocyst sayısına sahip

numunelerde ise daha az oranda karışım alınıp oocyst profillerinin eşitlenmesine özellikle dikkat edildi. İşletme içinde oluşturulan total inokulumdan, ortalama olarak ml'de $1x10^6$ oocyst içerecek miktar alınıp, Türkiye inokulumu oluşturmak üzere bir başka behere aktarıldı. Toplam oocyst sayısı $1x10^6$'dan az olan inokulumların tamamı Türkiye inokulumuna eklendi.

İşletme bazında oluşturulan inokulumlardaki oocyst profiline ilişkin değerlendirme yapabilmek için inokulumlardan örnek alınarak, modifiye McMaster yöntemi ile ışık mikroskobu altında incelendi. Oocystlerin tür tayininde morfolojik kriterler göz önünde bulunduruldu.

Sonuç olarak, Türkiye genelindeki 18 ilde yer alan 40 işletmeye ait 40 inokulumdan uygun miktardaki dışkı karışımları alınıp total bir inokulum elde edildi. İnokuluma potasyum dikromat (%2) eklenerek, yaklaşık 5-6 gün laboratuvar ortamında sporlanmaya bırakıldı. Sporlanma için uygun ısı ve nem sağlanırken (% 80-90 nem, 18-22 °C), oksijen ihtiyacını karşılamak için inokulum gün içinde sık sık bagetle karıştırıldı. Günlük olarak sporlanma oranı takip edilen inokulum, bu sürenin sonunda, oocyst toplama ve dışkıdan arındırma uygulaması yapılana kadar buzdolabında (+4 °C'de) saklandı.

2.2.4. Oocystlerin Dışkıdan Toplanması ve Arındırılması

Oocystlerin dışkıdan toplanması ve arındırılmasında, Kaya (1998)'nın kullandığı tekniklerden yararlanıldı. Buna göre, potasyum dikromattan arındırmak için total oocyst inokulumu santrifüj edilerek (2000 g, 4 °C, 10 dk) süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işleme süpernatantın rengi şeffaflaşıncaya kadar devam edildi. Son santrifüjün ardından, sediment üzerine doymuş tuzlu su eklenerek homojenize edildi. Daha sonra falkonlara aktarılarak santrifüj işlemi tekrarlandı. Santrifüj sonrası yüzeyde toplanan oocystler pipetle toplanıp temiz bir falkona

aktarıldı. Oocyst toplama prosedürü her falkonda en az 3 kere tekrarlandı. Toplanan oocystler tuzdan arındırmak için, çeşme suyu ile 1:10 oranında sulandırılarak santrifüje edildi. Oocyst çöküntüsünü hareket ettirmeden süpernatant yavaşça dökülürken, sediment az miktarda su ile karıştırılarak yeni bir falkonda biriktirildi.

Toplanan oocystleri dışkıdan arındırarak sterilizasyon sağlamak ve oocyst dış duvarına hasar vererek DNA izolasyonuna katkıda bulunmak amacıyla, oocyst karışımı sodyum hipoklorit (%11 chlorine) ile muamele edildi. Bu amaçla, su ile karışım halinde bulunan oocystler 50 ml'lik falkon tüplere transfer edildi. Burada sodyum hipoklorit (1:3 oranında) ile dilüe edilerek buz kalıbı üzerinde 1 saat bekletildi. Falkon tüpler her 5-10 dk'da ters düz edilerek karıştırılıp, tekrar buz üzerinde bekletildi. Daha sonra karışım santrifüj (1 000 g, 4 °C, 5 dk) edildi ve üst kısım döküldükten sonra dipteki oocystler su ile yıkanarak kalan sodyum hipoklorit uzaklaştırıldı. Steril, temiz oocystlerin üzerlerine distile su ve % 2 oranında potasyum dikromat eklenerek, DNA izolasyonunda kullanılana dek +4 °C'de saklandı.

2.2.5. DNA İzolasyonu

Oocystlerden DNA elde edilmesinde, Kaya (1998)'nın kullandığı yöntem uygulandı. Bu yönteme göre, DNA extraksiyonu için total oocyst inokulumundan ml'de $5x10^8$ oocyst içerecek şekilde örnek alındı ve potasyum dikromatı uzaklaştırmak üzere 4-5 kez suyla yıkandı. Oocyst inokulumundan 10 µl ($5x10^5$ oocyst/µl) alınarak, içinde 35 µl doymuş tuzlu su bulunan ependorf tüpe aktarıldı. Bu karışım 55 $^{\circ}$C'lik su banyosunda, her 15 dakikada hafifçe karıştırılmak koşuluyla, 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Devamında oocyst duvarının protein yapısındaki iç katmanının sindirimini sağlamak amacıyla, karışıma 300 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA ph:8), 3 µl % 10'luk SDS ve 10 µl

proteinaz K eklenerek 37 °C'lik su banyosunda 1 saat inkube edildi. Bu sürenin sonunda, Haug ve ark. (2007) tarafından açıklanan "Modifiye Stoolkit protokolü" kullanılarak DNA extraksiyonu yapıldı.

Bu modifiye yönteme göre, oocyst karışımından 10 µl alınarak üzerine 90 µl CLB (Cell Lysis Buffer) ve 700 µl ASL buffer eklenerek 1 dk süreyle vortekslendi. Oda sıcaklığında 2 saat bekletilen örnek, 95 °C'lik su banyosunda 5 dk inkubasyonun ardından 15 s karıştırılıp, 13 500 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı ve içine Inhibitex tabletinin yarısı konup tablet tamamen çözünene kadar vortekslendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkubasyona bırakılan örnek daha sonra 13 500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Supernatant, içinde 1,5 µl proteinaz K bulunan yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. İçine 300 µl AL buffer eklenip 15 s vortekslendi. Örnek daha sonra 70 °C'lik su banyosunda 10 dk inkube edildi. İnkubasyon sonrası tüpün içine % 99'luk etanol eklendi ve vortekslendi. İki seferde spin columna aktarılan örnek, her seferinde 13 500 rpm'de 1 dk santrifüj edilip filtrat döküldü. Son santrifüj sonrası spin column üzerine 500 µl AW1 eklenip, yine 13 500 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtratın dökülmesinin ardından 500 µl AW2 spin columna aktarılıp 13 500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Yeni bir ependorf tüpe aktarılan spin column üzerine, membranın merkezine gelecek şekilde 100 µl AE buffer eklenip 13 500 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Ependorf tüpte bulunan 100 µl DNA örneği PCR'da kullanılana kadar – 20 °C'de saklandı.

2.2.6. DNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile DNA miktar ölçümü yapıldı ve kayıt altına alındı.

2.2.7. PCR Yöntemi

DNA izolasyon ürünü ile hem tür spesifik PCR, hem de herhangi bir türün az sayıda oocystinin bulunması ihtimaline karşılık Nested PCR uygulandı. Her iki PCR'da da pozitif kontrol olarak İsveç, National Veterinary Institute, Viroloji-İmmunobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü'nden alınan tür spesifik DNA'lar kullanılırken, negatif kontrollere DNase-RNase içermeyen su kondu.

2.2.7.1. Klasik PCR

Tür spesifik primerler kullanılarak DNA örneğindeki spesifik sekansların üretilmesi amacı ile klasik PCR yapıldı. Ribozomal DNA (rDNA)'nın "Internal Transcribed Spacer 1" (ITS1) bölgesini amplifiye eden spesifik primerler aşağıda Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Klasik PCR'da kullanılan tür spesifik primerler (Haug ve ark., 2007).

Tür	Primer Adı	Primer Sekansı 5'→3'	Amplikon Uzunluğu (bp)	Annealing Sıcaklığı (°C)
E. acervulina	EAF2	5'-GGGCTTGGATGATGTTTGCTG-3'	145	65
	EAR3	5'-GCAATGATGCTTGCACAGTCAGG-3'		
E. brunetti	EBF5	5'-CTGGGGCTGCAGCGACAGGG-3'	183	58
	EBR3	5'-ATCGATGGCCCCATCCCGCAT-3'		
E. maxima	EmaF	5'-GTGGGACTGTGGTGATGGGG-3'	205	65
	EmaR	5'-ACCAGCATGCGCTCACAACCC-3'		
E. mitis	EmiF2	5'-GTTTATTTCCTGTCGTCGTCTCGC-3'	330	65
	EmiR3	5'-GTATGCAAGAGAGAATCGGGATTCC-3'		
E. necatrix	ENF4	5'-AGTATGGGCGTGAGCATGGAG-3'	160	58
	ENR3	5'-GATCAGTCTCATCATAATTCTCGCG-3'		
E. praecox	EPF2	5'-CATCGGAATGGCTTTTTGAAAGCG-3'	215	65
	EPR3	5'-GCATGCGCTAACAACTCCCCTT-3'		
E. tenella	ETF2	5'-AATTTAGTCCATCGCAACCCTTG-3'	278	65
	ETR	5'-CGAGCGCTCTGCATACGACA-3'		

Reaksiyonda kullanılan primerler, MGIF (Georgia, USA) laboratuvarından sağlandı. Liyofilize halde gelen primerlere 100 µl DNase-RNase içermeyen su eklenip, spektrometre ile pmol/µl değerleri hesaplandı. Ardından, pmol/µl değeri bilinen stok primerlerden, çalışmada kullanmak üzere 5 pmol/µl yoğunluğunda yeni primer sulandırmaları elde edildi. Hem stok hem de sulandırma primerler (5 pmol/µl) –20 °C'de muhafaza edildi.

PCR'da tekniğin diğer bileşenlerinden dNTP'ler, Taq polimeraz enzimi, buffer ve Mg ayrı ayrı konmayıp, bunların hepsini içeren boncuk kullanıldı.

Reaksiyon 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Her bir örnek için forward primer (1 µl), reverse primer (1 µl), boncuk (1 adet), kalıp DNA (2 µl) ve DNase-RNase içermeyen su (21 µl) kullanıldı. PCR tüpleri içindeki master mix, 3-4 saniye santrifüj edildikten sonra thermocycler içine yerleştirildi. Tür spesifik PCR için thermocyclerda, Georgia Üniversitesi Poultry Science Bölümü'nde optimize edilen program uygulandı (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. Klasik PCR programı.

Ön denatürasyon	95 °C	5 dk	1 tekrar
Denatürasyon	95 °C	15 s	
Annealing	58 / 65 °C	30 s	40 tekrar
Extension	72 °C	30 s	
Son Extension	72 °C	10 dk	1 tekrar

2.2.7.2. Nested PCR

İnokulumda az sayıda oocyst bulunması olasılığına bağlı, klasik PCR ile saptanmayan türler için Nested PCR uygulandı. PCR'ın ilk basamağında, Schnitzler ve ark. (1998) tarafından açıklanan, rDNA'nın ITS1 bölgesini amplifiye eden soy spesifik primerler (MGIF, Georgia, USA) kullanıldı (Çizelge 2.4.). İkinci basamak PCR'da primer olarak yine Haug ve ark. (2007)'nın dizayn ettiği primerler (MGIF, Georgia, USA) kullanıldı.

Çizelge 2.4. Soy spesifik primerler (Schnitzler ve ark., 1998).

Soy	Primer Adı	Primer Sekansı (5'→3')
Eimeria	BSEF	5'-CTG TGA ATT CAT CGG A-3'
	BSER	5'-ATC GCA TTT CGC TGC GTC CT-3'

Stok primerlerden 5 pmol/ µl konsantrasyonunda primer sulandırması yapılırken; dNTP'ler, Taq polimeraz enzimi, buffer ve Mg içeren boncuk kullanıldı.

Reaksiyon 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Her bir örnek için soy spesifik forward primer (1 µl), soy spesifik reverse primer (1 µl), boncuk (1 adet), kalıp DNA (2 µl) ve DNase-RNase içermeyen su (21 µl) kullanıldı. PCR tüpleri içindeki master mix 3-4 saniye santrifüj edildikten sonra thermocycler içine yerleştirildi. Soy spesifik PCR için thermocyclerda, Georgia Üniversitesi Poultry Science Bölümü'nde optimize edilen program uygulandı (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2.5. Nested PCR programı.

Ön denatürasyon	95 °C	5 dk	1 tekrar
Denatürasyon	95 °C	15	
Annealing	45 °C	30 s	40 tekrar
Extension	72 °C	30 s	
Son Extension	72 °C	10 dk	1 tekrar

İlk basamağın ardından tür spesifik primerler kullanılarak 2. basamak PCR uygulandı. Burda kalıp DNA olarak, Nested PCR'ın ilk basamağında elde edilen DNA amplikasyonları (1 µl) kullanıldı. Kontaminasyonun olmadığını doğrulamak için de 2 negatif kontrol kullanıldı. Birinci negatif kontrole DNase-RNase içermeyen su (1 µl) konurken, 2. negatif kontrole 1. basamak PCR'ın negatif kontrol ürününden 1 µl kondu.

Buna göre 2. basamak PCR'da tür spesifik forward primer (1 µl), tür spesifik reverse primer (1 µl), boncuk (1 adet), kalıp DNA (1 µl) ve DNA-RNA içermeyen su (22 µl) kullanıldı. Tüm bileşenler PCR tüplerine konduktan sonra

tüpler 3-4 saniye santrifüj edilip thermocycler içine yerleştirildi. Thermocyclerda tür spesifik PCR'da kullanılan program uygulandı.

2.2.8. Agaroz Jel Elektroforezi ve Spesifik Bantların Görüntülenmesi

PCR ürününün jel elektroforezde yürütülmesi amacı ile % 1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, 1,5 g agaroz tartılıp, 100 ml 1xTBE buffer içerisine eklendi. Karışım mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürüldü ve jel haline getirildi. Daha sonra dışarı alınan jelin 2-3 dk soğuması beklendi. Jel üzerine 5 µl ethidium bromid solüsyonu ilave edilip hafifçe çalkalanarak jelde dağılması sağlandı. Jelin soğuması için 1-2 dk daha beklendikten sonra elektroforez tankına uygun taraklar yerleştirildi. Hava kabarcığı oluşturmayacak biçimde, tankın bir kenarından jel yavaşça döküldü. Yaklaşık 20-25 dk jelin donması beklendikten sonra taraklar çıkarıldı. Tank 1xTBE buffer ile, jelin tamamı sıvı içinde kalacak şekilde dolduruldu. Jelin 1. gözeneğine 10 µl DNA marker, sonra sırayla negatif kontrol, örnekler ve pozitif kontrole ait amplifiye DNA'lar (6 µl loading dye+20 µl PCR ürünü) kondu. Elektroforez güç kaynağı 100 Volt (V)'a ayarlandı, bantlar jelin sonuna 2-3 cm kadar yaklaştıklarında yürütme sonlandırıldı.

Elektroforez işlemi sonunda, jelde bulunan bantlar transilluminatörde UV altında görünür hale getirilip, dijital görüntüleme düzeneği ile fotoğrafları çekildi.

2.2.9. PCR Ürünün Jelden Ekstraksiyonu

Tür spesifik DNA ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile görüntülenip doğrulandıktan sonra, bantlar QIAquick jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) ile üretici talimatlarına

uygun olarak pürifiye edildi. Ekstraksiyon ürünleri klonlama prosedürüne kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.10. Gen Klonlama

Klonlama prosedürüne başlamadan önce carbenicillin (100 mg/ml) ve LB agar içeren bir petri alınarak bir köşesine 20 µl Xgal, karşı tarafına da 100 µl ITPG kondu. Sıcaklık ile L şekli verilmiş pasteur pipeti kullanılarak, bu iki kimyasal agar yüzeyine yayıldı. Petri 37 °C'lik inkubatöre kaldırıldı.

PCR cloning kit (Qiagen) protokolü, üretici talimatları doğrultusunda uygulandı. Buna göre, ilk önce ligasyon (bağlanma) karışımı hazırlandı. Ependorf içine 1 µl vektör, 4 µl jel ekstraksiyon ürünü ve 5 µl ligasyon master mix konup yavaşça pipetlenerek karıştırıldı. Bu karışım +4 °C'de yarım saat bekletildi. Kitle gelen ve -80 °C'de saklanan *E. coli*'ler buz dolu kovaya yerleştirildi. İnkubatürdeki ligasyon karışımından 2 µl alınıp *E. coli* içeren ependorf tüpüne kondu. Bir kaç fiske vuruşuyla hücrelerin karışımı sağlandıktan sonra ependorf tüp buz içinde 5-10 dk bekletildi. Daha sonra 42 °C'lik su banyosunda 30 saniye tutulan karışım tekrar buz üzerinde 5 dk bekletildi. Bu süre sonunda, SOC mediumdan 185 µl alınarak her örneğe eklendi. Son karışımdan 100 µl alınarak, 37 °C'de bekletilen petrinin ortasına pipetle kondu. Isı ile şekil verilmiş pasteur pipeti kullanılarak petri yüzeyine yayıldı. Petri ters çevrilerek 37 °C'lik inkubatörde 1 gece bekletildi.

Ertesi gün inkubatörden alınan petri, mavi beyaz kolonilerin daha iyi gürülebilmesi için bir kaç saat +4 °C'de bekletildi. Petride oluşan mavi koloniler vektöre DNA'nın girmediği, beyaz koloniler ise vektöre DNA girdiği şeklinde yorumlandı.

