

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUZU ENTERİTİSLERİNDE CRYPTOSPORIDIOSIS
HASTALIĞININ PATOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Yusuf AKPINAR

**Patoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez DANIŞMANI
Doç. Dr. Ertan ORUÇ**

ERZURUM

2015

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KUZU ENTERİTİSLERİNDE CRYPTOSPORIDIOSIS
HASTALIĞININ PATOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

Yusuf AKPINAR

Tez Savunma Tarihi : 03.06.2015

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ertan ORUÇ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mehmet TUZCU (Cumhuriyet Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLOLAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2. 1. Koyun Yetiştiriciliğinin Önemi	2
2.2. Kuzularda Neonatal İshaller	3
2.3. Cryptosporidiosis	4
2.4. Tarihçe ve Epidemiyoloji	5
2.5. Morfoloji.....	5
2.6. Biyoloji	6
2.7. Bulaşma	8
2.8. Patoloji	9
2.9. Klinik Bulgular	10
2.10. Teşhis	11
2.11. Tedavi ve Koruma.....	11
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Çalışma Materyali ve Örneklemeye	13
3.2. Makroskobik Muayeneler	13
3.3. Bağırsak Smearlarından Modifiye Ziehl Neelsen Boyamaları	13
3.4. Histopatoloji Yöntemleri	14

3.5. İmmunohistokimyasal İncelemeler	15
3.6. İmmunfloresan İncelemeler	16
4. BULGULAR	17
4.1. Örneklerin Aylara Göre Dağılımı	17
4.2. Makroskopik Bulgular	17
4.3. MZN Boyama Sonuçları	20
4.4. Histopatolojik Bulgular	21
4.5. İmmunfloresan Boyama Sonuçları	27
4.6. İmmunohistokimya Boyama Sonuçları	27
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
EKLER	45
EK 1. ÖZGEÇMİŞ	45
EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU	46

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam sırasında akademik bilgi ve becerisiyle bana yol gösteren danışmanım, Sayın Doç. Dr. Ertan ORUÇ'a, yetişmemde emeği geçen ve her türlü desteği veren Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM ve Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKİN'e, immunolojik boyamalarda benim için zaman ayıran Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA ve floresan mikroskopunu kullanımına sunan Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Orhan AKMAN'a, histopatolojik değerlendirmelere katkıda bulunan mesai arkadaşım Sayın Dr. Funda YÜZBAŞIGİL'e, bağırsak smearlarının hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Veteriner Hekim Serpil EKİCİ'ye, maddi ve manevi desteklerinden dolayı Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Sayın Emine ÇİFTÇİ'ye, tez projemi destekleyen Atatürk Üniversitesi BAP Birimi koordinatörlüğüne ve sürekli yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

Yusuf AKPINAR

ÖZET

Kuzu Enteritislerinde Cryptosporidiosis Hastalığının Patolojik Yöntemlerle Araştırılması

Amaç: Kuzu ishallerinde önemli patojenlerinden birisi olan *C. parvum* etkenlerinin, bağırsak smearı ve parafin kesitlerden MZN, immunohistokimyasal ve immunfloresan boyama yöntemleri ile kesin teşhisini yapmak, makroskopik ve histopatolojik bulgularını değerlendirmek ve bir aylığa kadar olan kuzulardaki yaygınlığını ortaya koymaktır.

Materyal ve Metot: Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Patoloji Laboratuvarına bir yıl boyunca, ishal şikayeti ile ölmüş (85 adet) ve agoni halde getirilerek nekropsileri yapılmış (60 adet), 0-30 günlük, 145 adet kuzudan alınan bağırsak örneklerinden hazırlanan parafin kesitler histopatolojik, immunfloresan ve immunohistokimyasal yöntemlerle; taze elde edilmiş 60 bağırsaktan hazırlanan mukoza kazıntı örneklerinin MZN boyamaları da sitopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Bağırsak smearları elde edilen 60 örneğin MZN boyamalarında %13.3 oranında (8 örnek) kırmızı renkte boyanmış, 3-4 µ büyüklükte oval-yuvarlak şekilli etkenler tespit edildi. Parafin blokları hazırlanan 145 örnekten alınan kesitlerin immunfloresan ve immunohistokimyasal boyamalarında ise %13.8 oranında (20 örnekte) pozitif reaksiyon gözlemlendi. immunfloresan ve immunohistokimyasal boyamalarda, *C. parvum* antijenik yapılarının tipik olarak bağırsak epiteli boyunca sıralandığı tespit edildi. Etken tespit edilen bağırsak kesitlerinin histopatolojik incelemelerinde ise; epitel hücre dejenerasyonu, nekroz ve deskuomasyonu, propriada hiperemi, mononükleer hücre ve eozinofil lökosit infiltrasyonları ile epitel yüzünde parazite ait yapılar sıkça görülen histopatolojik değişiklikler olarak belirlendi.

Sonuç: Araştırma sonunda, ishal şikayeti ile nekropsisi yapılmış 0-30 günlük kuzularda %13.8 oranında *C. parvum* tespit edilmiş ve erken dönem kuzu kayıplarında önemli bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada immunfloresan, immunohistokimya ve MZN boyamaları ile etkili sonuçlar alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: *C. parvum*, enteritis, histopatoloji, immunohistokimya, immunfloresan.

ABSTRACT

The Pathologic Investigations of Cryptosporidiosis in Lamb Enteritis

Aim: Cytologic, histopathologic, immunofluorescence and immunohistochemical detection of *C. parvum*, an important pathogen of lamb enteritis, from intestinal smears and tissue sections, evaluation of histopathology and to determine the prevalence in 0-30 days aged lambs with enteritis.