Petri yüzeyindeki beyaz koloniler kürdan yardımıyla toplanarak klonlama prosedürüne devam edildi. Cam tüplere 1:1000 oranında carbenicillin ve LB buffer kondu. Kürdan ucu tek bir beyaz koloniye dokundurulduktan sonra, kürdan cam tüp içine atıldı. Tüpler bir gece boyunca 37 °C'de, 200-300 rpm'de çalkalanmak üzere bırakıldı.

Ertesi gün, tüplerde bulanıklaşma olması ile bakteri üremesi doğrulandı. Tüp içindeki sıvı bir kaç defada santrifüj edilerek *E. coli*'ler dipte biriktirildi. Daha sonra çökeltide yer alan bakterilerden plasmid DNA'sını ayırmak ve elde etmek için Gene Jet Plasmid Miniprep kiti (Fermentas) üretici talimatlarına göre uygulandı. Sonuçta 50 µl plasmid DNA'sı elde edildi ve -20 °C'de saklandı.

2.2.11. DNA Miktarının Belirlenmesi

Klonlama ile çoğaltılan spesifik DNA ürünlerinin, 260 nm dalga boyunda, spektrofotometre ile miktar ölçümü yapıldı.

2.2.12. Restriksiyon Enzimi ile Plazmidin Kesilmesi

Bakteri üremesi ile çoğaltılan plazmid enzim bağlantı noktalarından kesilerek, PCR ürününün vektörden ayrılması sağlandı. Bu amaçla, DNA miktarları bilinen örneklerden totalde 800 nanogram (ng) olacak şekilde pipetle alınarak ependorf tüpüne kondu. Buna, 2 µl 10x buffer, 1 µl EcoRI enzimi ve toplamda 20 µl olması sağlanacak şekilde distile su eklendi. İyice vortekslenen karışım, 37 °C'lik su banyosunda 30 dk bekletildi. Bu süre sonunda plazmidin kesilip DNA'nın serbest kalmasını kontrol etmek amacıyla, karışım %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.2.13. Agaroz Jel Elektroforez ve Spesifik Bantların Görüntülenmesi

Agaroz jel, daha önce 2.2.8'de açıklandığı şekilde hazırlandı. Farklı olarak, %1'lik agaroz jel için 1 g agarose tartılıp, 100 ml 1xTBE buffer içine eklendi. Jelin ilk güzüne 5 µl marker, sonraki göze ise örnekten 10 µl alınarak 2 µl loading dye ile karıştırılıp yüklendi. Elektroforez güç kaynağı 100 V'a ayarlandı, bantlar jelin sonuna 2-3 cm kadar yaklaştıklarında yürütme sonlandırıldı.

2.2.14. Sekans Analizine Gönderilecek Örneklerin Hazırlanması

Sekans analizi için gönderilecek numunelerin totalde 15 µl olması ve µl'sinde 150 ng DNA olması istenmektedir. Buna göre, DNA miktarları bilinen örneklerde sulandırma yapılarak örnekler hazırlandı.

2.2.15. Sekans Analizi

Sekans analizi için örnekler Georgia Üniversitesi, Molecular Genetics Instrumentation Facility (MGIF) laboratuvarına gönderildi.

2.2.16. Nükleotid Dizi Eşleme ve Filogenetik Analiz

Nükleotid dizi analizi sonrası elde edilen sonuçlar ile BLAST veri tabanından indirilen referans suşlar arasında düzenleme ve sıralama, Bioedit 7.0.5.3 (Hall ve ark., 1999) programı ile yapıldı. Fasta formatında toplanan tüm verilerin filogenetik analizini yapmak ve filogenetik ağaç oluşturmak için MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı kullanıldı. Bu programda neighbour-joining analizi yapıldı ve bootstraping değerleri filogenetik ağaç üzerinde gösterildi.

3. BULGULAR

3.1. *Eimeria spp* Oocystlerinin Varlığı

Kümeslerden toplanan dışkı ve altlık örneklerinin, *Eimeria spp* oocystleri yönünden yapılan muayenesi sonucunda, muayene edilen 1110 kümesten 624 (% 56,2)'ünde *Eimeria spp* oocystlerine rastlandı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. *Eimeria spp* oocystlerinin varlığı.

Eimeria spp	Örnek Sayısı	Oran (%)
Negatif	486	43,8
Pozitif	624	56,2
Toplam	1110	100,0

3.2. Pozitif Örneklerin Bir Gramında Bulunan Oocyst Sayıları

Eimeria oocystleri tespit edilen örneklerde, 1 gram dışkıdaki oocyst sayılarının 50 ile 952 000 arasında değiştiği belirlendi. Numune alınan 19 ilden sadece Uşak ilinden alınan örneklerde *Eimeria* oocystine rastlanmadı. Oocyst varlığının belirlendiği kümeslerdeki hayvanların 9 ile 50 günlük yaşta olduğu saptandı. Pozitif numunelerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numaraları, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
1	Adana	1	16	100
2	Adana	1	19	1 850
3	Adana	1	31	6 800
4	Adana	1	31	20 000
5	Adana	2	34	850
6	Adana	2	34	900
7	Adana	2	35	26 300
8	Adana	2	35	400
9	Adana	2	35	25 500
10	Adana	2	35	28 700
11	Adana	2	35	3 000
12	Adana	2	35	500
13	Adana	2	35	3 350
14	Adana	2	40	1 950
15	Adana	2	40	72 650
16	Adapazarı	1	9	50
17	Adapazarı	1	14	200
18	Adapazarı	1	14	200
19	Adapazarı	1	21	1000
20	Adapazarı	1	22	112 000
21	Adapazarı	1	23	950
22	Adapazarı	1	23	5 800
23	Adapazarı	1	23	50 000
24	Adapazarı	1	23	500
25	Adapazarı	1	24	5 600
26	Adapazarı	1	24	92 200
27	Adapazarı	1	29	126 000
28	Adapazarı	1	29	215 300
29	Adapazarı	1	31	7 550
30	Adapazarı	1	32	10 450
31	Adapazarı	1	33	4 850
32	Adapazarı	1	33	58 000
33	Adapazarı	1	34	29 700
34	Adapazarı	1	35	1 200
35	Adapazarı	1	36	138 500
36	Adapazarı	1	36	1 250
37	Adapazarı	1	36	56 000
38	Adapazarı	1	36	7 300
39	Adapazarı	1	36	2 500
40	Adapazarı	1	37	3 900

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
41	Adapazarı	1	37	14 600
42	Adapazarı	1	38	50
43	Adapazarı	1	43	7 550
44	Adapazarı	2	17	650
45	Adapazarı	2	20	3 300
46	Adapazarı	2	20	700
47	Adapazarı	2	20	1 100
48	Adapazarı	2	20	150
49	Adapazarı	2	26	57 500
50	Adapazarı	2	26	400
51	Adapazarı	2	26	2 650
52	Adapazarı	2	27	3 750
53	Adapazarı	2	27	8 200
54	Adapazarı	2	28	45 000
55	Adapazarı	2	30	6 400
56	Adapazarı	2	30	200
57	Adapazarı	2	31	15 600
58	Adapazarı	2	33	32 050
59	Adapazarı	2	33	35 700
60	Adapazarı	2	34	2 300
61	Adapazarı	2	34	8 300
62	Adapazarı	2	34	4 100
63	Adapazarı	2	34	100
64	Adapazarı	2	34	15 000
65	Adapazarı	2	37	18 800
66	Adapazarı	2	37	650
67	Adapazarı	2	38	5 400
68	Adapazarı	2	43	8 400
69	Adapazarı	2	43	1 250
70	Adapazarı	2	45	9 000
71	Adapazarı	2	45	150
72	Adapazarı	2	45	4 050
73	Adapazarı	3	20	50
74	Adapazarı	3	28	150
75	Adapazarı	3	29	500
76	Adapazarı	3	33	1 550
77	Adapazarı	3	40	100
78	Adapazarı	3	40	39 400
79	Adapazarı	3	42	8 800
80	Adapazarı	3	42	1 150
81	Adapazarı	3	43	700

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
82	Adapazarı	4	22	160 300
83	Adapazarı	4	22	165 000
84	Adapazarı	4	24	5 750
85	Adapazarı	4	24	5 600
86	Adapazarı	4	27	163 000
87	Adapazarı	4	27	8 250
88	Adapazarı	4	29	36 500
89	Adapazarı	4	29	72 000
90	Adapazarı	4	33	11 150
91	Adapazarı	4	33	5 300
92	Adapazarı	4	35	8 350
93	Adapazarı	4	35	33 650
94	Adapazarı	4	35	13 050
95	Adapazarı	4	38	1 500
96	Adapazarı	4	38	3 400
97	Adapazarı	4	38	4 400
98	Adapazarı	4	38	5 400
99	Adapazarı	4	38	1 600
100	Adapazarı	4	38	7 450
101	Adapazarı	4	43	3 550
102	Ankara	1	25	100
103	Ankara	1	25	4 400
104	Ankara	1	25	300
105	Ankara	1	33	550
106	Ankara	1	35	22 000
107	Ankara	1	35	162 300
108	Ankara	1	35	3 200
109	Ankara	1	35	39 600
110	Ankara	1	35	13 100
111	Ankara	1	41	14 200
112	Ankara	1	41	43 000
113	Ankara	1	41	37 450
114	Ankara	1	41	10 100
115	Ankara	1	44	1 350
116	Ankara	1	44	950
117	Ankara	1	48	3 150
118	Ankara	2	13	200
119	Ankara	2	17	600
120	Ankara	2	19	800
121	Ankara	2	20	9 850
122	Ankara	2	20	10 200

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
123	Ankara	2	22	8 750
124	Ankara	2	22	2 700
125	Ankara	2	23	2 800
126	Ankara	2	23	3 800
127	Ankara	2	23	4 500
128	Ankara	2	24	1 450
129	Ankara	2	28	3 650
130	Ankara	2	29	8 050
131	Ankara	2	32	12 500
132	Ankara	2	32	35 650
133	Ankara	2	32	1 500
134	Ankara	2	34	86 900
135	Ankara	2	34	42 170
136	Ankara	2	34	5 400
137	Ankara	2	34	12 650
138	Ankara	2	34	75 900
139	Ankara	2	34	23 450
140	Ankara	2	35	100 250
141	Ankara	2	35	3 950
142	Ankara	2	38	34 800
143	Ankara	2	39	78 640
144	Ankara	2	39	1 280
145	Ankara	2	39	8 900
146	Ankara	2	41	9 370
147	Ankara	2	42	18 650
148	Ankara	2	43	13 550
149	Balıkesir	1	16	750
150	Balıkesir	1	16	350
151	Balıkesir	1	17	16 000
152	Balıkesir	1	20	300
153	Balıkesir	1	20	1 500
154	Balıkesir	1	24	103 750
155	Balıkesir	1	24	81 700
156	Balıkesir	1	24	86 900
157	Balıkesir	1	24	300
158	Balıkesir	1	24	76 800
159	Balıkesir	1	24	750
160	Balıkesir	1	24	55 000
161	Balıkesir	1	24	50
162	Balıkesir	1	24	10 750
163	Balıkesir	1	24	25 000

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
164	Balıkesir	1	24	3 900
165	Balıkesir	1	24	250
166	Balıkesir	1	24	24 300
167	Balıkesir	1	24	1 000
168	Balıkesir	1	24	560 000
169	Balıkesir	1	24	523 000
170	Balıkesir	1	26	436 000
171	Balıkesir	1	27	24 400
172	Balıkesir	1	27	15 400
173	Balıkesir	1	27	180 000
174	Balıkesir	1	27	224 000
175	Balıkesir	1	27	3 100
176	Balıkesir	1	27	71 200
177	Balıkesir	1	27	48 800
178	Balıkesir	1	29	103 000
179	Balıkesir	1	29	120 500
180	Balıkesir	1	29	14 000
181	Balıkesir	1	29	130 000
182	Balıkesir	1	29	3 450
183	Balıkesir	1	30	61 000
184	Balıkesir	1	30	174 000
185	Balıkesir	1	30	25 000
186	Balıkesir	1	30	32 600
187	Balıkesir	1	30	10 000
188	Balıkesir	1	30	29 600
189	Balıkesir	1	30	25 000
190	Balıkesir	1	30	40 000
191	Balıkesir	1	35	350
192	Balıkesir	1	35	40 500
193	Balıkesir	1	35	40 000
194	Balıkesir	1	37	2 900
195	Balıkesir	1	37	10 900
196	Balıkesir	1	37	500
197	Balıkesir	1	37	36 600
198	Balıkesir	1	37	21 000
199	Balıkesir	1	37	8 700
200	Balıkesir	1	37	7 100
201	Balıkesir	1	37	16 700
202	Balıkesir	1	37	67 500
203	Balıkesir	1	37	4 200
204	Balıkesir	1	37	7 700

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
205	Balıkesir	1	37	311 000
206	Balıkesir	1	37	2 300
207	Balıkesir	1	37	11 200
208	Balıkesir	1	37	13 700
209	Balıkesir	1	37	26 150
210	Balıkesir	1	37	30 500
211	Balıkesir	1	38	2 750
212	Balıkesir	1	38	650
213	Balıkesir	1	43	800
214	Balıkesir	2	18	650
215	Balıkesir	2	26	21 450
216	Balıkesir	2	29	94 000
217	Balıkesir	2	29	291 000
218	Balıkesir	2	29	64 400
219	Balıkesir	2	32	38 150
220	Balıkesir	2	32	6 700
221	Balıkesir	2	33	115 500
222	Balıkesir	2	35	83 200
223	Balıkesir	2	35	35 150
224	Balıkesir	2	35	48 900
225	Balıkesir	2	36	9 250
226	Balıkesir	2	36	9 400
227	Balıkesir	2	36	1 500
228	Balıkesir	2	38	5 515
229	Balıkesir	2	38	131 250
230	Balıkesir	2	39	800
231	Balıkesir	2	39	5 950
232	Balıkesir	2	40	20 600
233	Balıkesir	2	42	45 350
234	Balıkesir	2	42	70 000
235	Balıkesir	2	47	14 300
236	Balıkesir	2	47	100
237	Balıkesir	3	27	15 550
238	Balıkesir	3	27	58 400
239	Balıkesir	3	28	11 750
240	Balıkesir	3	28	45 400
241	Balıkesir	3	28	36 300
242	Balıkesir	3	28	115 400
243	Balıkesir	3	31	91 600
244	Balıkesir	3	31	59 000
245	Balıkesir	3	31	16 500

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
246	Balıkesir	3	31	32 000
247	Balıkesir	3	33	29 000
248	Balıkesir	3	33	25 250
249	Balıkesir	3	38	5 950
250	Balıkesir	3	38	13 300
251	Balıkesir	3	40	101 000
252	Balıkesir	3	40	45 000
253	Balıkesir	3	44	350
254	Bolu	1	9	200
255	Bolu	1	14	350
256	Bolu	1	16	1 200
257	Bolu	1	17	550
258	Bolu	1	17	250
259	Bolu	1	19	1 800
260	Bolu	1	22	450
261	Bolu	1	23	400
262	Bolu	1	23	600
263	Bolu	1	24	39 000
264	Bolu	1	27	36 400
265	Bolu	1	27	60 200
266	Bolu	1	27	14 100
267	Bolu	1	30	206 700
268	Bolu	1	30	113 500
269	Bolu	1	30	88 100
270	Bolu	1	30	115 100
271	Bolu	1	30	40 500
272	Bolu	1	31	30 000
273	Bolu	1	37	245 400
274	Bolu	1	37	427 400
275	Bolu	1	37	3 500
276	Bolu	1	40	9 550
277	Bolu	1	40	3 400
278	Bolu	1	40	5 950
279	Bolu	1	40	2 150
280	Bolu	1	41	2 000
281	Bolu	1	41	2 850
282	Bolu	1	43	51 000
283	Bolu	1	43	26 000
284	Bolu	1	43	38 000
285	Bolu	1	44	72 000
286	Bolu	2	35	10 600

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
287	Bolu	2	40	48 300
288	Bolu	2	44	6 000
289	Bolu	3	33	24 350
290	Bolu	3	33	12 500
291	Bolu	4	14	1 150
292	Bolu	4	21	150
293	Bolu	4	21	800
294	Bolu	4	22	27 900
295	Bolu	4	25	11 100
296	Bolu	4	26	5 600
297	Bolu	4	26	19 250
298	Bolu	4	26	3 300
299	Bolu	4	26	4 350
300	Bolu	4	26	2 200
301	Bolu	4	26	29 750
302	Bolu	4	26	50
303	Bolu	4	27	5 950
304	Bolu	4	27	1 350
305	Bolu	4	28	10 000
306	Bolu	4	28	11 200
307	Bolu	4	29	1 000
308	Bolu	4	29	125 200
309	Bolu	4	29	800
310	Bolu	4	29	550
311	Bolu	4	34	5 600
312	Bolu	4	35	130 500
313	Bolu	4	35	12 900
314	Bolu	4	35	1 200
315	Bolu	4	35	100
316	Bolu	4	39	89 500
317	Bolu	4	39	1 150
318	Bolu	4	39	1 300
319	Bolu	4	39	31 600
320	Bolu	4	39	23 400
321	Bolu	4	39	1 550
322	Bolu	4	39	2 550
323	Bolu	4	39	7 150
324	Bolu	4	39	2 600
325	Bolu	4	40	57 700
326	Bolu	4	42	18 000
327	Bolu	5	16	8 200

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
328	Bolu	5	16	2 500
329	Bolu	5	16	250
330	Bolu	5	16	900
331	Bolu	5	17	850
332	Bolu	5	17	1 000
333	Bolu	5	17	2 150
334	Bolu	5	17	11 350
335	Bolu	5	17	11 00
336	Bolu	5	19	50
337	Bolu	5	21	250
338	Bolu	5	21	11 3400
339	Bolu	5	22	1 000
340	Bolu	5	22	12 200
341	Bolu	5	23	3 750
342	Bolu	5	23	150
343	Bolu	5	25	125 000
344	Bolu	5	26	37 900
345	Bolu	5	28	1 250
346	Bolu	5	31	26 050
347	Bolu	5	31	67 000
348	Bolu	5	32	11 550
349	Bolu	5	32	36 100
350	Bolu	5	32	2 300
351	Bolu	5	32	23 500
352	Bolu	5	32	12 700
353	Bolu	5	32	29 350
354	Bolu	5	33	2 500
355	Bolu	5	33	6 950
356	Bolu	5	33	5 300
357	Bolu	5	33	50 150
358	Bolu	5	33	14 650
359	Bolu	5	33	196 500
360	Bolu	5	33	19 000
361	Bolu	5	34	5 500
362	Bolu	5	34	11 400
363	Bolu	5	34	3 650
364	Bolu	5	35	3 250
365	Bolu	5	35	28 550
366	Bolu	5	35	41 050
367	Bolu	5	35	2 550
368	Bolu	5	35	6 550

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
369	Bolu	5	35	400
370	Bolu	5	35	33 200
371	Bolu	5	36	17 200
372	Bolu	5	36	5 850
373	Bolu	5	36	15 300
374	Bolu	5	36	8 050
375	Bolu	5	36	2 650
376	Bolu	5	36	103 400
377	Bolu	5	36	750
378	Bolu	5	36	6 300
379	Bolu	5	36	100 000
380	Bolu	5	36	3 500
381	Bolu	5	37	11 100
382	Bolu	5	37	5 150
383	Bolu	5	37	17 350
384	Bolu	5	37	32 850
385	Bolu	5	37	1 650
386	Bolu	5	37	6 200
387	Bolu	5	37	7 050
388	Bolu	5	37	26 100
389	Bolu	5	37	64 550
390	Bolu	5	37	16 850
391	Bolu	5	37	24 050
392	Bolu	5	39	16 300
393	Bolu	5	39	28 450
394	Bolu	5	39	28 750
395	Bolu	5	39	34 650
396	Bolu	5	39	118 900
397	Bolu	5	39	11 750
398	Bolu	5	40	5 600
399	Bolu	5	40	650
400	Bolu	5	40	5 500
401	Bursa	1	13	100
402	Bursa	1	13	500
403	Bursa	1	13	800
404	Bursa	1	33	28 900
405	Bursa	1	33	22 500
406	Bursa	1	34	5600
407	Bursa	1	38	1800
408	Bursa	1	43	3550
409	Bursa	1	43	18 300

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
410	Bursa	1	43	18 450
411	Bursa	1	43	350
412	Bursa	1	43	4 400
413	Bursa	1	43	2 600
414	Bursa	1	43	3 350
415	Bursa	1	43	3 150
416	Bursa	1	43	300
417	Çanakkale	1	29	340 000
418	Çanakkale	1	29	5 350
419	Çanakkale	1	30	12 200
420	Çanakkale	1	30	40 000
421	Çanakkale	1	30	17 500
422	Çanakkale	1	30	53 600
423	Çanakkale	1	30	95 000
424	Çanakkale	1	30	180 000
425	Çanakkale	2	44	9 100
426	Çanakkale	2	44	8 650
427	Düzce	1	35	16 000
428	Düzce	2	17	16 400
429	Düzce	2	21	68 000
430	Düzce	2	21	34 350
431	Düzce	2	21	34 250
432	Düzce	2	21	812 000
433	Düzce	2	21	193 600
434	Düzce	2	21	952 000
435	Düzce	2	25	527 000
436	Düzce	2	25	307 000
437	Düzce	2	33	15 500
438	Düzce	2	33	11 200
439	Düzce	2	33	3 700
440	Düzce	2	33	54 000
441	Düzce	2	33	36 500
442	Düzce	2	34	52 400
443	Düzce	2	34	17 400
444	Düzce	2	34	12 250
445	Düzce	2	37	9 900
446	Düzce	2	37	2 750
447	Düzce	2	37	900
448	Düzce	2	37	2 450
449	Düzce	2	37	2 800
450	Düzce	2	39	1 150

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
451	Düzce	2	39	950
452	Düzce	2	39	1 650
453	Düzce	2	39	2 050
454	Düzce	2	39	4 500
455	Düzce	2	39	1 600
456	Düzce	2	39	5 750
457	Düzce	3	36	4 450
458	Düzce	3	36	6 500
459	Düzce	3	36	150
460	Düzce	3	36	500
461	Düzce	3	36	27 700
462	Düzce	3	36	1 300
463	Elazığ	1	17	2 850
464	Eskişehir	1	30	3 800
465	Eskişehir	1	33	17 000
466	Eskişehir	1	33	15 350
467	Eskişehir	1	37	21 100
468	Eskişehir	1	37	73 750
469	Eskişehir	1	37	5 100
470	Eskişehir	1	37	7 950
471	Eskişehir	1	42	50
472	Eskişehir	1	43	17 150
473	İzmir	1	33	2 800
474	İzmir	1	33	2 950
475	İzmir	1	33	156 800
476	İzmir	1	34	3 750
477	İzmir	1	36	2 750
478	İzmir	1	37	19 200
479	İzmir	1	37	100
480	İzmir	1	37	2 250
481	İzmir	1	42	2 100
482	İzmir	2	40	15 750
483	İzmir	2	41	33 600
484	İzmir	3	24	59150
485	İzmir	4	35	58 300
486	İzmir	4	35	52 900
487	İzmir	4	37	700
488	İzmir	4	37	1 150
489	İzmir	4	39	20 300
490	İzmir	4	39	30 000
491	İzmit	1	34	3 850

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
492	İzmit	1	34	4 950
493	İzmit	1	34	10 800
494	İzmit	1	37	13 100
495	İzmit	2	26	50
496	İzmit	2	27	23 800
497	İzmit	2	27	122 000
498	İzmit	2	27	6 700
499	İzmit	2	29	25 100
500	İzmit	2	29	14 500
501	İzmit	2	29	26 600
502	İzmit	2	33	2 750
503	İzmit	2	33	20 300
504	Kayseri	1	16	600
505	Kayseri	1	17	300
506	Kayseri	1	29	298 000
507	Kayseri	1	30	9 100
508	Kayseri	1	34	108 000
509	Kayseri	1	34	84 700
510	Kayseri	1	34	110 000
511	Kayseri	1	44	5 100
512	Kayseri	1	44	2 400
513	Konya	1	19	10 200
514	Konya	1	19	1 450
515	Konya	1	20	12 300
516	Konya	1	20	35 100
517	Konya	1	23	15 200
518	Konya	1	23	450
519	Konya	1	28	320 000
520	Konya	1	30	55 000
521	Konya	1	37	1 150
522	Konya	1	38	66 900
523	Manisa	1	35	16 650
524	Manisa	1	40	7 500
525	Manisa	1	40	55 000
526	Manisa	1	41	67 000
527	Manisa	2	21	400
528	Manisa	2	31	10 850
529	Manisa	2	34	22 850
530	Manisa	2	44	7 600
531	Manisa	2	45	64 500
532	Manisa	3	37	35 200

Çizelge 3.2. Devam. Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
533	Manisa	3	37	22 300
534	Manisa	3	38	49 550
535	Manisa	3	38	20 150
536	Manisa	4	26	15 000
537	Manisa	4	26	77 900
538	Manisa	4	26	31 100
539	Manisa	4	27	10 900
540	Manisa	4	27	8 350
541	Manisa	4	28	14 400
542	Manisa	4	28	7 450
543	Manisa	4	32	11 700
544	Manisa	4	32	9 200
545	Manisa	4	32	16 500
546	Manisa	4	35	18 000
547	Manisa	4	35	4 300
548	Manisa	4	38	10 100
549	Manisa	4	38	7 200
550	Manisa	4	38	1 000
551	Manisa	4	38	1 400
552	Manisa	4	39	2 100
553	Manisa	4	39	2 300
554	Manisa	4	39	2 400
555	Manisa	4	39	300
556	Manisa	4	41	8 100
557	Manisa	4	41	4 000
558	Manisa	4	41	9 100
559	Manisa	4	41	8 850
560	Manisa	4	41	1 000
561	Manisa	4	41	15 800
562	Manisa	4	43	500
563	Manisa	4	43	50
564	Manisa	4	43	22 400
565	Manisa	4	43	8 550
566	Mersin	1	22	600
567	Mersin	1	26	2 200
568	Mersin	1	26	400
569	Mersin	1	26	50
570	Mersin	1	27	12 300
571	Mersin	1	27	12 300
572	Mersin	1	27	2 700
573	Mersin	1	33	13 500

Çizelge 3.2. Devam Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
574	Mersin	1	37	50
575	Mersin	1	38	72500
576	Mersin	1	38	9 000
577	Mersin	2	30	43 600
578	Mersin	2	30	3 800
579	Mersin	2	30	33 000
580	Mersin	2	30	5 300
581	Mersin	2	37	29 800
582	Mersin	2	37	12 550
583	Mersin	2	37	90 000
584	Mersin	2	38	1 950
585	Mersin	2	38	3 300
586	Mersin	2	38	300
587	Mersin	2	38	400
588	Mersin	2	39	750
589	Mersin	2	42	9 750
590	Mersin	2	42	900
591	Samsun	1	16	550
592	Samsun	1	16	8 300
593	Samsun	1	19	1 100
594	Samsun	1	20	300
595	Samsun	1	21	2 400
596	Samsun	1	21	1 600
597	Samsun	1	23	950
598	Samsun	1	23	37 900
599	Samsun	1	23	26 300
600	Samsun	1	30	367 400
601	Samsun	1	30	68 000
602	Samsun	1	30	16 850
603	Samsun	1	30	16 950
604	Samsun	1	35	79 500
605	Samsun	1	37	350
606	Samsun	1	37	72 000
607	Samsun	1	38	150
608	Samsun	1	38	10 650
609	Samsun	1	40	78 000
610	Samsun	1	42	7 550
611	Samsun	1	50	212 500
612	Zonguldak	1	20	600
613	Zonguldak	1	28	223 000
614	Zonguldak	1	30	17 000

Çizelge 3.2. Devam Pozitif örneklerin alındığı iller, işletme numarası, kümesteki hayvanların yaşları ve gram dışkıdaki oocyst sayıları.

Örnek No	Şehir	İşletme No	Hayvan Yaşı (gün)	Oocyst Sayısı (gr/dışkı)
615	Zonguldak	1	30	5000
616	Zonguldak	1	32	55 350
617	Zonguldak	1	32	35 000
618	Zonguldak	1	35	370 000
619	Zonguldak	1	35	55 800
620	Zonguldak	1	35	17 600
621	Zonguldak	1	35	7 800
622	Zonguldak	1	37	72 000
623	Zonguldak	1	37	304 000
624	Zonguldak	1	37	32 000

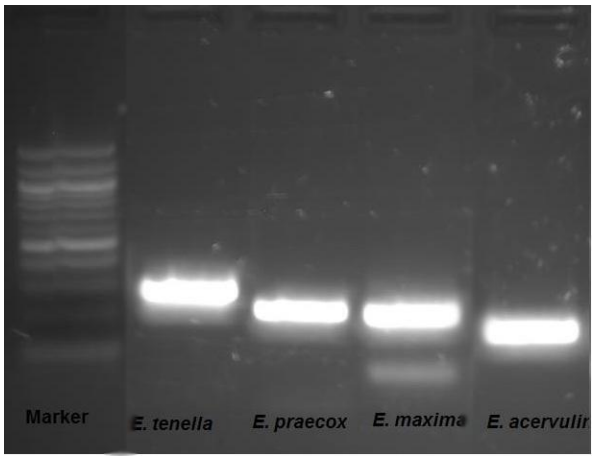
3.3. Morfolojik Tür Tayini

İşletme bazında oluşturulan inokulumlardan alınan örneklerde morfolojik kriterlere göre yapılan değerlendirmeler sonucunda *E. maxima*, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. praecox, E. mitis*, *E. brunetti* ve *E. necatrix* oocystlerine benzer oocystler bulunduğu belirlendi.

3.4. PCR

3.4.1. Klasik PCR

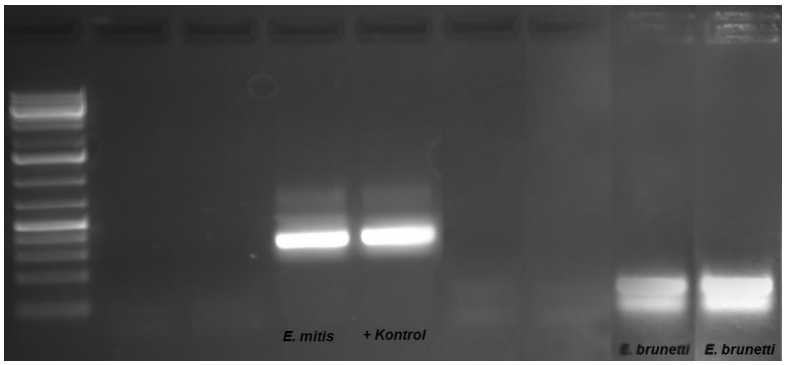
Yedi *Eimeria* türüne (*E. maxima*, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. praecox, E. mitis*, *E. brunetti*, *E. necatrix*) özgü spesifik primerlerin kullanıldığı Klasik PCR'da *E. maxima*, *E. tenella*, *E. acervulina* ve *E. praecox* türlerine ait spesifik bantlar (Şekil 3.1) elde edilirken *E. mitis*, *E. brunetti* ve *E. necatrix* türleri belirlenmedi. Elde edilen pozitif bantlar, pozitif kontrollerde oluşan bantlarla doğrulanırken, negatif kontrollerde bant oluşmaması ile de testte kontaminasyon olmadığı teyit edildi.



Şekil 3.1. Klasik PCR'la elde edilen *E. tenella*, *E. praecox, E. maxima ve E. acervulina*.

3.4.2. Nested PCR

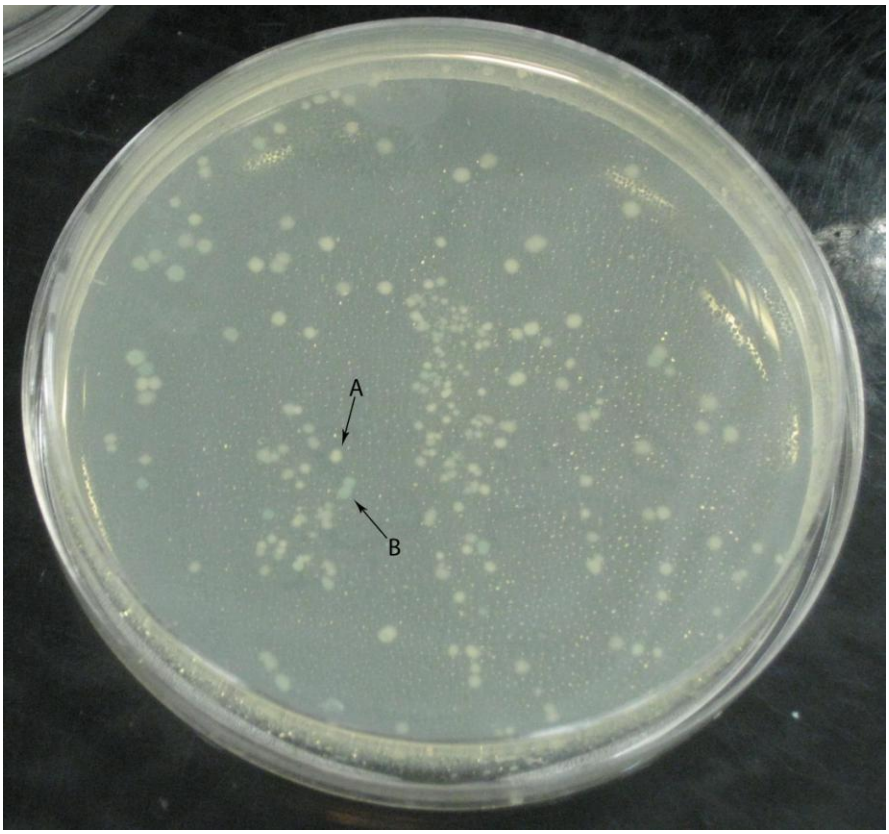
Klasik PCR ile belirlenmeyen *E. mitis*, *E. brunetti* ve *E. necatrix* türlerinin, inokulum içindeki oocystlerinin az sayıda olması ithimali göz önünde bulundurularak bu türler için Nested PCR da yapıldı. Sonuçta, *E. mitis* ve *E. brunetti* türlerine özgü spesifik bantlar elde edildi (Şekil 3.2). Görüntülenen bu bantlar, pozitif DNA kontrollerinde oluşan spesifik bantlarla uyumlu bulundu. Negatif örneklerde ise spesifik amplifikasyonu işaret eden bant oluşumuna rastlanmadı. Bu uygulamada da *E. necatrix'*e özgü DNA amplikasyonu saptanmadı.