Material and Method: For this aim, intestinal smears and tissue sections obtained from 0-30 days aged 145 lambs, dead (85 lambs) or in agony (45) because of enteritis during 1 years. Smear samples were stained by MZN. For histopathology, immunofluorescence and immunohistochemistry, tissue section were routinely processed according to histopathology procedures and prepared paraffin sections. Slides were stained according to hematoxylin-eosine, immunohistochemistry and immunofluorescence procedures.

Results: 13.3% of smear samples were found positive in MZN stainings. Antibody positivity was detected in the rate of 13.8% immunofluorescence and immunohistochemistry. *C. parvum* antibodies were observed epithelial surface of intestinal sections. In histopathologic examination desquamative, degenerative and necrotic changes of epithelium, cellular infiltration of propria and parasitic structures on the surface of epithelium were observed.

Conclusion: At the end of the study, *Cryptosporidium parvum* antibodies were detected as 13.3%, and 13.8% in smear samples and immunostainings, respectively.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, enteritis, histopathology, immunofluorescence, immunohistochemistry.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>C. parvum</i>	: Cryptosporidium parvum
DAB	: 3,3-diaminobenzidine
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
HE	: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Ig	: Immunoglobulin
MZN	: Modifiye Ziehl-Neelsen (Modified Ziehl-Neelsen)
PBS	: Phosphate buffered saline
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
4X	: 4'lük objektif büyütmesi
10X	: 10'luk objektif büyütmesi
40X	: 40'luk objektif büyütmesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

- Şekil 3.1.** Bağırsak mukozasından kazıntı örneğinin alınışı (a) ve yayma örneğinin hazırlanışı (b) 14
- Şekil 4.1.** Karın boşluğu ve bağırsak serozalarında hafif ödem. Beyaz-sarımsı içerikle dolu incebağırsaklar (oklar) 18
- Şekil 4.2.** Mezenteryumda hiperemik damarlar (beyaz oklar), serozada ödem, hiperemi ve sulu içerikle dolu ince bağırsaklar (siyah oklar). 18
- Şekil 4.3.** Mezenterik lenf düğümlerinde büyüme (ok) 19
- Şekil 4.4.** Bağırsak epiteli ve yangı hücreleri arasında dağılmış *C. parvum* ookistleri (oklar). İnce bağırsak smearı. MZN boyama 20
- Şekil 4.5.** *C. parvum* ookisti (beyaz ok) ve bakteri kümeleri (siyah ok). İnce bağırsak smearı. MZN boyama 21
- Şekil 4.6.** Kütleşmiş atrofik villuslar, propriyada yangısal hücre infiltrasyonu (siyah ok) ve kript epitelinde mitoz (beyaz ok). HE boyama 22
- Şekil 4.7.** Atrofik villuslar ve epitel kaybı (beyaz ok) propriyada yangısal hücre infiltrasyonu ve hiperemi. HE boyama 23
- Şekil 4.8.** Propriyada eozinofil granulositler (beyaz ok) ve fibröz proliferasyon (siyah ok). HE boyama 23
- Şekil 4.9.** Propriyada yangısal hücre infiltrasyonu. HE boyama 24
- Şekil 4.10.** Lenfoid dokuda (peyer plakları) azalma (siyah ok) ve kript epitelinde mitoz (beyaz oklar). HE boyama 24
- Şekil 4.11.** Kript epitelinde mitoz, yakın görünüm (beyaz oklar). HE boyama 25
- Şekil 4.12.** Lenf kanallarında genişleme (beyaz oklar) ve epitel boyunca yerleşmiş *C. Parvum*'un gelişim evreleri (oklar). HE boyama 25

Şekil 4.13. İntraepitelyal lenfositler (oklar). HE boyama	26
Şekil 4.14. Villusların epitel yüzeyleri boyunca <i>C. Parvum</i> 'un gelişim evreleri (oklar). HE boyama	26
Şekil 4.15. Parafin kesitlerde pozitif reaksiyon. <i>C. parvum</i> antibody-mouse monoclonal IgG1, Goat anti Mouse Ig FITC	27
Şekil 4.16. Farklı bir örneğe ait parafin kesitte pozitif reaksiyon. <i>C. parvum</i> antibody- mouse monoclonal IgG1, Goat anti Mouse Ig FITC	28
Şekil 4.17. Parafin kesitlerde epitel yüzeyi boyunca ve eksudatta antijen pozitif reaksiyon. <i>C. parvum</i> antibody-mouse monoclonal IgG1, streptavidin- peroksidaz, DAB kromojen. Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama	28
Şekil 4.18. Başka bir örneğe ait parafin kesitte epitel yüzeyi boyunca antijen pozitif reaksiyon. <i>C. parvum</i> antibody-mouse monoclonal IgG1, streptavidin- peroksidaz, DAB kromojen. Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama	29

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Kuzu ve oğlaklarda ilk iki hafta içerisinde şekillenen ishal olguları	3
Tablo 4.1. Örneklerin aylara göre dağılımı ve <i>C. parvum</i> pozitif örnek sayıları	17
Tablo 4.2. <i>C. parvum</i> tespit edilen ve edilmeyen kuzularda görülen makroskopik bulgular ve oranları	19
Tablo 4.3. <i>C. parvum</i> tespit edilen ve edilmeyen kuzularda görülen histopatolojik bulgular ve oranları	22