Şekil.3.2. Nested PCR'la elde edilen *E. mitis* ve *E. brunetti*.

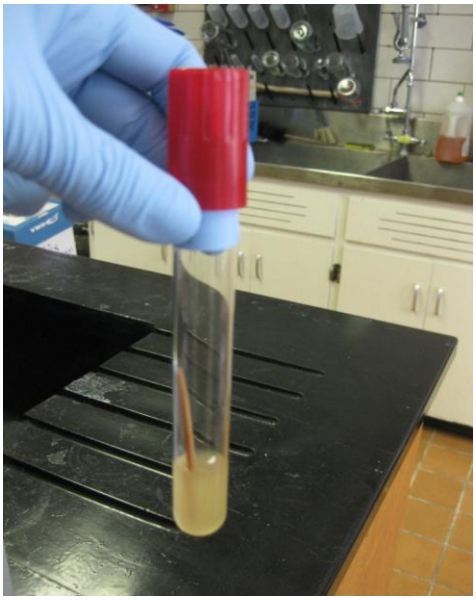
3.5. Klonlama

Oocystlerden elde edilen DNA'nın PCR işlemi ile çoğaltılmasından sonra DNA sekans analizini kolaylaştırmak amacıyla klonlama işlemi yapıldı. Türlere spesifik PCR ürünlerinin önce vektör plazmide yerleştirilmesi, daha sonra da vektörün *E. coli*'lere transforme edilerek bakteri üremesi ile çoğaltılması sağlandı. Carbenicillin eklenmiş agarda bakteriler üreyerek beyaz ve mavi koloniler (Şekil 3.3.) oluşturdu. Beyaz koloniler, vektörün b-galactosidase enzimi kodlayan Lac Z gen bölgesinin vektörden ayrıldığını, yerine de DNA'nın bağlandığını göstermektedir. Lac Z geninin ayrılmadığı durumda ise b-galactosidase, Xgal içindeki laktozu hidrolize ederek mavi renk oluşumuna yol açtı.

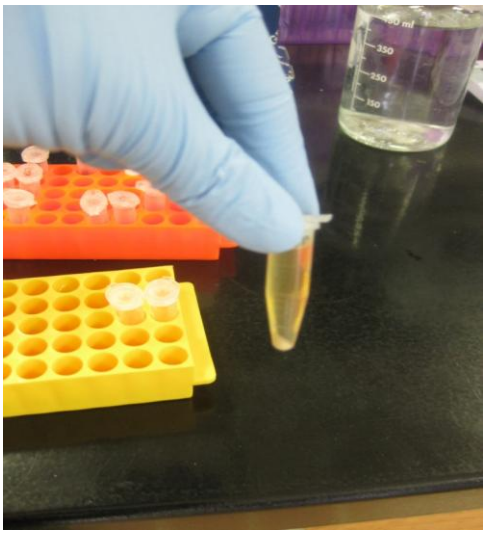


Şekil 3.3. Carbenicillin selektif mediumda üreyen bakterilerin oluşturdukları beyaz (A) ve mavi (B) koloniler.

Bir gece 37 °C'de inkubatörde bekletilen *E. coli*'lerin üremesine bağlı LB buffer renginde bulanıklaşma meydana geldiği görüldü (Şekil 3.4.). Bulanıklaşmış LB buffer santrifüj edilerek bakterilerin dipte toplanması sağlandı (Şekil 3.5.). Devamında bakterilerden plasmid DNA'yı ayırmak ve elde etmek için Gene Jet Plasmid Miniprep kiti (Fermentas) uygulandı.



Şekil 3.4. Bakterilerin üremesine bağlı LB buffer renginde bulanıklaşma.



Şekil 3.5. Bakterilerin dipte toplanması.

3.6. Klonlama Sonrası Elde Edilen DNA Miktarları

Klonlama sonrası örneklerin µl'deki DNA miktarları ölçüldü (Çizelge 3.3.) ve sekans analizine gönderilmek üzere son DNA konsantrasyonu 800 ng olan örnekler hazırlandı.

Çizelge 3.3. Klonlama sonrasi örneklerin DNA miktarı.

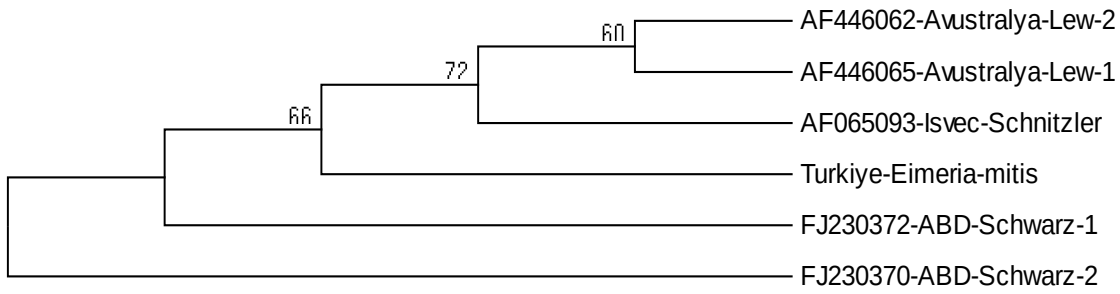
***Eimeria* spp**	**DNA miktarı (ng/ µl)**
E. mitis	358,7
E. brunetti	422,1
E. tenella	298,2
E. maxima	320,5
E. acervulina	360,8
E. praecox	316,7

3.7. Filogenetik Analiz

Türkiye *E. mitis* nükleotid dizisinin (Çizelge 3.4.), MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan analizi (Şekil 3.6.) sonucunda, Türkiye izolatının *E. mitis* ITS1 tüm sekansı (Erişim Numarası: AF065093, GenBank), *Eimeria mitis* izolat C ITS1 tüm sekansı (Erişim Numarası: AF446065, GenBank) ve *Eimeria mitis* izolat A A1 klonunun ITS1 tüm sekansı (Erişim Numarası: AF446062, GenBank) ile % 66 oranında benzerlik taşıdığı belirlendi.

Çizelge 3.4. Türkiye *E. mitis* nükleotid dizisi.

E. mitis
TTTATTTCCTGTCGTCGTCTCGCTTTTGCGATTCGTGGGAGGAAGGAAGCGTCGGTACCG TCGGGATTGGCTGCTTCTGAACCATTGTTATCCAATCTTTGAATCCATAGTTATTTCTCCAC GACGTTATTTTTAAAAAGAAGGCTTTTTAAAGTTGTTTTGCCTGCATTTCAACTCGATTTGC AGGTGTGTGGGATGAGTATGCTTGGGGGGTCTGTCT

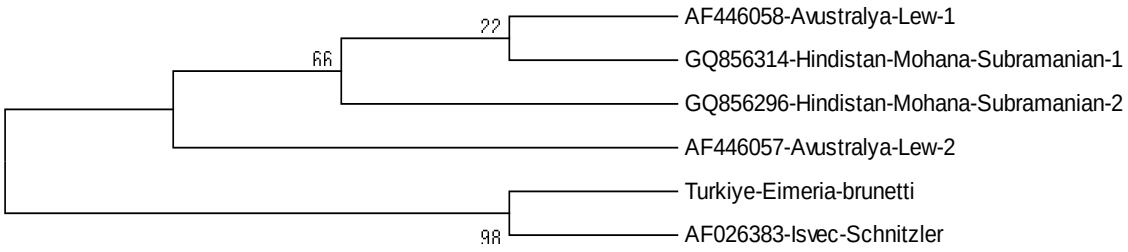


Şekil 3.6. Türkiye *E. mitis* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi.

Türkiye *E. brunetti* nükleotid dizisinin (Çizelge 3.5.), MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan analizi (Şekil 3.7.) sonucunda Türkiye izolatının *Eimeria brunetti* Ebr-Swe1 izolatının ITS1 tüm sekansı (Erişim Numarası: AF026383, GenBank) ile % 98 oranında benzerlik taşıdığı saptandı.

Çizelge 3.5. Türkiye *E. brunetti* nükleotid dizisi.

E. brunetti
CTGGGGCTGCAGCGACAGGGGAGAAAAGATCAGTTTGAGCAAACCTTCGAATCAATTAAC GCTTTCCAACAAAGTCTTTCTGAAAATTGAAGCATAAAAATTAAATTTGAAATTGGATTTGA TGGATCTGAAGCGCGCTGGAAGGAGCGGAAGGAGGCGTGCATGCGGGATGGGGCCATC GAT

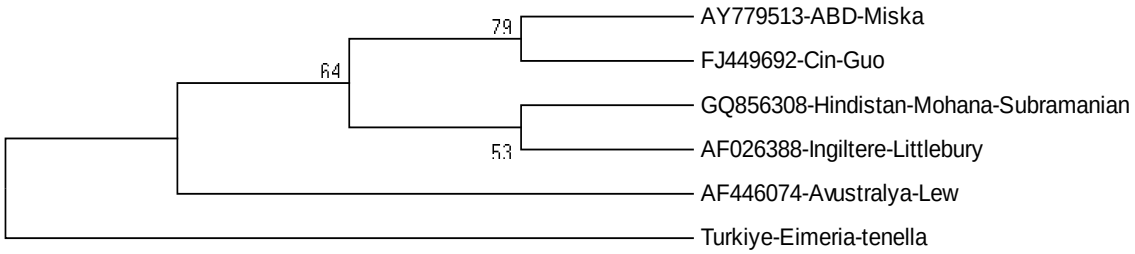


Şekil 3.7. Türkiye *E. brunetti* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi.

Türkiye *E. tenella* nükleotid dizisinin (Çizelge 3.6.), MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan analizi (Şekil 3.8.) sonucunda, Türkiye izolatının referans suşlardan ayrıldığı ve tek başına ayrı bir dalda yer aldığı belirlendi.

Çizelge 3.6. Türkiye *E. tenella* nükleotid dizisi.

E. tenella
TATGGACTTTTACGTGACCTATAGATACAGCGGCCGCGAGCTCGGGCCCCCACACGTGT
GGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTCGACGAATTCAGATTCTGTGAATTCAT
CGGACGGACAAGCCTTACTTTGTGGGGCTGGTCGGGAAGTTGCGTAAATAGAGCCCTCT
AAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTCACA
CAATTCGCACGCCTGGAACGCGCTGCTGGTTTTACAGGTTTCAAGCATTCGCTTTGCCTG
GGTGGCCAGCAGCAGGTAGTTGTCGGTGTTGTTGGAAAGAAAACTTTAGTCCATCGCAAC
CCTTGAATCTGTTTTTCTCTGCAACGGTTTTTCTGCTTTTTAAAAATTGAAGGAAGCTTTGC
TGCTGCAAGGATATATAGCAGTAGTATGTACGTGGGCGTCGGGGCGGGGTGGTGGCGCA
TGCACGGGCTCGCGTGGGGCCTGTCGGTGGCAGCCCCAGCGCGCCGGCGCCAGCCCC
GTGATCGTCGATCGCGCACGTACGTGGAGGGGATTATGAGAGGAGAAGACGAGCACGG
GGCTGTGTCGTATGCAGAGCTCTCGCGGCTCGGGCGATTGTTCCGTGTTGTGTGCTCTGT
TGCATGCTGGTGTGTGCGTTCTGTCTCTCTCTCTCTCCGTTCCATGCTGCTCGGAACTTTG
CTACAAAAAAGAAACTTTTGCTCCCTAAGGTGAATCAAATCACTATTGTTGATGAGCACAAT
GAAGAATAGGTAGAAAGCGGAAAAAACTTTCACCAATGGATGTCTGGCCTCACGCATCCA
TCAAAGACGCACCCGAAATGCAATTATCACGAATTCTGGATGCTATATGTAGCGTGTCTGC
GGCATGCGTGGTACCGAACTCTCCCCTATAGTGAGTCAAAATAAAACCTGGGCGTAATCC
ATGGTCATGGTGTTTCCTGTCTAAAATGTTATCCTCTCACAATCCACACACATACGACCCG
GAAGCATAAGTGTAAAGTCTGGGGTGCCTAAAGAGTGAGCAAACTCAATTTATTGCGTTG
CCGCTAACTGCTCCCTTTCCAATTGGGAAACCTGTCGGGCAACCTGCATTATGAAATCAG
GCCAAACCAGCGAGGAAAAGGCGGTTTGCGTATGTGTGGGTGCTCTTTCCGATTCCTTCC
TTTCCTGAATCTCCTTGCCCTCGTGCCGTACGACGTCGAGGCGAACGGGATACATGCTAC
CTCTCAAAGAGGGGCGATAAATATCGGGGTAATACCCTCCTGCGGAGACACTAG

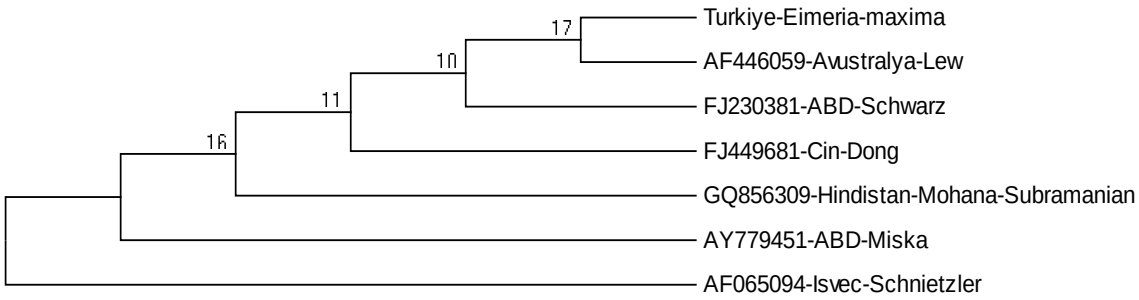


Şekil 3.8. Türkiye *E. tenella* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi.

Türkiye *E. maxima* nükleotid dizisinin (Çizelge 3.7.), MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan analizi (Şekil 3.9.) sonucunda, Türkiye izolatının *Eimeria maxima* B izolatı B1 klonunun ITS 1 tüm sekansı (Erişim Numarası: AF446059, GenBank) ile % 17 oranında benzerlik taşıdığı saptandı.

Çizelge 3.7. Türkiye *E. maxima* nükleotid dizisi.

E. maxima
ACCAGCATGCGCTCACAACCCTGTTTATGCAAGAGGACATCCACCCTTCTAAAGAGCATC ATATCCATCAATTGCACAAAATAGGCATTGTTTGTGTCCTTAATTTTCAAAAGTACGTTGTG AGAAGACTGAAAGGGATTCAATGATTGGGTTAGGCTAGTTCTCTGGCGTTCCCCCCCAGC AGCCCCCATCACCACAGTCCCAC

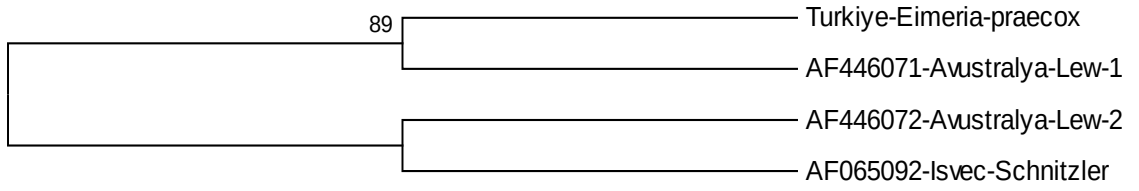


Şekil 3.9. Türkiye *E. maxima* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi.

Türkiye *E.* praecox nükleotid dizisinin (Çizelge 3.8.), MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan analizi (Şekil 3.10.) sonucunda, Türkiye izolatının *Eimeria praecox* A izolatının ITS 1 tam dizilimi (Erişim Numarası: AF446071, GenBank) ile % 98 oranında benzerlik taşıdığı belirlendi.

Çizelge 3.8. Türkiye *E. praecox* nükleotid dizisi.

E. praecox
GCATGCGCTAACAACTCCCCTTGCATGCGACAGATCTTCCATTGTTAAAATCTATCTTTCAT ACAAAGAGAAGTTCATTCATTTCTTTTTTAATAACAAAAGAACGTTGTGGAGGGAAAGCAAA GCGATTCAAGGATTGGTTTACGTTGGTTTGTCGGCGCTCCCCCCTAGCAGACTCCAACAT CGCAAAACGCTTTCAAAAAGCCATTCCGATG

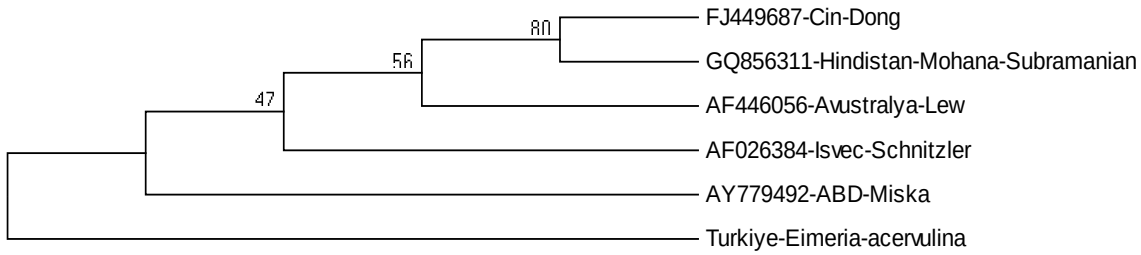


Şekil 3.10. Türkiye *E. praecox* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi.

Türkiye *E. acervulina* nükleotid dizisinin (Çizelge 3.9.), MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan analizi (Şekil 3.11.) sonucunda Türkiye izolatının tüm referans suşlardan ayrıldığı ve ayrı bir dalda yer aldığı saptandı.

Çizelge 3.9. Türkiye *E. acervulina* nükleotid dizisi.

E. acervulina
TGTGAATTCATCGGACTGGCCATTCTCACTTTGGGGCTGGCCGGGAAGTTGCGTAAATAG AGCCCTCTAAAGGATGCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT CATTCACACATTGCGTCTCAAAGCTGCTTCATCAGACAGTAACTCAATTTTTGGGGCTTGG ATGATGTTTGCTGCTGCGAGGGAACGCTTAATTGAATCTTACCATCTACCAATCTTTGAAT CTGTTTTGTTTTCCCACCACGACGCATTTTTGTGAAGAAAAGAAGAGGAAAAAACCTGACT TTGCAATCATCATTGCCACCTTTTGAAGGGATGGGATGATGATGCATGCATGGGAGGGGG AGGGGCGGCGCATGCACCGCTTGGGGCTTTTTGGGGCTTTTGGGGCTGTGGTGGTGGG GCTTGCATGCTACGTGTGACCCTGGCACGGCTGTCTATGATGAGCACCCATAGCGCCAG CGTGTGTTATTGCGTTCGTTGCCTTGTATTTTATATTTAAAAAAAAACAAAACTTTCAGCAAT GGATGTCTTGGCTCACGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAATGCGA



Şekil 3.11. Türkiye *E. acervulina* nükleotid dizisinin MEGA 4.0 (Tamura ve ark., 2007) programı ile yapılan filogenetik analizi.

Filogenetik analizleri yapılan Türkiye *Eimeria* türlerine ait sekans verilerinin GenBank'a kaydedilmesi için gerekli prosedür başlatıldı.

4. TARTIŞMA

4.1. Türkiye İnokulumunda Bulunan *Eimeria* Türleri

Coccidiosis, tavuk yetiştiriciliğinde dünya genelinde öneme sahip bir hastalıktır. *Eimeria* soyundaki zorunlu hücre içi protozoonların, bağırsak kanalında üremesi ile mukozada oluşan hasar, besinlerin absorpsiyonunun ve sindirim işlemlerinin bozulmasına dolayısıyla da dehidrasyon, ishal, kilo kaybı, yemden yararlanma oranında düşme ve diğer hastalıklara karşı duyarlılık oluşmasına neden olur (McDougald, 1997).

Kalabalık kümeslerde, viral ve bakteriyel hastalıklardan sonra en sık karşılaşılan problem olan hastalık, önemli boyutta ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Coccidiosis gibi parazitik hastalıklar, viral ve bakteriyel hastaliklardan farklı olarak komplike hayat döngüsüne sahip olmaları, ara konağa ihtiyaç duymayan bulaşma yolları, tanı için serolojik metodların yetersiz kalması, dezenfeksiyon ve karantina uygulamalarının kontrolde yeterli olmaması gibi özelliklere sahiptirler. Bu özellikler hastalığın çok fazla sayıda hayvanın bir arada bulunduğu broiler yetiştiriciliğinde önemini korumasına neden olmaktadır (McDougald,1997).

Türkiye'de, tavuklarda coccidiosise yol açan *Eimeria* türlerine ilişkin çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bir ya da birkaç ille sınırlı olan mevcut araştırmalarda etkenlerin tür tayinleri oocyst morfolojisi, nekropsi ve histopatolojik bulguların değerlendirilmesi ile yapılmış ve sonuç olarak tavuklarda görülen 9 *Eimeria* türünün (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. tenella, E. praecox* ve *E. hagani*) hepsinin Türkiye'de bulunduğu bildirilmiştir.

Tür bildirimi yapılan çalışmalardan ilki, Başkaya ve ark.(1952) tarafından Ankara civciv ve piliçlerinde görülen koksidiyoz olguları üzerine yapılmıştır. Bu çalışmada Ankara Tavukçuluk Enstitüsü, Ankara Ziraat Fakültesi Zootekni Enstitüsü kümesleri ve Sincan köyünde; oocyst morfolojisi, nekropsi ve histopatolojik bulgular değerlendirilerek, muayene edilen 287 hayvandan 237'sinin *E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina* ve *E. mitis* türleri ile enfekte olduğu saptanmıştır. Oytun (1952), civcivlerde koksidiyoza karşı sulfamezatin sağaltımının araştırıldığı çalışmasında Ankara Ziraat Fakültesi Zootekni Enstitüsü kümeslerindeki 730 civcivde, nekropsi ve oocyst morfolojisine göre, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. mitis* ve *E. praecox* olmak üzere 4 farklı tür tespit etmiştir. Meydani (1966), çeşitli kimyasal bileşiklerin koksidiyozdan korunmadaki etkilerini araştırdığı çalışmasında, Ankara'da 948 dışkı numunesini incelemiş ve oocyst morfolojisine dayanarak *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. acervulina* ve *E. mitis* olmak üzere 5 *Eimeria* türünü saptamıştır. Merdivenci (1970), Ankara'da *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* ve *E. tenella* olmak üzere 6 farklı türü oocyst morfolojisi ile belirlemiştir. Demir (1991), doktora tez çalışmasında, Bursa il sınırları içerisindeki 45 kümesten aldığı 1 396 tavuk dışkı örneğinden 740'ında coccidiosis etkenlerine rastlamıştır. Etkenlerin tür tayininde oocyst morfolojisi, nekropsi ve histopatolojik bulgular değerlendirilmiş ve *E. necatrix*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. mitis, E. maxima* türleri tespit edilmiştir. Gürel (1992), Elazığ yöresi tavuklarında bulunan *Eimeria* türlerinin insidensini araştırdığı çalışmasında; Elazığ yöresinde, oocyst morfolojisi ve nekropsi muayenesi ile 578 tavuktan 130'unda coccidiosise rastlamış ve bu hayvanlarda *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina* ve *E. maxima* olmak üzere 4 türün bulunduğunu bildirmiştir. Sarı (2004), Adapazarı Merkez ve Kaynarca, Bolu-Göynük, Balıkesir-Bandırma ve Ankara-Kazan ilçelerinde bulunan kümeslerden aldığı altlık ve dışkı örneklerinde *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. praecox* ve *E. mitis* türlerini tespit etmiştir. Karaş (2004), Adapazarı Merkez ve Kaynarca, Balıkesir-Bandırma, Bolu-Göynük ve Ankara Kazan ilçelerindeki kümeslerden aldığı altlık ve dışkı örneklerinde *E. brunetti*,

E. maxima, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. tenella* ve *E. hagani* türlerini saptamıştır.

Bu çalışmada, Türkiye'deki broiler kümeslerinin tamamını temsil edecek şekilde, Türkiye'nin 6 bölgesinde (Akdeniz Bölgesi, Doğu Anadolu Bölgesi, Ege Bölgesi, İç Anadolu Bölgesi, Karadeniz Bölgesi ve Marmara Bölgesi) yer alan, broiler kümeslerinin yoğunlukla bulunduğu 19 ilde (Adana, Adapazarı, Ankara, Balıkesir, Bolu, Bursa, Çanakkale, Düzce, Elazığ, Eskişehir, İzmir, İzmit, Kayseri, Konya, Manisa, Mersin, Samsun, Uşak ve Zonguldak), istatiksel analizle illerdeki kümes yoğunluğuna göre sayıları belirlenen toplam 1200 kümesten örnekler toplanarak çalışma materyali oluşturuldu. Türkiye'de broilerlerde coccidiosise neden olan *Eimeria* türlerinin saptanmasında ilk kez bir moleküler amplifikasyon tekniği kullanıldı. Bu teknik ile Türkiye oocyst inokulumununda, coccidiosise neden olan 7 *Eimeria* türünün (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. acervulina* ve *E. mitis*) varlığı araştırıldı ve sonuç olarak *E. necatrix* hariç diğer 6 tanesinin (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. acervulina* ve *E. mitis*) bulunduğu saptandı. İnokulumdaki oocystlere ilk önce Klasik PCR uygulandı ve jel elektroforezde *E. tenella*, *E. maxima*, *E. praecox* ve *E. acervulina* türleri belirlendi. Klasik PCR ile saptanmayan *E. necatrix*, *E. brunetti* ve *E. mitis* türlerinden *E. brunetti* ve *E. mitis* Nested PCR ile belirlenirken *E. necatrix* yine saptanmadı. Bu durum, diğer türlere kıyasla *E. brunetti* ve *E. mitis* türlerine ait oocystlerin inokulumda daha az sayıda bulunması, *E. necatrix* oocystlerinin ise bulunmaması şeklinde açıklandı. Broiler yetiştiriciliğinin ilk 6 haftasında *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* ve *E. tenella* kaynaklı enfeksiyonlar görülürken, *E. necatrix*'in genellikle yetiştirmenin 12. haftasından sonra enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Williams, 1998). Çalışmanın materyal kısmını oluşturan broilerlerin yaşları 1 ile 50 gün arasında değişmekte olduğundan, bu türün saptanmamasının yaşa bağlı olduğu düşünüldü.

PCR öncesi, oocystlerin morfolojik özellikleri (Pellerdy, 1974, Levine, 1985) göz önünde bulundurularak yapılan tür tayininde, Türkiye inokulumunda *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. acervulina* ve *E. mitis* oocystlerine benzer özellikte oocystler olduğu belirlendi. Ancak, PCR amplifikasyonu sonrası, agaroz jel elektroforezinde *E. necatrix* dışındaki türler belirlenirken bu türe ait bant görüntülenmedi ve Türkiye oocyst inokulumunda bu türün olmadığı anlaşıldı. Oocystlerin morfolojik özelliklerinin türler içinde bile farklılık gösterdiği ve farklı türlerin oocystlerinin benzer morfolojik özellikler taşıdığı bilinmektedir. Bu nedenle, morfolojik bakıda *E. necatrix* olduğu düşünülen oocystlerin yaklaşık olarak aynı büyüklüğe sahip *E. tenella* ya da *E. praecox* oocystleri olduğu sonucuna varıldı.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda *E. tenella,* (Başkaya ve ark., 1952; Oytun,1952; Meydani, 1966; Merdivenci,1970; Demir, 1991; Gürel, 1992; Sarı, 2004; Karaş, 2004), *E. maxima* (Başkaya ve ark.,1952; Meydani,1966; Merdivenci,1970; Demir, 1991; Gürel, 1992; Sarı, 2004; Karaş, 2004), *E. brunetti* (Demir, 1991; Sarı, 2004; Karaş, 2004), *E. praecox* (Oytun, 1952; Merdivenci,1970; Sarı, 2004), *E. acervulina* (Başkaya ve ark.,1952; Oytun, 1952; Meydani, 1966; Merdivenci,1970; Gürel, 1992) ve *E. mitis* (Başkaya ve ark.,1952; Oytun, 1952; Meydani, 1966; Merdivenci, 1970; Demir, 1991; Sarı, 2004; Karaş, 2004) türleri bildirilmiş olup bu sonuçlar bizim çalışma sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir.

Daha önce Türkiye'de yapılmış çalışmalarda, Meydani (1966) ve Merdivenci (1970) Ankara'da, Demir (1991) Bursa'da, Gürel (1992) Elazığ'da, Sarı (2004) Adapazarı (Merkez ve Kaynarca), Bolu (Göynük), Balıkesir (Bandırma) ve Ankara (Kazan)'da ve Karaş (2004) Adapazarı (Merkez ve Kaynarca), Balıkesir (Bandırma), Bolu (Göynük) ve Ankara (Kazan)'da *E. necatrix* türünü saptadıklarını bildirmiştir. Bu çalışmalardan farklı olarak uygulanan PCR temelli tür tayininde ise *E. necatrix* türü belirlenmedi. Oocyst

morfolojisi, nekropsi ve histopatolojik bulguların bir ya da birkaçının değerlendirildiği bu çalışmalarda *E. necatrix* oocystlerinin saptanması, bu çalışmaların bazılarında broilerlerin yanı sıra daha uzun süre yetiştirilen yumurtacı tavukların da kullanılması ile bir derece açıklanabilir. Ancak sadece broilerler ile yapılan çalışmalarda (Karaş, 2004; Sarı, 2004) *E. necatrix* türünün varlığının bildirilmiş olmasına şüphe ile bakılmaktadır.

4.2. *Eimeria* Etkenlerinin Tür Tayininde PCR'ın Kullanımı

Parazitlere ilişkin yapılan araştırmaların çoğu, üzerinde çalışılan organizmanın gerçekten de farz edilen etken olduğu önermesi üzerine yürütülmektedir. Eğer önerme yanlış ise bu, verilerin yanlış yorumlanmasına ve dolayısıyla da yanlış sonuçlar elde edilmesine yol açabilir (Andrews ve Chilton, 1999). Son yıllarda moleküler teknolojilerde kaydedilen büyük gelişmeler, paraziter etkenlerin gelişiminin ve üremesinin daha iyi anlaşılmasına dolayısıyla da kontrollerinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Etkenlerin doğru olarak tanımlanması ve genetik karekterizasyonlarının yapılması sınıflandırma, populasyon genetiği, ekoloji, epidemiyoloji ve neden oldukları hastalıkların tanı, tedavi ve kontrolünde büyük önem taşımaktadır (Gasser, 2006).

Yetiştiricilik, beslenme ve kemoterapi alanlarındaki gelişmeler klinik coccidiosis vakalarıyla daha seyrek karşılaşılmasına yol açmış olmakla beraber, subklinik coccidiosis halen dünya genelinde kanatlı endüstrisinde karşılaşılan en yaygın ve pahalı hastalıklardan biridir (McDougald, 2003). Kanatlı endüstrisi bu hastalık karşısında hayvanlara yemle devamlı anticoccidial ilaçlar uygulanmasına bel bağlamaktadır. Endüstrinin ve halkın, ilaç direnci ve muhtemel kalıntı sorununa karşı bilinçlenmesine bağlı, Avrupa Birliği Komisyonu 2003 yılında, 31 Aralık 2012 itibariyle anticoccidial kullanımının aşamalı olarak durdurulmasını önermiştir. Yakında gerçekleşecek bu yasaklama endüstrinin üretim

performansından, hayvan refahı ve sağlığından ödün vermeden alternatif kontrol uygulamaları geliştirmesine bağlıdır (Haug ve ark., 2008). Spesifik tanı uygulaması, epidemiyolojik ve enfeksiyonun yoğunluğuna ilişkin çalışmalarda olduğu kadar rasyonel ve etkili kontrol önlemlerinin uygulanmasında da büyük öneme sahiptir (McDougald, 2003).

Farklı *Eimeria* türlerinin ve/ya da suşlarının patojenitesi ilaç direnci ve diğer biyolojik parametreler açısından farklılık göstermektedir. Bu nedenle etkenlerin kesin ayrımı epizootiyolojik çalışmalarda ve popülasyon biyolojisi çalışmalarında önemli bir konudur. Spesifik tanının gerekli olduğu diğer bir uygulama canlı aşı hazırlanmasında kullanılan suşların saflıklarının kontrol edilerek çapraz kontaminasyonların engellenmesidir (Fernandez ve ark, 2003).

Coccidiosis kontrolünde canlı aşı kullanımının artış göstermesi nedeniyle türlerin saptanması ve spesifik tanısının konması için hassas ve güvenilir testlerin gereksinimi çok önemlidir. Geleneksel metodlar, özellikle aşı stoklarındaki minor kontaminasyonların saptanmasında yetersiz kalmaktadırlar. Moleküler teknikler, saha örneklerinde ve aşı stoklarında *Eimeria* türlerini tanımlanmada oldukça duyarlı ve objektif sonuçlar vermektedir. Ancak geliştirilen bu moleküler analizlerde de subjektif geleneksel tanı metodları başlangıçta kullanılarak analiz için gerekli *Eimeria* türleri izole edilmesi gerekmektedir (Lew ve ark, 2003).