1. GİRİŞ

Kuzu ishalleri çoğu zaman virus, bakteri, protozoon ve diğer etkenlerden biri ya da birkaçı tarafından oluşturulan multifaktöryel bir durumdur. Özellikle neonatal dönem olarak tanımlanan 0-28 günlerde sıkça ortaya çıkan ishaller hastalıklar koyun yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından birisi olarak görülmektedir.^{1,2}

Bir protozoon olan *Cryptosporidium*, Apicomplexa sınıfına ait koksidian bir protozoon olup, veteriner ve beşeri önemi bulunmaktadır. Buzağı, kuzu, oğlak ve kanatlılarda yüksek morbidite ve mortalite gösterebilen *Cryptosporidium* enfeksiyonları aynı zamanda zoonoz karakterlidir.³⁻⁵

Rutin histopatolojik muayenelerde etkenin tanısı, çoğu zaman şüpheli olarak kalmaktadır. Hızlı tanı yöntemlerinden birisi olan, dışkı örneklerinde MZN boyama yönteminin de diğer yöntemlere oranla daha yetersiz olduğu dikkat çekmektedir.⁶

Bu çalışmanın amacı; neonatal dönem kuzu ishallerinde önemli bir patojen olarak görülen *Cryptosporidium parvum* etkenlerinin, bağırsak smearlarında; MZN, doku kesitlerinde ise immunohistokimyasal ve immunfloresan boyama yöntemleri ile teşhisini yapmak, makroskobik ve histopatolojik bulgularını değerlendirerek, bir aylığa kadar olan kuzu ishallerindeki durumunu ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koyun Yetiştiriciliğinin Önemi

Günümüzde hayvancılık gelişmiş ülkelerde endüstriyel bir sektöre dönüşmüş ve ülke ekonomilerinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. FAO'nun 2012 yılı verilerine göre dünyada 1,5 milyar baş sığır, 199 milyon baş manda, 2.2. milyar baş koyun-keçi ve 24 milyar adet kanatlı varlığı bulunmaktadır.⁷

Ülkelerin gelişmişlik göstergelerinden birisi de kişi başı tüketilen hayvansal protein miktarıdır. FAO'nun 2009 verilerine göre, kişi başına hayvansal kökenli protein tüketimi Avrupa Birliği ülkelerinde 62 gr/gün, Amerika Birleşik Devletleri'nde 72 gr/gün ve dünya ortalaması 31 gr/gün iken Türkiye'de 28 gr/gün'dür. Dünyada kişi başı yıllık et üretimi 42 kg iken, Türkiye'de 39 kg olarak bildirilmektedir. Kişi başı süt üretimi ise dünyada 103 kg iken Türkiye'de 235 kg'dır. TÜİK 2013 verilerine göre Türkiye'de 14 milyon 415 bin 257 baş sığır bulunurken, 38 milyon 509 bin 795 baş koyun-keçi bulunmaktadır. Ülkemizde kırmızı et üretiminin % 29'u, süt üretiminin ise % 8'i koyun ve keçilerden sağlanmaktadır.⁷

Uyum yeteneği yüksek bir hayvan olan koyunun, aynı zamanda üreme yeteneğinin yüksek olması, meraya dayalı yetiştirilmesi, verime geçiş sürecinin kısalığı, yem giderlerinin düşüklüğü ve dışa bağımlılığın azlığı gibi olumlu özellikleri dikkate alındığında koyunculuğun önemi artmaktadır.⁸

Koyunculuğun gelişimindeki pozitif faktörlerin yanında, bilinçsiz yapılan hayvancılık, yeterli koruma tedbirlerinin alınmaması, uygun olmayan yetiştirme koşulları gibi olumsuzluklar ve enfeksiyon hastalıkları, koyunculuk sektörünü olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan araştırmalarda koyunlarda gastrointestinal hastalıklara bağlı kayıpların ön plana çıktığı görülmektedir.⁹

Neonatal dönem olarak tanımlanan 0-28. günlerde sıkça ortaya çıkan ishalleri hastalıklar uzun yıllardır üzerinde durulan en önemli konulardan birisi olarak dikkat çekmektedir.^{1,2}

2.2. Kuzularda Neonatal İshaller

Yeterli koruma tedbirleri alınmamış işletmelerde altlık, ahır, mera ve birlikte barındırılan diğer yaşlı hayvanlarda bulunan ishal etkenleri ile karşı karşıya kalan kuzu ve oğlakların neonatal dönem ishalleri önemli bir problem olarak görülmektedir.¹⁰

Kolostrum veya pasif bağışıklıkla kazanılması gereken immunoglobulin yetersizlikleri, annedeki latent enfeksiyonlar, bakım-besleme koşullarının uygunsuzluğu, doğum zamanı, doğum ağırlığı ve parite neonatal dönem hastalıklarının oluşmasında hazırlayıcı rol oynayan önemli etmenler olarak bildirilmektedir.^{11,12} Kuzu ve oğlaklarda ilk iki hafta içerisinde şekillenen ishal olguları tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kuzu ve oğlaklarda ilk iki hafta içerisinde şekillenen ishal olguları.¹¹

Hastalık etkeni	Hastalık periyodu	Semptomlar
Kuzu dizanterisi (<i>Cl. perfringens</i> Tip B)	1-7 gün (14)	Abdominal sancı, hafif timpani, önce yeşil-sarı, daha sonra kahve-kırmızı kanlı ishal merkezi sinir sistemi belirtileri
Enteropatojen <i>E. coli</i> türleri	1(2)-8 gün	Kanlı veya süt pıhtıları içeren gri-sarı renkli ishal, abdominal sancı.
Salmonellozis	Doğum sonrası 3. günden itibaren	Yüksek ateş, sarı renkli ishal, sancı
<i>L. monocytogenes</i>	2-8 (28) gün	Ishal ve sepsis tablosu
Rotavirus enfeksiyonu	1-8 gün (14)	Sarı renkli sulu dışkı, kısa sürede eksiklik oluşumu, mikrob enfeksiyon
Coronavirus enfeksiyonu	3-8 gün (14)	Mukoza ve süt parçaları içeren sulu dışkı, dehidrasyon, mikrob enfeksiyon
Cryptosporidiosis	5-8 gün (14)	Gri-beyaz, yeşil renkli ishal, abdominal sancı, hızlı gelişen eksiklik

2.3. Cryptosporidiosis

Cryptosporidiosis, birçok hayvan türü ve insanda Apicomplexa sınıfına ait koksidian bir protozoon olan *Cryptosporidium*lar tarafından oluşturulan, özellikle ruminantların neonatal dönemlerinde etkisini gösteren ve aynı zamanda zoonoz özellikli bir enfeksiyondur.³⁻⁵

Cryptosporidium'ların taksonomi içerisindeki yeri şu şekildedir.¹³

Alem: Protista

Kök: Alveolata

Kökaltı: Apicomplexa (Sporozoa)

Sınıf: Coccidea

Dizi: Cryptosporiida

Aile: Cryptosporiidae

Soy: *Cryptosporidium*

Cryptosporidium soyu içerisinde 16 geçerli tür bildirilmiştir. Ancak, morfoloji, biyoloji biyokimya, patojenite, konokçı özellikleri ve immunoloji gibi bir çok çalışma *C. parvum* üzerine yoğunlaşmıştır. Bu sebeple *C. parvum* insan ve veteriner hekimlik alanında önemli bir patojen olarak görülmektedir.¹⁴

İlk olarak farelerde tanımlanan ve küçük bir parazit olan *C. parvum* sığır, diğer ruminantlar ve insanda; *C. andersoni* sığırdı; *C. suis* domuzda; *C. felis* kedide; ve *C. canis* köpekte bildirilen önemli türlerdir. *C. parvum*, *C. suis*, *C. felis* ve *C. canis* zoonoz özellikli olmakla birlikte en etkili tür *C. parvum*'dur. *C. hominis* ise hayvan teması ile ilişkisi olmayan ve insan salgınlarının çoğunluğundan sorumlu olan türdür.^{15,16} Bununla birlikte ishalleri insanlardan izole edilen *Cryptosporidium* sp.'nin kuzularda deneysel Cryptosporidiosis oluşturduğuna dair veriler de bulunmaktadır.¹⁷

2.4. Tarihçe ve Epidemiyoloji

Cryptosporidia'lar ilk olarak Tyzzer tarafından sırasıyla 1907 yılında farelerin gastrik bezlerinde ve 1912 yılında ince bağırsaklarında ve 1929 yılında ise tavukların Bursa fabrisyusunda tespit edilmiştir.^{14,18} *Cryptosporidium parvum*'da yine Tyzzer tarafından 1912 yılında tanımlanmıştır.¹⁴ Etkenin ishalle ilişkilendirilmesi ise uzun yıllar sonra ortaya konulmuştur. *Cryptosporidium meleagridis* Slavin tarafından 1955 yılında genç hindilerde ishalle ilişkilendirilmiş, takip eden yıllarda morfoloji ve hayat döngüsü üzerine çalışmalar artmıştır.^{14,18} Cryptosporidiumlar sığır ishallerinde ise ancak 70'li yılların başlarında farkedilebilmiştir.¹⁴

İnsanlardaki ilk Cryptosporidium raporları ise 1976 yılında kontamine çiftliklerle ilişkisi olan ve direnci düşük 2 ayrı insanda bildirilmiş, 1982 yılında ise Centre for Disease Control (CDC), Amerika Birleşik Devletleri'nde farklı eyaletlerden AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome) sebebiyle bağışıklık direnci düşmüş hastalarda Cryptosporidiosis bildirilmiştir.^{3,15}

Yapılan çalışmalarda koyunlarda; *C. parvum*, *C. bovis*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, , *C. fayeri*, ve *C. suis* olmak üzere 7 farklı Cryptosporidium türü tespit edilmiştir.¹⁹ Bu türler arasında *C. parvum* ve *C. ubiquitum* en yaygın türler olarak tanımlanmaktadır.²⁰

Dünyada yaygın bir enfeksiyon olarak bildirilen Cryptosporidiosis¹⁹ hastalığı üzerine Türkiye'de farklı yöntemlerle yapılan çalışmalarda, ishalleri kuzularda Cryptosporidiosis oranının %2.97-%46.5 arasında değiştiği gözlenmiştir.^{2,21-26}

2.5. Morfoloji

Cryptosporidium'lar; Plasmodium, Babesia, Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, Cyclospora ve Eimeria veteriner ve beşeri hekimlik açısından önemli diğer protozoonlarla birlikte apicomplexa kökaltında sınıflandırılırlar.²⁷

Cryptosporidium genusu içerisindeki tüm üyeler hücre içi parazitler olup diğer ökaryotik protozoonlar gibi çekirdeklerinde çift katmanla çevrili DNA'ya sahiptirler ve çoğunlukla mitokondri taşırlar. Günümüzde genom dizi analizleri tam olarak ortaya konulan türler *C. parvum* ve *C. hominis*'dir.⁵