Moleküler tanı teknikleri kullanılırken de suş farklılıklarına dikkat edilmesi gerekir. Bir coğrafi bölge içinde bile bir türün farklı suşları görülmekte ve farklı orijine ait etkenlere spesifik dizayn edilen primerler, bu suşları amplifiye etmede yetersiz kalabilmektedir. Amerika'da *E. maxima*'nın 5 suşunun ITS-1 sekansları arasında yüksek değişkenlik olduğu (Barta et al., 1998), Avrupa'da ise *E. maxima* izolatından 2 farklı ITS-1 bölgesi amplifiye edildiği (Schnitzler et al., 1999) bildirilmiştir. Ayrıca, başka ülkelerden ithal edilen aşılar vasıtasıyla ülkede olmayan suşlar taşınabilmekte ve bu da yine moleküler çalışmalarda başarısız

sonuçlar elde edilmesine yol açabilmektedir. ABD, Georgia Üniversitesi Poultry Science Bölümü'nde yapmış olduğumuz çalışmalarda İsveç'teki bilim adamları (Haug ve ark., 2007) tarafından dizayn edilen primerleri kullandığımızda, Georgia tavuk işletmelerinden aldığımız örneklerde *E. maxima* belirlenmezken, aynı örnekleri Tayvan'lı araştırmacıların (Su ve ark, 2003) primerleri ile çalıştığımızda *E. maxima* spesifik bantlarının oluştuğu saptanmıştır.

Tavuk *Eimeria* etkenlerinden *E. hagani* ve *E. mivati* dışındaki 7 tanesi (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix, E. tenella, E. praecox* ve *E. mitis*) tüm dünyada geçerli türler olarak kabul edilirken, bu iki tür bazı Avrupa'lı araştırıcılar tarafından *E. acervulina*'nın alt türü olarak kabul edilmektedir (Shirley ve ark, 1983; Barta ve ark, 1997). Coccidiosis üzerine yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak üzerinde durulan bu 7 türden karekteristik makroskobik lezyonlara neden olan ve değişen derecelerde patojeniteye sahip *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* ve *E. tenella* türleri daha iyi bilinmekte ve de daha kolay ayırt edilebilmektedir. Diğer taraftan *E. praecox* ve *E. mitis* ılımlı patojen türler olarak tanımlanmakta ve genellikle patognomonik lezyonlar oluşturmamaktadır (Allen ve Fetterer, 2002). Bu nedenle de bu türlerin belirlenmesinde, geleneksel tanı metodlarının kullanımı daha da kısıtlanmaktadır.

Kanatlı *Eimeria* türlerinin epidemiyolojisi, etkenlerin kesin tür tayininde hızlı, güvenilir, objektif ve kullanımı kolay bir metod olmaması nedeniyle çok az çalışılan bir konudur (Schnitzler ve ark, 1998). Moleküler tanı metodlarının geliştirilmesinden önce tavuk coccidiosisine ilişkin epidemiyolojik veriler, başta dışkı ve altlık örneklerinin biraraya getirilerek incelenmesi, oocystlerin izolasyonu ve mikroskobik incelemenin ardından deney hayvanlarına inokülasyonu şeklinde yapılmaktaydı. Deneysel enfeksiyon sonrası *Eimeria* türlerinin identifikasyonu da geleneksel metodlarla, morfolojik ve patolojik kriterlerin değerlendirilmesi ile yapılmaktaydı. Bu kriterler oocyst şekli ve büyüklüğü, prepatent period, sporlanma süresi, etkenlerin bağırsaktaki yerleşim yeri ve oluşturdukları

lezyonların şekli ve bağırsak mukozasındaki endojen gelişim evrelerinin karekteristik özellikleridir. Ancak bu özellikler tür seviyesinde tanımlanma yapılması için yeterli olmayabilmektedir (Lew ve ark, 2003; Fernandez ve ark, 2003; Haug ve ark., 2007; Morris ve ark, 2007).

Bu analizler oldukça deneyimli personel gerektirdiği gibi, farklı türlere özgü karekteristik bulguların birbirine karışma ihtimali de söz konusudur. Ayrıca *Eimeria* türleri genellikle mix enfeksiyon oluşturduklarından, bağırsakta birden fazla tür aynı alana yerleşim gösterebilmekte ve makroskobik lezyonlar iç içe geçmektedir. Oocyst morfolojisi ve büyüklüğü tür içinde bile değişiklik gösterebilmektedir. Farklı türlerin benzer morfolojik özelliklerinin olması da diğer bir dezavantajdır. Makroskobik lezyonların ve etkenlerin bağırsaktaki yerleşim yerinin analiz edilebilmesi için hayvanlarda nekropsi yapılması gerekmektedir. Ilımlı patojeniten olarak tanımlanan *E. mitis* ve *E. praecox* gibi türlerde belirgin makroskobik lezyonlar şekillenmediğinden, bu lezyonların değerlendirilmesi de genellikle zordur. Precocious suşların atenü aşılarda kullanımının geliştirilmesiyle de tür tanımlanmasında iyi bir kriter olan prepatent süre önemini kaybetmiştir. (Allen ve Fetterer, 2002; Fernandez ve ark, 2003; Meireles ve ark, 2004; Morris ve ark, 2007).

Haug ve ark. (2008), Norveç broiler kümeslerinden aldıkları altlık ve dışkı örneklerinde tür tayini amacıyla PCR ve morfometri metodlarını uygulamış ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Morfometri için her bir örnekte 50 oocyst ölçümü yapılmış ve *Eimeria* oocystleri büyüklüklerine göre 3 gruba ayrılmıştır. Buna göre, *E. acervulina* ve/veya *E. mitis* küçük oocystler (≤18,8 µm), *Eimeria necatrix*, *Eimeria tenella* ve/veya *Eimeria praecox* orta büyüklükteki oocystler (18,9-23,8 µm), *Eimeria brunetti* ve/veya *Eimeria maxima* büyük oocystler (≤23,9 µm) grubuna dahil edilmiştir. Çalışmada, rDNA'nın ITS-1 bölgesini amplifiye eden tür spesifik PCR ile *Eimeria acervulina* (100%), *Eimeria tenella* (77%), *Eimeria maxima* (25%), *Eimeria praecox* (10%) ve *Eimeria necatrix* (2%) olmak üzere 5

tür belirlenmiştir. Araştırmacılar PCR ile morfometrik metodun % 49 oranında uyumluluk gösterdiğini ve bu farklılığın morfometrik metod ile yakın büyüklüklere sahip oocystlerin hatalı değerlendirilmesine bağlı şekillendiği sonucuna varmışlardır.

Karaş (2004), tez çalışmasında altlık ve dışkı örneklerinde *Eimeria* spp varlığını araştırmış ve morfolojik değerlendirmeyle *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. tenella* ve *E. hagani* türlerinin var olduğunu belirlemiştir. Daha sonra bu örneklerden hazırladığı inokulumla deneysel enfeksiyonlar gerçekleştirildiğinde, oocyst ölçülerinin yanı sıra etkenlerin bağırsaklardaki yerleşim yerini ve histopatolojik bulguları da değerlendirmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda ise inokulumun *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. tenella* ve *E. hagani* türlerini içerdiğini, *E. acervulina*'nın bulunmadığını saptamıştır. Benzer şekilde Sarı (2004), tez çalışmasında, kümeslerden aldığı altlık ve dışkı örneklerinde morfolojik bakıda *E: acervulina*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. praecox* ve *E. mitis* türlerini saptarken, daha sonra bu türleri içeren inokulumla oluşturduğu deneysel enfeksiyonların patolojik ve histopatolojik değerlendirmelerinde *E. acervulina* türünün bulunmadığını bildirmiştir. Her iki çalışmada da sadece morfolojik kriterlere dayalı tür tayininin tek başına güvenli sonuç vermeyeceği, diğer kriterlerle morfolojik tiplendirmenin desteklenmesi gerektiği gerçeği desteklenmiştir.

Geleneksel metodların subjektif olması, uzun zaman alması, farklı türlerin birbiriyle örtüşen özelliklerine bağlı kesin sonuçlar elde edilememesi gibi nedenlerden dolayı *Eimeria* etkenlerin identifikasyon ve karekterizasyonu için moleküler metodların geliştirilmesi önemli bir ilerlemedir. Moleküler teknolojideki ilerlemelerle *Eimeria* türlerinin genomik bilgisi her geçen gün biraz daha aydınlatılmaktadır. Buna bağlı olarak, *Eimeria* genomunun farklı bölgelerini hedefleyen çok sayıda PCR temelli teknik geliştirilmiştir (Stucki ve ark, 1993;

Tsuji ve ark, 1997; Schnitzler ve ark, 1998, 1999; Woods ve ark, 2000a; Gasser ve ark., 2001, 2005; Su ve ark, 2003; Lew ve ark, 2003; Lien ve ark., 2007; Haug ve ark, 2007). Ancak bu tekniklerin rutin tanı ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanımı oldukça sınırlıdır (Lew ve ark, 2003; Gasser ve ark., 2005; Blake ve ark, 2006; Morris ve ark., 2007).

Bilimsel araştırmaların bir çok alanında ilerlemeler kaydedilmesini sağlayan PCR, genetik identifikasyon ve karekterizasyon için temel platform oluşturan bir tekniktir. Yirmi yılı aşkın bir süredir kullanılan bu tekniğe alternatif olarak, nükleik asit dizilimine dayalı amplifikasyon (NASBA) tekniği, ligase zincir reaksiyonu (LCR), dizi yer değiştirme amplifikasyonu tekniği, Q-β replicase ilişkili amplifikasyon tekniği ve linear bağlantılı amplification tekniği gibi birçok nükleik asit amplifikasyon tekniği geliştirilmiş olsa da hiç biri PCR kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Bunun en önemli sebeplerinden biri PCR'ın diğerlerine oranla daha ucuz ve kullanımının kolay olmasıdır (Monis ve ark, 2005).

PCR, kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında, adli tıpta, onkogenesisin araştırılmasında, prob oluşturulmasında, klonlamada, gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin belirlenmesinde, geçmiş DNA'nin incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında, restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) analizinde, in vitro fertilizasyon yapılan tek hücrede implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması ve DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında kullanılabilen bir tekniktir (Akar, 1999).

PCR tekniği geleneksel metodlarla kıyaslandığında daha hızlı, güvenilir, spesifik, duyarlı ve optimize edildiğinde objektiftir. Bu nedenlerle de hastalıkların

tanı, korunma ve kontrolünde; parazitoloji uygulamalarında kullanımı ideal bir yöntemdir (Fernandez ve ark, 2003; Haug ve ark, 2007).

Her ne kadar PCR kullanılarak tanı konmasına ilişkin ilerlemeler varsa da teknik her yerde rutin olarak kullanılabilecek bir test değildir. Çünkü tek bir standardizasyonu yoktur, uygulama için tam donanımlı PCR laboratuvarı kurulması gerekmektedir ve de kalifiye eleman lazımdır . Zira PCR'da en büyük risk kontaminasyondur ve bu nedenle deneyimli çalışanların olması gerekmektedir (Schnitzler ve ark, 1998). Bununla birlikte bu metodların tavuk coccidiosisinin rutin tanı ve epidemiyolojisinde pratikte uygulanabilirliği sınırlı olup bu metodlar hala deneysel olarak kabul edilmektedir (Lew ve ark, 2003).

Filogenetik sınıflandırmada sıklıkla kullanılan internal transcribed spacer (ITS) bölgeleri rRNA genlerine kıyasla daha az korunmuş olduklarından, DNA dizilimlerinde ve uzunluğunda varyasyonlar gösterirler. Bu da spesifik primerlerin dizayn edilmesine olanak sağlar, böylece de farklı türler arasında çapraz reaksiyon riskini azaltır (Schnitzler ve ark, 1998).

Kanatlı *Eimeria* türlerinin ITS-1 bölgeleri yeterli ölçüde türler arası sekans varyasyonuna sahip olup, türlerin belirlenmesi ve diğer türlerden ayırt edilmesinde kullanılan PCR analizleri için primer seçimine olanak tanır. Bu ayırıcı her rDNA transkripsiyon birimindeki 16S ribosomal RNA geninin 3' ucunu, 5.8S rRNA geninin 5' ucundan ayırır. Hem sekans uzunluğunda hem de baz yapısındaki heterojenitesine bağlı olarak ITS-1 bölgesi spesifik primer dizaynı için çok uygundur. Ayrıca, rDNA transkripsiyon biriminin parçası olduğundan multipl gen ailesinin üyesidir ve bu nedenle PCR için çok sayıda potansiyel hedef sağlamaktadır (Schnitzler ve ark, 1998). Devam eden bir *E. tenella* genom projesinde, etkenin ITS-1'i içeren rDNA biriminin 140 kez arka arkaya tekrar ettiğini belirlenmiştir. Bu, tür identifikasyonu için,oldukça hassas PCR temelli bir sistemin geliştirilme şansını arttırmaktadır. Ancak, dizayn edilen primerlerin

dünya genelinde kullanılabilmesi için PCR analizlerinde farklı coğrafik bölge suşlarının da değerlendirilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, farklı saha örneklerinin kalitesi değişiklik gösterebilmekte; örnek materyal,işlem prosedürü, materyalin saklanması, fekal debris miktarı ve *Eimeria* türlerinin oocyst miktarı gibi etkenler testin hassasiyetini direkt olarak etki etmektedir (Haug ve ark, 2007).

ITS1 ya da ITS2 amplikonlarının direkt sekanslanması, izolatlar arasındaki sekans heterojenitesi nedeniyle her zaman olasılıklı değildir. Bu nedenle tavuk *Eimeria* türlerinde, PCR ürünlerinin klonlanma sonrası amplikonların sekanslanması rDNA bölgelerinden genetik marker eldesinde en yaygın kullanılan yöntemdir (Woods ve ark, 2000b).

Türkiye *Eimeria* türlerinin dünyada bildirimi yapılmış referans suşlarla filogenetik akrabalıkları incelendiğinde, elde edilen veriler daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Dünya genelinde yapılan çalışmalar tek türe ait farklı suşların dizilimleri ve filogenideki konumlarını ortaya koymaya yönelik olup bizim çalışmamızın sadece tür düzeyinde kalmasının yetersiz olacağı, suş düzeyinde çalışmalara devam edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar ve öneriler şunlardır:

1. Türkiye oocyst inokulumunda, morfolojik özellikleri dikkate alındığında *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* ve *E. tenella* oocystlerine benzer oocystlerin bulunduğu saptandı.

2. Türkiye'de ilk kez kanatlı coccidiosis etkenlerinin varlığı bir moleküler amplifikasyon tekniği olan PCR ile araştırıldı ve Türkiye oocyst inokulumunda *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* ve *E. tenella* türlerinin bulunduğu anlaşıldı.

3. İnokulumda saptanan Eimeria türlerinden *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* ve *E. tenella* Klasik PCR ile; *E. brunetti* ve *E. mitis* ise Nested PCR ile tespit edildi. Bu iki türün sadece Nested PCR ile belirlenmesi oocyst inokulumundaki sayılarının diğerlerine oranla daha az olmasına bağlandı.
4. Her iki PCR tekniği ile de *E. necatrix* belirlenmedi. Özellikle 12 haftadan büyük hayvanlarda sorun teşkil eden *E. necatrix*'in bu tekniklerle saptanmaması, örneklerin alındığı kümeslerdeki hayvan yaşlarının 1 ile 50 gün (1-7 haftalık) arasında olmasına bağlandı.

5. PCR ile elde edilen amplikonların agaroz jelde görüntülenmesinin ardından, tür spesifik DNA'lar klonlanma prosedürüne alındı. Klonlanan PCR ürünleri sekans analizine gönderildi. Analiz sonuçları BLAST programının veri tabanıyla karşılaştırılarak referans suşlar belirlendi. Türkiye'de bulunan *Eimeria* türlerinin referans suşlarla olan filogenetik akrabalıklarını ortaya koymak için tüm nükleotid dizilerine, MEGA 4.0 programı kullanılarak, filogenetik analiz yapıldı. Türkiye'de saptanan

Eimeria türlerinin sekans bilgilerinin GenBank'a kaydedilmesi için prosedür başlatıldı.

6. Çalışma sonucunda, kanatlı *Eimeria* türleri için sadece oocystlerin morfolojik özelliklerine göre değerlendirme yapılmasının yeterli olmadığı bilgisi doğrulandı. Bu amaçla PCR uygulamasının ise daha objektif ve kesin bilgi sağladığı anlaşıldı.