Gelişim evrelerine göre mikroorganizmanın büyüklüğü 2-6 mikron arasında değişir. Makrogamontlar 5 mikron büyüklüğünde olup küçük granüller içerirler. Parazitin farklı evreleri ışık mikroskobu altında tanımlanabilir ancak en iyi görüntüler elektron mikroskopunda elde edilir. Dört sporozoit içeren ookistler dışkı flotasyonu ya da Giemza, MZN, Auramine, floresan işaretli antikor teknikleri ile boyanmış dışkı smearlarında ortaya konabilir. MZN boyamalarda ookistler parlak pembe-kırmızı boyanırlar.^{4,16,28,29}

2.6. Biyoloji

C. parvum'un hayat siklusu, *Eimeria* ve *Toxoplasma* gibi kist oluşturan diğer mikroorganizmalarla benzerlik göstermekle birlikte farklı olarak Cryptosporidium'larda ookist sporulasyonu konak içerisinde şekillenir ve bu şekilde dışkı ile atılırlar.²⁷ Bunlar aynı zamanda enfektif özellik gösterirler.³⁰ *C. hominis* ve *C. parvum* genellikle incelebağırsaklarda lokalize olur. Fare ve buzağıda ileo-sekal kavşağın ileum tarafı, *C. parvum* için favori yerleşim bölgesidir. *C. muris*, *C. andersoni* ve *C. serpentis* gastrik mukozaya yerleşirken, *C. baileyi* tavuklarda solunum yolları ve kloakayı tercih etmektedir.¹⁴

Cryptosporidium türleri monoksen ve zorunlu intraselüler mikroorganizmalardır. Enfektif ookistler içerisinde, 4 adet çıplak ve hareketli sporozooit taşırlar. Enfekte konakta eksitasyon, hücresel invazyon ve internalizasyon, merogoni, gametogoni, fertilizasyon, ookist duvarının oluşumu ve sporogoni olmak üzere farklı evreler şekillenir. Eksitasyon evresinde enfekte konakçının dışkısı ile atılan ookistler diğer

konak tarafından ağız yoluyla alınır. Ağız yolu ile alınan ookistlerin duvarı vücut ısısı, asidik etki, tripsin ve safra tuzları etkisiyle yıkımlandıktan sonra muz şeklinde olan 4 adet sporozooit serbest kalırlar. Serbest kalan sporozoitler apikal kompleks organelleri vasıtasıyla bağırsak enterositlerinin mikrovilluslarına tutunurlar. *Cryptosporidium* türlerinde bu gelişim intraselüler fakat ekstrasitoplazmik olarak şekillenen parazitofor vakuoller içerisinde devam eder. Apikal kompleks organelleri ile konak hücre ile temasa gelen parazitin ön kısmında hilal şeklinde başlayan ve oval ya da sferik devam eden ve kökenini parazitten alan bir vakuol şekillenir ve paraziti çevreler. Bu ilk vakuol preparazitofor olarak tanımlanır.³¹ Oluşan vakuol daha sonra konakçı hücre membranı ile füzyona uğrayarak konakçı ve parazit arasında bir arayüz oluşur. Sonrasında parazit, konakçı bağırsak epiteli mikrovilluslarından köken alan ince zarlı bir vakuol ile çevrelenir ve olgun parazitofor oluşturulur.³² Parazitofor içerisindeki parazit intraselüler olmakla birlikte doğrudan konakçı sitoplazması ile ilişkili olmayıp ekstrasitoplazmiktir. Internalizasyon süresinde sporozoit küresel bir yapı değişikliğine uğrayarak trofozoit adını alır. Hücre kültürü çalışmalarında ilk temasla birlikte internalizasyon işleminin 15 dakika sürdüğü bildirilmektedir. Bu aşamadan sonra etkenin eşeysiz (merogonişizogoni) ve eşeyli (gamegoni) çoğalma dönemi başlar. *C. baileyi* gibi bazı cinslerde 3 meront bulunurken *C. parvum*'da 2 meront oluşumu vardır.¹⁴

Şizogoni ile trofozoit içerisindeki çekirdek bölünerek 6-8 yeni çekirde oluşur. Bu yeni çekirdeklerin herbirisi tekrar bölünme geçirerek 6-8 merozoite dönüşür. Merozoitleri taşıyan ana hücreye Tip I meront (şizont) ismi verilir. Tip I merontların zarlarının parçalanmasıyla açığa çıkan merozoitler yeni hücreleri enfekte ederler ve yeni bir merogoni evresi başlatırlar ve tekrar Tip I merontlarla birlikte Tip II merontlar oluşur. Tip II merontlar 4 merozoit üretirler. Sadece Tip II merontlardan üreyen merozoitlerin mikrogamont (mikrogametosit, erkek) ve makrogamont (dişi)'lara

farklılaşması ile eşeyli üremenin olduğu düşünülmektedir. Her bir mikrogamont çok çekirdekli olur ve her bir çekirdekten sperm hücresi eşdeğeri olan mikrogametler şekillenir. Ovum eşdeğeri olan makrogamontlar ise tek çekirdekli olarak kalırlar. Fertilize makrogamontlar ookist olarak gelişirler. Ookistlerin sporlanması konakçıda sporlanırlar. sporlanan ookist olgunlaştığında 4 sporozoit içerir. Gastrointestinal sistemde dışkı ile, respiratorik sistemde ise nazal sekresyonla atılırlar.¹⁴ Ookistlerin maksimum atılma günü 11. gündür. İki tip ookist şekli vardır. Bunların çoğunluğu kalın duvarlı olup dışarı atılır. Diğer bir kısım ookistler ise ince duvarlı olup otoenfeksiyon oluştururlar.^{11,16,28}

2.7. Bulaşma

Dış ortama atılan ookistler oldukça dirençlidirler. 4 C’de 6 ay, oda ısısında 4 ay enfeksiyon yeteneğini korurlar. 65 C’de kısa sürede etkisiz kalırlar. Genç kedi ve kemirgenler ookistleri yayarlar. Ayrıca karasinekler kontamine dışkılarından alarak mekanik olarak etkeni taşırlar.¹¹

İnsanlara bulaşma, insandan insana olabileceği gibi çiftlik, hayvanat bahçesi gibi enfekte hayvanlarla birlikte bulunan insanlarda da şekillenebilir. İçme suları ile birlikte eğlence-süs sulamaları da aktarımda önemli rol oynarlar. Yine sulama sularından ve taze sebzelerden de kontaminasyonlar bildirilmiştir.^{15,33-35}

Kuzulara bulaşma, fekal-oral yol aracılığıyla kuzudan kuzuya ya da yetişkin koyunlardan kuzuya nakil şeklinde olur. Ortak yaşam alanları ve kontamine su bu aşamada önemli rol oynar. Enfeksiyon dozu çok düşük olup çok az sayıda (5’den az) ookist bile enfeksiyon oluşturabilir. Etken aseksüel (eşeysiz) çoğalma döneminde çok hızlı çoğalarak enfektif özellikli merozoitlere dönüşür. Enfekte olan bir kuzu 5-10 gün içerisinde hastalığı çok daha büyük sürülere yayabilir. Çiftlik ortamındaki rodentler potansiyel bulaş kaynağıdır. Serbest dolaşımli bir çok hayvan asemptomatiktir ve

kuşlar aracılığıyla mekanik bulaşma da söz konusudur. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında Cryptosporidiosis kontrolü güç bir hastalıktır.³

2.8. Patoloji

Enfeksiyon özellikle bakım beslemesi yetersiz kuzularda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreder. Dış ortamda bulunan ookistlerin dezenfektanlara karşı dirençli olmaları ve 20 C de aylarca canlı kalabilmeleri, enfeksiyonun yayılışında önemli bir etkindir.^{23,29,36} Cryptosporidiumların merogoni, gametogoni ve sporogoni dönemleri enfekte epitel hücrelerinin fırçamsı kenarlarında görülür.¹⁶ Biyoloji kısmında da anlatıldığı üzere, bu etkenler konakçının hücre membranı ile çevrili vakuoller içinde yerleşiktirler. Sporozoit membranında bulunan özel bir protein (CP47), ileal epitel hücre boyunca yerleşik fırçamsı kenarda yer alan hedef hücrelerdeki bir glikoprotein olan P57 aracılığı ile hedef hücrelere bağlanır.³⁷ *C. parvum* kuzularda alt jejunum ve ileumda yerleşirken şiddetli olgularda sekum, kolon ve rektuma kadar yayılabilir.³

Cryptosporidiosis bazı türlerde ve çoğu zaman asemptomatik seyreder. Özellikle yenidoğan ruminantlar (buzağı, kuzu, oğlak, geyik yavrusu) enfeksiyona yatkındırlar ve bunlarda *C. parvum* etkili olur. İlk 1-4 haftalık dönem buzağılarda ve 5-14 günlük kuzularda ishal, iştahsızlık ve depresyon görülür.¹⁶

Cryptosporidium enfeksiyonlarında immunolojik olarak daha çok hücre aracılı savunma görülürken humoral savunma da destek sağlar. Kombine immunolojik yetmezliği bulunan arap atı taylarında, Feline Leukemia Virus ile enfekte kedilerde ve Distemper'li köpeklerde ağır enfeksiyonlar bildirilmiştir.¹⁵

Cryptosporidiumlar immun olojik yetersiz bireylerde, özefagustan kolona kadar sindirim sisteminin herhangi bir yerinde bulunabilir. Solunum yollarında olduğu kadar karaciğer, safra ve pankreas kanallarında da görülebilir. Cryptosporidiosis genç

ruminantlarda çoğunlukla enterotoksijenik *E. coli*, rotavirus ve coronavirus ile birlikte bulunacağı gibi primer patojen olarak da kendini gösterebilir.^{15,16}

İntestinal Cryptosporidiosis tüm türlerde değişen derecede villus atrofi ile kendisini gösterir. Villuslarda kütleşme, yapışmalar ve Lieberkühn kriptlerinde hipertrofi vardır. Mukoza epiteli çoğu zaman kübik, yuvarlak yada kısa prizmatik değişikliğe uğrar ve villuslarda düzensiz çıkıntılar oluşur. Villus epitelinin mikrovillus yüzeyi boyunca çok sayıda Cryptosporidium görülebilir. Etken ince bağırsakların distal yarımı özellikle de ileumda belirgin olup sekum ve kolonda nadiren yerleşir. Hafif nötrofil lökosit birikimi ile birlikte mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekebilir. Enfekte buzağılarda intraepitelyal T lenfositlerde artış bildirilmiştir.¹⁶

2.9. Klinik Bulgular

C. parvum enfeksiyonları 4-10 günlük neonatal dönem kuzularında en önemli hastalıklardan birisi olarak görülmektedir. Enfekte kuzularda bol sulu bir ishal görülür. İshal sebebiyle dehidrasyon, iştahsızlık, uyuşukluk ve abdominal gerginlik dikkati çeker. İshal ilk ookist alımını takiben 3-7 gün sonra başlar ve dışkıdaki ookist miktarına bağlı olarak (10^5 - 10^7 /gr) en üst seviyeye ulaşır. Klinik belirtiler azalsa bile ookist atılımı günlerce devam edebilir. Şiddetli olgularda ishalle birlikte 2-3 gün içerisinde ölümler görülebilir. Klinik bir vakada, 7-10 gün içerisinde 10^{10} adet ookist üretimi mümkün olmaktadır. Erişkin koyunların hastalığı asemptomatik olup çok daha az sayıda ookist yayarlar.^{3,4,29}