7. Bu çalışma ile Türkiye'de broilerlerde coccidiosise neden olan *Eimeria* türleri ve sekans bilgileri; Türkiye *Eimeria* türlerinin dünyada bildirilen *Eimeria* suşları ile olan akrabalık dereceleri belirlenirken, bundan sonra yapılacak çalışmalarda Türkiye'de ki suşların araştırılması, Türkiye'de görülen *Eimeria* etkenlerini amplifiye edecek primer dizayn edilmesi, çevre ülkelerdeki suşlarla filogenetik akrabalıklarının daha ayrıntılı olarak incelenmesi, korunma amaçlı uygulanan ve yurtdışından ithal edilen aşılarda bulunan türlerin ve suşların araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Türkiye'de Broiler Yetiştiriciliğinde Coccidiosis'e Neden Olan *Eimeria* Türlerinin Saptanması

Çalışmada, Türkiye broiler yetiştiriciliğinde coccidiosise neden olan *Eimeria* türlerinin belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, Türkiye'deki broiler kümeslerinin tamamını temsil edecek şekilde, Türkiye'nin 6 bölgesinde (Akdeniz Bölgesi, Doğu Anadolu Bölgesi, Ege Bölgesi, İç Anadolu Bölgesi, Karadeniz Bölgesi ve Marmara Bölgesi) yer alan, Türkiye broiler kümeslerinin yoğunlukla bulunduğu 19 ilde (Adana, Adapazarı, Ankara, Balıkesir, Bolu, Bursa, Çanakkale, Düzce, Elazığ, Eskişehir, İzmir, İzmit, Kayseri, Konya, Manisa, Mersin, Samsun, Uşak ve Zonguldak), illerdeki kümes yoğunluğuna göre sayıları istatiksel analizle belirlenen, toplam 1200 kümesten altlık ve dışkı örnekleri toplanarak çalışma materyali oluşturuldu.

Toplanan numuneler arındırma protokolünden geçirildikten sonra, uygun şekilde bir araya getirilerek Türkiye inokulumu hazırlandı. Bu inokulumdan oocyst elde edildikten sonra, ilk etapta oocystlerin morfolojik kriterleri değerlendirilerek varlığı muhtemel türler kaydedildi. Daha sonra, oocystlerden DNA izolasyonu yapıldı. Türkiye'de ilk kez PCR tekniği kullanılarak bu DNA'lar çoğaltıldı. İnokulum içindeki, az sayıda oocyste sahip türlerin belirlenememesi ihtimaline karşı Klasik ve Nested PCR olmak üzere iki tür amplikasyon tekniği uygulandı. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenerek teyit edilmesinin ardından, klonlama prosedürü ile spesifik DNA'lar çoğaltılarak sekans analizine gönderildi. Sekans sonuçları ile referans suşların nükleotid dizileri MEGA 4.0 programı ile analiz edilerek filogenetik ağaç oluşturuldu.

Türkiye'de, broilerlerde coccidiosise neden olan 7 *Eimeria* türünün (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. acervulina* ve *E. mitis*) varlığının araştırıldığı çalışma *sonucunda E. tenella, E. maxima, E. brunetti, E. praecox, E. acervulina* ve *E. mitis* türlerinin Türkiye oocyst inokulumunda bulunduğu saptandı. Morfolojik tanıda, inokulumda *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. acervulina* ve *E. mitis*'e benzer oocyst bulunduğu gözlemlenmesine rağmen PCR'da *E. necatrix* türü belirlenmedi. Türkiye Eimeria türlerinin referans suşlarla karşılaştırılarak akrabalık dereceleri araştırıldı ve Türkiye *Eimeria* türlerine ait sekans verilerinin GenBank'a kaydedilmesi için prosedür başlatıldı.

Anahtar Sözcükler: *Eimeria*, broiler, PCR, sekans analizi

SUMMARY

Determination of *Eimeria spp*. Causing Coccidiosis in Broiler Breeding in Turkey

In this study, we aimed to determine *Eimeria* species causing coccidiosis in broilers raising in Turkey. We selected 6 region of Turkey (Mediterranean Region, Eastern Anatolia Region, Aegean Region, Central Anatolia Region, Black Sea Region and Marmara Region) that included 19 cities (Adana, Adapazarı, Ankara, Balıkesir, Bolu, Bursa, Çanakkale, Düzce, Elazığ, Eskişehir, İzmir, İzmit, Kayseri, Konya, Manisa, Mersin, Samsun, Uşak and Zonguldak) where the broiler poultry houses are common. We collected 1200 stool and litter samples which constituted study material. Sample collections were based on the number of flock in cities determined by statistical analysis.

After collections, samples were subjected to cleaning procedure. Cleaned samples were then prepared for Turkey inoculum. Using this inoculum, oocysts were collected. Later, by assessing oocysts morphologic criterias, probable species were enlisted and then, DNA isolation of the oocysts were made. These DNAs were subjected to PCR to increase the amount of DNA for subsequent studies. In order to define species with low numbers of oocyst, two types of amplification techniques called Classical and Nested PCR were employed. After confirming PCR products in agarose gel electrophoresis, PCR fragments were isolated, cloned and sent for sequence analysis. Phylogenetic analysis of our sequence results and reference nucleotide sequences was conducted by using the MEGA software package v4.1.

Of the 7 *Eimeria* species (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. acervulina* and *E. mitis*) that cause coccidiosis in broilers , we found that 6 species (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. acervulina* and *E. mitis*) were detected in Turkey oocyst inoculum. Although it was observed that some oocysts are similar to *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. acervulina* and *E. mitis* in morphologic diagnosis, *E. necatrix* specie was not detected by PCR. We also subjected the DNA sequences of *Eimeria* species found in our studies to phylogenetic analysis to determine their degree of philogenic similarities and we are also in the process of depositing the sequence data of Turkey *Eimeria* species to GenBank.

Key words: *Eimeria*, broiler, PCR, sequence analysis

KAYNAKLAR

AKAR, N. (1999). Klinik moleküler patolojiye giriş. 2. Baskı, ANTIP, ANKARA.

ALKAN, Z., ÖZBEL, Y., ÖZENSOY, S., ATAMBAY, M. (1997). Moleküler Biyolojik Yöntemler. In: *Parazit Hastalıklarında Tanı.* Ed.: M.A. Özcel, N. Altıntaş, Türkiye Parazitoloji Derneği. **15:** 373-411.

ALLEN, P.C., DANFORTH, H.D., LEVANDER, O.A. (1996). Diets high in n-3 fatty acids reduce cecal lesion scores in broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poult. Sci.* **75:** 179–185.

ALLEN, P.C., DANFORTH, H.D., LEVANDER, O.A. (1997a). Interaction of dietary flaxseed with coccidia infections in chickens. *Poult. Sci.* **76:** 822–827.

ALLEN, P.C., LYDON, J., DANFORTH, H.D. (1997b). Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. *Poult. Sci.* **76:** 1156– 1163.

ALLEN, P.C., FETTERER, R.H. (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microb. Rev.* 15 **(1):** 58-65.

ANDREWS, R.H., CHILTON, N.B. (1999). Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systems. *Int J Parasitol.* **29:** 213–53.

ANON (2009a). [Erişim Adresi: *http://www.besd-bir.org/sektorraporu.htm.*]. Erişim Tarihi: 10.06.2009.

ANON (2009b). [Erişim Adresi: HTTP://USERS.UGENT.BE/~AVIERSTR/PRINCIPLES/PCR.HTML]. Erişim Tarihi:12.04.2009

ANON (2009c). [Erişim Adresi: http://www.pcrstation.com/nested-pcr/]. Erişim Tarihi: 08.02.2009

ANON (2009d). PCR product analysis using semi-dry flatbed gel electrophoresis. [Erişim Adresi: HTTP://WWW1.GELIFESCIENCES.COM/APTRIX/UPP00919.NSF/CONTENT/LD_173360066-R140?OPENDOCUMENT&HOMETITLE=TECH_SUPPORT_SERVICE&PARENTDOC=A5398443586C5EA7C125763B00328FDC.]. Erişim Tarihi: 18.05.2009

ANON (2009e). [Erişim Adresi: www.baycox.com.]. Erişim Tarihi: 09.08.2009

ANON (2009f). [Erişim Adresi: http://blackwellpublishing.com/trun/pdfs/Chapter14.pdf.]. Erişim Tarihi: 01.03.2009.

ARAZ, E., TANYÜKSEL, M. (2009). Moleküler Amplikasyon Teknikleri. In: *Moleküler Parazitoloji*. Ed.: M.A.Özcel, M. Tanyüksel, H. Eren. Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:22,**s:**337-366.

ATASEVER, A. (1992). Civcivlerde Deneysel *Eimeria tenella* Enfeksiyonunun Patolojik Bulguları Üzerinde Işık ve Elektron Mikroskobik İncelemeler. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Saglık Bilimleri Enstitüsü.

AUGUSTINE, P.C., McNAUGHTON, J.L., VIRTANEN, E., ROSI, L. (1997). Effect of betaine on the growth performance of chicks inoculated with mixed cultures of avian *Eimeria* species and on invasion and development of *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina* in vivo and in vitro. *Poult. Sci.* **76:** 802–809.

AUGUSTINE, P.C., DANFORTH, H.D. (1999). Influence of betaine and salinomycin on intestinal absorption of methionine and glucose and on the ultrastructure of intestinal cells and parasite development stages in chicks infected with *Eimeria acervulina*. *Avian Dis.* **43:** 89–97

BARTA, J. R., COLES, B. A., SCHITO, M. L., FERNANDO, M. A., MARTIN, A., DANFORTH, H. D. (1998). Analysis of infraspecific variation among five strains of Eimeria maxima from North America. *Int J Parasitol.* 28: 485-492

BAŞKAYA, H., MİMİOĞLU, M.M., PAMUKÇU, A.M. (1952). Ankara'da civciv ve piliçlerde görülen coccidiosis olayları üzerine araştırmalar. *Türk Vet Hek Dern Derg.,* 22 **(72-73)**: 294-317.

BLAKE, D.P., SHIRLEY, M.W., SMITH, A.L. (2006). Genetic identification of antigens protective against coccidia. *Parasite Immunol*. 28 **(7):**305-14.

CANER, V., ÇARLI, K.T. (2001). Polimeraz zincir reaksiyonu ve bazı tavuk enfeksiyonlarındaki yeri. *J.Fac.Vet.Med.* **20:**137-145.

CARLE, G.F., FRANK, M., OLSON, M.V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science,* **232:** 65–8.

CHAPMAN, H.D. (1994). Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to monensin following the use of a coccidiosis vaccine in broiler chickens. *Poult. Sci.* **73:** 476–478.

CHAPMAN, H.D. (1997). Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in Eimeria parasites of the fowl. *Avian Pathol.* **26:** 221–44.

CHAPMAN, H.D. (1998). Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. *Int. J. Parasitol.* **28:** 1141–1144.

DANFORTH, H.D. (1998). Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *Int J Parasitol*. **28:** 1099–1109.

DAVIES, S.F.M., JOYNER, L.P., KENDALL, S.B. (1963). Coccidiosis. Great Britain, Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh. **p:** 1-136.

DEMİR S. (1991). Bursa bölgesi tavuklarında coccidiose etkenleri ve bunların yayılışı. Doktora tezi, Bursa Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

ELLIS, J., BUMSTEAD, J. (1990). *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitology;* **101:** 1–6.

ESRI (2009). ArcMap Version 9.2 ESRI Inc. 1999-2006, USA

FERNANDO, M.A., PASTERNAK, J.J. (1991). *Eimeria* spp. of the domestic fowl: resolution of chromosomes by field inversion gel electrophoresis. *Exp Parasitol*. **72:** 306–10.

FERNANDEZ, S., COSTA, A.C., KATSUYAMA, A.M., MADEIRA, A.M., GRUBER, A.(2003) A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of Eimeria spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitol Res*, **89:**437–45.

GASSER R.B., WOODS W.G., WOOD J.M., ASHDOWN L., RICHARDS G., WHITHEAR K.G. (2001). Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. *Electrophoresis.* **22**: 3546-3550.

GASSER R.B., SKINNER R., FADAVI R., RICHARDS G, MORRIS G. (2005). High-throughput capillary electrophoresis for the identification and differentiation of seven species of *Eimeria* from chickens. *Electrophoresis*, 26 **(18)**:3479-85.

GASSER, R.B. (2006). Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology.* **136:** 69–89.

GÜREL, A. (1992). Elazığ yöresinde tavuklarda bulunan *Coccidia* türleri ve indensi üzerine araştırmalar. *Etlik Vet. Mikrob. Derg.,* 7 **(2)**: 145-147.

HALL, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41:** 95-98.

HAMMOND, D.M. (1973). Life Cycles and Development of Coccidia In: *The Coccidia*. Ed.: D.M. Hammond, L.P. Long, Unıversity Park Press, Baltımore, Maryland, **p:** 45–80.

HAUG, A., THEBO, P., MATTSSON, J.G. (2007). A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. *Vet Parasitol*. **146**: 35–45.

HAUG, A., GJEVRE, A., THEBO, P., MATTSSON, J.G., KALDHUSDAL, M. (2008). Coccidial infections in commercial broilers: Epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. *Avian Pathol,* 37 **(2):** 161-170.

JAKUBOWSKI, H. (2006). The language of DNA. [Erişim Adresi: http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/plasmid.gif]. Erişim Tarihi: 20.12.2008

JEFFERS, T. (1997). Tyzzer to tomorrow: Control of avian coccidiosis into the next millenium, *In* M. W. Shirley, F. M. Tomley, and B. M. Freeman (Ed.), Control of coccidiosis into the next millennium. Proc. VII Int. Coccidiosis Conf. **p:** 16.

JENKINS, M.C. (1998). Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine. *Int J. Parasitol*. **28:** 1111–1119.

KARAŞ DUMAN, G. (2004): Etlik piliçlerde canlı aşı uygulamalarının koksidiyozdan korunmadaki etkisinin araştırılması. Doktora tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

KARAER, Z., PINAR, Z., KAR, S., GÜVEN, E., ÇAKMAK, A., NALBANTOĞLU, S., KOÇAK, A., ALÇIĞIR, G., EMRE, Z. (2009). Kanatlı coccidiosisine karşı oocystlerin irradiye edilmesi esasına dayalı aşı üretimi I-Tavuk coccidiosisinde altlıklardaki dışkılarda bulunan oocystlerin kantitatif olarak belirlenmesi ve sporlandırılması ile ilgili çalışmalar. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* **5**: 795-800.

KAUFMANN, J. (1996). Parasitic Infections of Domestic Animals. Birkhauser Verlag, Basel.

KAYA, G. (1998). Phylogenetic analyses of five sheep infective *Eimeria* species and development of a novel total nucleic acid extraction method from small numbers of *Eimeria* oocysts. Doctorate Thesis. Department of Clinical Veterinary Science, University of Bristol.

KHEYSIN, Y.M. (1972). Species properties of Coccidia of domestic animals. In: *Life Cycles of Coccidia of Domestic Animals*. Ed: K.S. Todd. Tr: F.K. Plous Jr., University Park Press, **p:** 197-235

KOPKO, S.H., MARTIN, D.S., BARTA, J.R. (2000). Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies. *Poult. Sci.* **79:** 336–342

KUK, S., ERENSOY, A. (2009). Parazit Gen Klonlaması. In: *Moleküler Parazitoloji*. Ed.: M.A.Özcel, M. Tanyüksel, H. Eren. Türkiye Parazitoloji Derneği,Yayın No:22, **s:**171-187.

LEVINE, N.D. (1985). Veterinary Protozoology. First Edition. Iowa State University Pres, Ames, Iowa, **p:** 130-188.

LEW, A.E., ANDERSON, G.R., MINCHIN, C.M., JESTON, P.J., JORGENSEN, W.K., (2003). Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Veterinary Parasitology.* **112:** 33–50

LIEN, Y.Y., SHEU, S.C., LIU, H.J., CHEN, S.C., TSAI, M.Y., LUO, S.C., WU, K.C., LIU, S.S., SU, H.Y. (2007). Cloning and nucleotide sequencing of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA for three species of *Eimeria* from chickens in Taiwan. *Vet. J*. **173**:186–191.

LILLEHOJ, H.S., TROUT, J.M. (1993). Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* **22:** 3–21.

LILLEHOJ, H.S., CHOI, K.D. (1998). Recombinant chicken interferongamma inhibits in vitro Eimeria tenella development, and reduces in vivo oocyst production and body weight loss following challenge infection with *Eimeria acervulina*. *Avian Dis*. **42:** 307–314.

LILLEHOJ, E.P., YUN, C.H., LILLEHOJ, H.S. (2000a). Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria, Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Anim. Health Res. Rev.* **1:** 47–65.

LILLEHOJ, H.S., LILLEHOJ E.P. (2000b). Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis.* **44:** 408– 425.

LONG, P.L. (1973). Pathology and pathogenicity of coccidial infections. In: *The Coccidia*: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and Related Genera. Ed: D.M. Hammond and P.L. Long. University Park Press, Baltimore **p:** 254-294.

MACPHERSON, J.M., GAJADHAR, A.A. (1993). Differentiation of seven *Eimeria* species by random amplified polymorphic DNA. *Vet Parasitol.* **45:** 257–66.

MARTIN, A.G., DANFORTH, H.D., BARTA, J.R., FERNANDO. M.A. (1997). Analysis of immunological cross protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. *Int. J. Parasitol.* **5:** 527–533.

McDOUGALD, L. R. (1997). Coccidiosis. In: *Diseases of Poultry*, 10th edition, Ed:, B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, Y. M. Saif. Iowa State University Press, Ames, **p:** 865-912.