Duyarlı gençlerde ishal 14 gün kadar sürebilir. Sulu, pis kokulu, mukuslu bir ishal vardır. Vücut ısısı yükselmez. Gözler orbita içerisinde çöküktür. Aşırı sıvı kaybına bağlı olarak 24-36 saat gibi kısa sürede dehidrasyon, asidozis, eksikozis ve hipoglisemi oluşur.¹¹

Cryptosporidiosis'te villus atrofi ile birlikte gelişen absorpsiyon bozukluğuna bağlı olarak ishal gelişir. Mukoza yüzeyinde olgunlaşmamış epitel hücre popülasyonunda artış vardır. Absorptif hücre yüzeyler büyük oranda Cryptosporidium etkenleri tarafından işgal edilmiştir. Başta prostoglandinler olmak üzere yangısal mediatörlerin salgılanması mukozal sekresyonu epitel hücrelerinin permeabilitesini artırır.¹⁶

2.10. Teşhis

Cryptosporidiosis enfeksiyonlarının teşhisinde dışkı örneklerinin MZN ya da Auromine gibi boyamalarla birlikte, HE ile boyanmış doku kesitlerinde epitel hücrelerinin fırçası kenarlarında tipik görünümünden yararlanılabilmektedir. Etkenler konakçının epitel hücrelerinin fırçası kenarları boyunca, hücre membranı ile çevrili vakuoller içerisinde görülebilirler. Daha spesifik teknik olarak; ELISA, immunfloresan ve immunohistokimyasal boyamalar ile birlikte moleküler teknikler kullanılmaktadır.^{22,24-26,28}

2.11. Tedavi ve Koruma

Cryptosporidiosis hastalığının etkili bir tedavisi yoktur. Halofuginon, 60-125 µg/kg dozda 7 gün süre ile kullanıldığında ookist saçılımını azaltmakla birlikte yüksek dozlarda kanlı ishal, dehidrasyon gibi komplikasyonlara, 3 kat dozda ise ölümlere yol açtığı bildirilmiştir. Yine bir diğer etkili ilaç olan Lasolacid Sodyum'da toksik etkisi sebebiyle tercih edilmemektedir. Antiprotozoal ilaçlarla birlikte destekleyici tedaviler denenebilir. Koruma olarak enfekte hayvanların ayrılması, ortamdaki ookistlerin tahrip edilmesi önemlidir. Ookist yıkımlanmasında dezenfektanlar etkisiz olup ancak buharla mümkündür.¹¹

Türkiye'de Cryptosporidiosis enfeksiyonunun teşhisine yönelik çalışmaların daha çok dışkı örneklerinden parazitolojik muayenelerle yapıldığı görülmektedir.^{2,10,21-}

^{23,25,26} Bununla birlikte *C. parvum*'un doku düzeyinde antijenik lokalizasyonu ve histopatolojik özellikleri üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunurken, ²⁴ parafin kesitlerde immunfloresan, bağırsak smearlarında se sitolojik yöntemle teşhis edilebilirliği üzerine kapsamlı bir araştırmanın bulunmadığı dikkati çekmiştir.

Çalışma, ishal belirtisi gösteren 0-30 günlük kuzularda, *C. parvum*'un MZN, immunohistokimya ve immunfloresan boyama yöntemleri ile teşhisini yapmak, makroskopik ve histopatolojik bulgularını değerlendirmek ve kuzu ishallerindeki durumunu ortaya koyarak bu alandaki açıklığı gidermek amacıyla yapılmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Çalışma Materyali ve Örnekleme

Çalışma materyalini, Haziran 2013-Mayıs 2014 dönemi içerisinde Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Patoloji Laboratuvarına, 129 farklı işletmeden ishal şikayeti ile getirilen ölmüş (85 kuzu) ve agoni haldeki (60 kuzu) 0-30 günlük toplam 145 adet kuzudan alınmış bağırsak örnekleri oluşturmuştur.

3.2. Makroskopik Muayeneler

Örnek temini yapılacak kuzuların anamnezinde ishal şikayetinin olmasına dikkat edildi. İshal şikayeti veya belirtisi olan, 0-30 günlük yaştaki 145 adet kuzunun sistemik nekropsileri yapıldı. Çalışmanın amacına uygun olarak, karın boşluğu, ince ve kalın bağırsaklar, mezenterik lenf düğümleri muayene edildi.

Makroskopik muayene sırasında dış bakıda ishal, dehidrasyon, kaşeksi; iç bakıda ise karın boşluğunda sıvı, bağırsaklarda hiperemi, seroza yüzeylerinde kanama, mezenterik lenf düğümlerinde büyüme gibi değişiklikler kaydedildi. Sonraki aşamada bağırsaklar usulüne uygun olarak açılarak bağırsak lumeni ve mukoza incelendi. Bu amaçla mukoza yüzeyinde eksudat, nekroz, kanamalı içerik, irinli içerik, fibrinli içerik gibi farklı lezyonlar dikkate alındı.

Çalışma sonrasında Cryptosporidiosis yönünden pozitif olarak tespit edilen vakalar tekrar değerlendirildi ve Cryptosporidiosisli kuzularda görülen makroskopik lezyonlar ayrıca tespit edildi.