McDOUGALD, L.R. (2003). Protozoal infections. In: *Diseases of Poultry*, 11th Edition. Ed: Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R., McDougald, D.E.Swayne, Iowa State Press, Ames, **p:** 974–991.

McDOUGALD, L.R., REID, W.M. (1991). Coccidiosis. In: *Diseases of Poultry*. 9th Edition. Ed.: B.W. Calnek. Iowa State University Press, Ames, **p:** 780-797.

MEHLHORN, H. (2001). Encyclopedic Reference of Parasitology. Second Edition. Biology, Structure, Function. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York.

MEIRELES, M.V., ROBERTO, L.O., RIERA, R.F. (2004). Identification of *Eimeria mitis* and *Eimeria praecox* in broiler feces using Polymerase Chain Reaction. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 4**(6):** 249- 252.

MERDİVENCİ, A. (1970). Türkiye Parazitleri ve Parazitolojik Yayınları. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay.* 1610/9, Kutulmuş matbaası, İstanbul. **s:** 20.

MEYDANİ, C. (1966). Tavuk koksidiyozisi üzerine furazin likit, koksidin ve sülphamezatin'in proflaktik etkileri yönünden uygulanan deneysel araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi., Modern Matbaa, Ankara.

MINISTRY of AGRICULTURE, FISHERIES and FOOD. (1986). Enumeration of coccidial oocysts. In: *Manual of Veterinary Parasitological Techniques*, Reference Book 418, London. Her Majesty's Stationary Office, **p:** 85-87.

MOLLEY, J.B., EAVES, F.W., JESTON, P.J., MINCHIN, C.M., STEWART, N.P., LEW, A.E.(1998). Detection of *Eimeria acervulina* using the polymerase chain reaction. *Avian Dis*, **42:**119–23.

MONIS, P.T., GIGLIO, S., KEEGAN, A.R., THOMPSON, R.C.A. (2005). Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *TRENDS in Parasitology* 21**(7)**:340-346.

MORRIS, G.M., GASSER. R.B. (2006). Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. *Biotechnol Adv.* 24**(6)**: 590–603.

MORRIS, G.M., WAYNE, G., WOODS, D., RICHARDS, G., GASSER, R.B. (2007). The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into Eimeria populations in intensive poultry establishments. *Molecular and Cellular Probes.* **21:** 288–294.

MULLIS K., (2009). [Erişim Adresi: HTTP://WWW.KARYMULLIS.COM/PCR.SHTML]. Erişim Tarihi: 18.04.2008

OYTUN, H.Ş. (1952). Civciv koksidiyozuna karşı sulphamezathine ile tedavi. *Türk Vet Hek Dern Derg*., **p:** 280-284.

ÖZDAĞ, H. (2007). PCR Temelli Genetik Analiz Yaklaşımları. Ders Notları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. [Erişim Adresi: http://bteml.biotek.ankara.edu.tr/wiki/index.php/BiotekWiki]. Erişim Tarihi: 13.10.2007

PÉLLERDY, L. (1965). Coccidia and Coccidiosis. Revised by: S. Kotlán. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest*,* **p:** 235-287.

PELLÉRDY, L. (1974). Coccidia and Coccidiosis. Second Revised Edition. Revised by: Paul Parey, Berlin und Hamburg and Akadémiai Kiadǒ Budapest. Manuscript revised by:Prof. T. Kobulej and L. Versényi. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest*,* **p:** 261-310.

PELT-VERKUIL, E., BELKUM, A., HAYS, J.P. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Netherlands.

PROCUNIER, J., FERNANDO, M.A., BARTA, J.R. (1993). Species and strain differentiation of Eimeria spp. of the domestic fowl using DNA polymorphism amplified by arbitrary primers. *Parasitol Res.* **79:** 98-102.

QIAGEN, (2009). PCR Cloning Handbook [Erişim Adresi: www1.qiagen.com/literature/render.aspx?id=2062] Erişim Tarihi: 10.01.2008.

RUFF, M.D., DANFORTH, H.D. (1966). Resistance of coccidia to medications. *In Proc. XX World's Poult. Congr.,* Vol. II. **p:** 427–430.

RUFF, M.D., REID, W.M. (1977). Avian Coccidia. In: *Parasitic Protozoa*. Ed.: J.P. Kreier. Academic Press, USA. **p:** 34-67.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Moleculer Cloning**.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SARI, B. (2004). Etlik piliçlerde coccidiosis'den korunmada anticoccidial katkılı yem uygulamalarının etkisi. Doktora tezi. Ankara Üniv Sağllk Bil Enst.

SCHMATZ, D.M. (1997). Anticoccidial drug discovery and design. In: *Control of coccidiosis into the next millennium*. Ed:M. W. Shirley, F. M. Tomley, B. M. Freeman. Proc. VII Int. Coccidiosis Conf. **p:** 20–21

SCHNITZLER, B.E., THEBO, P.L., MATTSSON, J.G., TOMLEY, F.M., SHIRLEY, M.W. (1998). Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic .*Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol.* **27:** 5, 490–497.

SCHNITZLER, B.E., THEBO, P.L., TOMLEY, F.M., UGGLA, A., SHIRLEY, M.W. (1999). PCR identification of chicken Eimeria: a simplified read-out *Avian Pathol.* **28:** 89-93.

SHIRLEY, M.W., JEFFERS, T.K., LONG, P.L. (1983). Studies to determine the taxonomic status of Eimeria mitis, Tyzzer 1929 and E. mivati, Edgar and Seibold 1964. *Parasitology*, 87 **(2):**185-98.

SHIRLEY, M. W., KEMP, D. J., PALLISTER, J., PROWSE, S. J. (1990) A molecular karyotype of *Eimeria tenella* as revealed by contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Mol Biochem Parasitol* **38:**169–173.

SHIRLEY, M.W. (1994a). Coccidial parasites from the chicken: discrimination of different populations of Eimeria tenella by DNA hybridisation. *Res Vet Sci.* **57:** 10–4.

SHIRLEY, M.W. (1994b). The genome of Eimeria tenella: further studies on its molecular organization. *Parasitol Res.* **80:** 366–73.

SHIRLEY, M.W, BUMSTEAD, N. (1994). Intra-specific variation within Eimeria tenella detected by the random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol Res*. **80:** 346–51.

SHIRLEY, M.W., HARVEY, D.R. (2000). A Genetic Linkage Map of the Apicomplexan Protozoan Parasite *Eimeria tenella. Genome Res.* **10:** 1587-1593.

SHIRLEY, M.W., SMITH, A.L., TOMLEY, F.M. (2005). The biology of avian Eimeria with an emphasis on their control by vaccination. *Adv Parasitol.* **60:** 285–330.

SHIRLEY, M.W., SMITH, A.L., BLAKE, D.P. (2007). Challenges in the successful control of the avian coccidian. *Vaccine*. **25:** 5540–5547.

STUCKI, U., BRAUN, R., RODITI, I. (1993). *Eimeria tenella*: Characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a speciesspecific probe. *Exp. Parasitol*. **76**: 68–75.

SU, Y.C., FEI, A.C., TSAI, F.M., (2003). Differential diagnosis of five avian Eimeria species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence. Vet. Parasitol. 117, 221–227.

TAMURA, K., DUDLEY,J., NEI, M., KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.,* **24;** 1596-1599.

TENTER VE SCHNIEDER (2006). Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. In: *Veterinarmedizinsche Parasitologie. Begründet von Josef Boch und Rudolf Supperer.* Ed: T Schnieder. 6., vollstàndig überarbeitete und erweiterte Aulage, Parey, Stuttgart. **p:** 26-72.

TOMLEY, F.M., CLARK, L.E., KAWAZOE, U., DIJKEMA, R., KOK, J.J., (1991). Sequence of gene encoding an immunodominant microneme protein of *E. tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49:** 277–288.

TSUJI, N., KAWAZU, S., OHTA, M., KAMIO, T., ISOBE, T., SHIMURA, K., FUJISAKI, K., (1997). Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. *J. Parasitol*. **83**: 966–970.

TÜRKYILMAZ, S., ESENDAL, Ö.M. (2002). Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanim alanlari. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*. 8 **(1):** 71-76.

VERMEULEN, A.N. (1998). Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millenium. *Int J. Parasitol.* **28:** 1121–1130.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LE, T., HORNES, M., FRIJTERS A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. (1995). AFLP:a new technology for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Res*; **21:** 4407–14.

WILLIAMS, R.B. (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int. J. Parasitol.* **28:** 1089–1098.

WOODS, W.G., RICHARDS, G., WHITHEAR, K.G., ANDERSON, G.R., JORGENSEN, W.K., GASSER, R.B. (2000a). High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five Eimeria species from chickens, and detection of population variation. *Electrophoresis*, **21:**3558–63.

WOODS, W.G., WHITHEAR, K.G., RICHARDS, D.G., ANDERSON, G.R., JORGENSEN, W.K., GASSER, R.B. (2000b). Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of Eimeria from chickens in Australia. *Int J Parasitol.* **30:** 1019-1023.

YOUN, H.J., NOH, J.W. (2001). Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 96**(4):** 257-263.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Esin
Soyadı : GÜVEN
Doğum yeri ve tarihi : Kağızman, 13/02/1979
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı ERZURUM GSM: 0 532 2209280

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2003)
Bursa Anadolu Lisesi (1998)
Sabahattin Solakoğlu İlkokulu (1991)

Yabanci dil: İngilizce (ÜDS: 82,5)

III- Ünvanları

Veteriner Hekim (2003)
Araştırma Gürevlisi (2005)

IV- Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi (2005)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türkiye Parazitoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

<u>Dergilerde yayınlanan makaleler:</u>

1-Kar, S., Kaya, N., **Güven, E**., Karaer, Z. (2006): Yeni geliştirilen tespit kabı ile ergin arılarda Varroa enfestasyonunun belirlenmesi. Uludağ Arıcılık Derg., 6(2):68-73.

2-Karaer, Z., Kar, S., Düzgün, A., **Güven, E**., Pekmezci, Z., Emre, Z. (2006). Hyalomma anatolicum anatolicum (Metastigmata: Ixodidae) mücadelesinde Caesium-137 kaynaklı gamma radyasyon uygulamalarının önemi. T. Parazitol. Derg., 30(4):322-326.

3-Özkan, Ö., Kar, S., **Güven, E**., Ergün, G (2007): Comparıson of proteins, lethality and immunogenic compounds of Androctonus

crassicauda (Olivier, 1807) (Scorpiones: Buthidae) venom obtained by different methods. J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.,13(4):844-856.

4-**Güven, E.,** Kar, S, Doğan, N., Karaer, Z. (2008). Bir kadında *Psychoda albipennis*'in neden olduğu üregenital myiasis. T. Parasitol. Derg., 32(2):174-176.

5-Sungur, T., Kar, S., **Güven, E**., Aktaş, M, Karaer, Z., Vatansever, Z. (2008). Cryptosporidium spp'nin dışkıdan nested PCR ve carbol fuchsin boyama yöntemi ile teşhis edilmesi. T. Parazitol. Derg., 32(4):305-308.
6-Kar, S., **Güven, E**., Karaer, Z. (2008). Ankara'da Şubat ayında babesiosis olgusu. T. Parazitol. Derg., 32(4):379-381.

7-Karaer, Z., Pınar, Z., Kar, S., **Güven, E**., Çakmak, A., Nalbantoğlu, S., Koçak, A., Alçığır, G., Emre, Z. (2009). Kanatlı coccidiosisine karşı oocystlerin irradiye edilmesi esasına dayalı aşı üretimi I-Tavuk coccidiosisinde altlıklardaki dışkılarda bulunan oocystlerin kantitatif olarak belirlenmesi ve sporlandırılması ile ilgili çalışmalar. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 15 (5): 795-800.

8-Karaer, Z., Kar, S., Düzgün, A., **Güven, E.**, Çakmak, A., Emre, Z., Nalbantoğlu, S., Sarıbaş, T., Akçay, A. (2009). Caesium-137 kaynaklı gamma radyasyonla ışınlanmış *Hyalomma anatolicum anatolicum* erkeklerinin bir arada bulundukları ışınlanmamış erkekler ile dişileri dölleme yetilerinin karşılaştırılması. T. Parazitol. Derg., 33(1):37-42.

9-Karaer, Z., Kar, S., **Güven, E.**, Nalbantoğlu, S., Çakmak, A., Akçay, A. (2009). Kanatlı coccidiosisine karşı oocystlerin irradiye edilmesi esasına dayalı aşı üretimi II- Farklı sayıda *Eimeria* spp oocystleri ile enfekte edilen civcivlerde klinik bulgular, bağırsakta ve canlı ağırlıkta meydana gelen değişiklikler. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 15 (6): 943-950.

Sözlü Bildiriler:

1-Karaer, Z., Kar, S., **Güven, E**. (2007). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nde virüs, kene ve konak ilişkisi. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum.

2-Karaer, Z., **Güven, E.**, Kar, S., Nalbantoğlu, S., Koçak, A., Çakmak, A., Akçay, A. (2009). Ankara'da Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı ile ilgili olarak, 01.03.2008-.01.03.2009 tarihleri arasında insanlardan kan emen kenelerin farklı yönlerden yapılan değerlendirmeleri. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Adana.

3-Koçak, A., Nalbantoğlu, S., **Güven, E.**, Ekdal, K., Orkun, Ö., Karaer, Z., Çakmak, A. (2009). Ankara'da evcil hayvan parkı ve hayvanat

bahçesindeki çeşitli hayvanlarda coccidia türlerinin araştırılması. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Adana.

Posterler:

1-Akcay, A., Gurcan, I., **Guven, E.** (2008). Risk factors of coccidiosis in broilers in Turkey. 29th World Veterinary Congress, Vancouver-Canada.

2-**Guven, E.,** Backstead, R., Akcay, A., Karaer, Z. (2009). PCR Identification of broiler coccidiosis in Turkey, XVI World Veterinary Poultry Congress, Marrakesh-Morocco

3-Kar, S., **Güven, E.**, Vatansever, Z.(2009). Marmara bölgesindeki bir harada kene enfestasyonu ve *H. rufipes* varlığı. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Adana.

Kitap bölümleri:

1-Karaer, Z., Kar, S., **Güven, E**., (2007). Kene enfestasyonlarında immunite. In. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. M.A. Özcel, A. İnci, N. Trugay, E. Köroğlu (eds). T. Parazitol. Derneği Yayınları, No:21, İzmir. pp.704-720.

2-Kar, S., **Güven, E.**, Vatansever, Z. (2007). Artropod sanfestasyonlarında immunite. In. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. M.A. Özcel, A. İnci, N. Trugay, E. Köroğlu (eds). T. Parazitol. Derneği Yayınları, No:21, İzmir. pp.673-678.

3-Kar, S., **Güven, E.**, Vatansever, Z. (2007). Pire ve Bit enfestasyonlarında immunite. In. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. M.A. Özcel, A. İnci, N. Trugay, E. Köroğlu (eds). T. Parazitol. Derneği Yayınları, No:21, İzmir. pp.679-684.

4-Karaer, Z., **Güven, E**., Kar, S (2009). Protozoon Hastalıklarında Aşı. In Moleküler Parazitoloji. M.A. Özcel, M. Tanyüksel, H. Eren (eds). T. Parazitol. Derneği Yayınları, No:22, İzmir. pp.747-758.

Katkıda Bulunduğu Projeler:

1-Karaer, Z., Çakmak, A., Nalbantoğlu, S., Kar, S., Alçığır, G.,Emre, Z. (2006-2009): Kanatlı coccidiosisine karşı, oocystlerin irradie edilmesi esasına dayanan aşı üretimi. TÜBİTAK, Proje No: 105 O 451. (Proje asistanı: **Esin Güven**)

2-Karaer, Z., Düzgün, A., Kar, S., Emre, Z., Vatansever, Y., Çakmak, A., **Güven, E.**, Nalbantoğlu, S., Tiftikçioğlu, C., Sarıbaş, T., Alabay, M., Söğüt, A., Saban, E., Tosun, İ., Çerçi, H. (2006-2009). Kırım Kongo

Kanamalı Ateşi'nin naklinde rol oynayan *Hyalomma spp*'nin steril böcek tekniği (SIT) kullanılarak kontrolü. TAEK Projesi.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Sempozyumlar ve Kongreler

1-1.Ulusal Zoonoz Kongresi, 2007, Erzurum
2- XVI World Veterinary Poultry Congress, 8-12 Kasım 2009, Marrakesh, Fas
3-29th World Veterinary Congress, 27-31 Temmuz 2008, Vancouver, Kanada
4-16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1 -7 Kasım 2009, ADANA
5-II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar (*Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar*) Sempozyumu 27-28 Kasım 2008, Ankara

Seminerler

1- Kenelerde Tükürük Bezi ve Beslenme Fizyolojisindeki Önemi.
2- Kene Enfestasyonlarında İmmunite.

VIII- Diğer Bilgiler

Doktora çalışmasına ilişkin, 26.07.2009-26.10.2009 tarihleri arasında, Georgia Üniversitesi, Poultry Science Bölümü'nde, Ankara Üniversitesi BİYEP destekli 3 ay çalışma program.