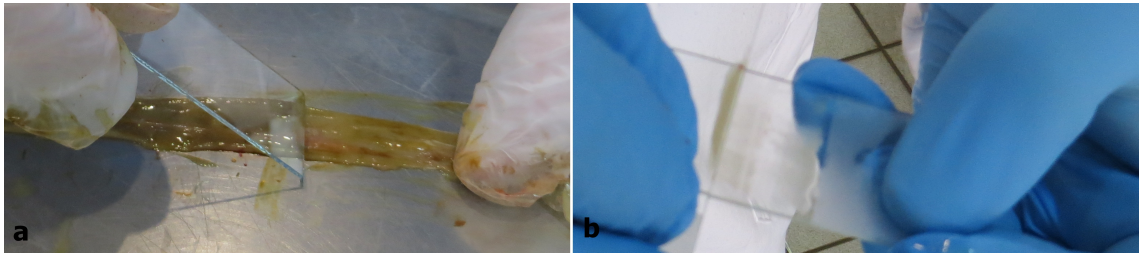
3.3. Bağırsak Smearlarından MZN Boyamaları

Çalışma süresi içerisinde agoni halde elde edilen 60 kuzunun nekropsileri sırasında ince bağırsakların mukoza yüzeylerinden kazıntı örnekleri alındı. Bu amaçla nekropsi sırasında taze alınan bağırsak örnekleri öncelikle makas yardımıyla lumen boyunca açıldı. Bağırsak içeriği boşaltıldıktan sonra, temiz bir lam kenarı ile mukoza

yüzeyi temizlendi. İkinci bir lam kenarı ile bağırsak mukozası boyunca kazıntı alındı. Alınan kazıntı örneği, farklı temiz lamlara yayıldı ve metil alkol ile kaplanarak kurumaları sağlandı (Şekil 3.1).

MZN boyamaları için ticari temin edilen boyama seti (ZIEHL-NEELSEN modified for Cryptosporidium, Bio-optica, 04-110803, İtalya) kullanıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda kit prosedürüne uygun olarak preparatlar boyandı.

Bu amaçla smearlar A ayracında 10 dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı. Aynı şekilde B ayracında 15 saniye, C ayracında 30 saniye bekletildi. Her iki ayraç sonrasında distile su ile yıkandı. Havada kurumaları sağlanan örnekler, ışık mikroskobu altında (DP72 kameralı Olympus BX51, Tokyo, JAPONYA) sırasıyla 4X, 10X ve 40X büyütme ile incelendi ve fotoğraf çekildi.



Şekil 3.1. Bağırsak mukozasından kazıntı örneğinin alınışı (a) ve yayma örneğinin hazırlanışı (b).

3.4. Histopatoloji Yöntemleri

Nekropside elde edilen bağırsak örnekleri, lumenleri açıldıktan sonra düz bir zemine açıldı. Katlanmaları önlemek için mukoza yüzeylerine % 10'luk tamponlu formalin solusyonu damlatıldı. Bir kaç dakikalık ön tespit işleminden sonra örnekler tekrar % 10'luk tamponlu formalin solusyonu içeren kavanozlara alınarak tespit işlemine devam edildi. Akar su altında yıkanan doku örneklerinden sırasıyla rutin alkol-ksilol takip işlemleri yapılarak parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin

bloklardan alınan 5 mikron kalınlığındaki mikrotom kesitleri hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Tüm kesitler ışık mikroskopunda (DP72 kameralı Olympus BX51, Tokyo, JAPONYA) sırasıyla 4X, 10X ve 40X büyütme ile incelendi ve uygun görülenlerden mikroskopik fotoğraflar çekildi.

3.5. İmmunohistokimyasal İncelemeler

Deparafinizasyon işlemi için kesitler 3x5 dk. ksilolden geçirildikten sonra 2x2 dk. 99°, 1dk. 96° alkollerde rehidre edildi. Ardından dokular distile su içerisinde yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitlere nemli ortamda 10 dakika süre ile %3'lük H₂O₂ uygulandı. Daha sonra dokular 2 defa 5 dakika boyunca PBS) ile yıkandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarma işlemi için 3x5 dk. 500 watt'da sitratlı tampon çözeltisi (10mM sitrik asit, %0.05 Tween 20, pH6) uygulandı. Bu aşamadan sonra kesitler sitratlı tampon çözeltisi içerisinde oda ısısına gelene kadar bekletildi. Ardında dokular 2 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Sonrasında protein bloklama solüsyonu dokuların üzerini kapatacak şekilde eklendi ve 5 dakika süreyle oda ısısından inkube edildi. Protein bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi yapılmaksızın lamaların üstüne uygun oranda antikor dilüsyon buffer (Dako S0809, Carpinteria CA, ABD) ile 1/50 (1/50, 1/100 ve 1/500 ön denemeleri yapılmıştır) oranında sulandırılmış primer antikor (*Cryptosporidium parvum* antibody, BDI370, mouse monoclonal IgG1, Santa Cruz Biotechnology, Katolog no: sc-57693) konularak dokular 37°C de 45 dakika inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonu takiben primer antikor uzaklaştırılarak 2 defa 5'er dakika süreyle PBS ile yıkandı. Daha sonrası kesitler biotinlenmiş sekonder antikor ile oda ısısında 10 dakika muamele edildi. Tekrar PBS ile 2 defa 5'er dakika süreyle yıkanan kesitler, streptavidin- peroksidaz ile oda ısısında 10 dakika inkubasyona bırakıldı. PBS ile yıkamanın ardından kesitler 3,3-diaminobenzidine (DAB) ile muamele edildi. Son olarak, çeşme suyu ile yıkanan

keistler Mayer's hematoxylin ile 45 saniye boyandı. Sırasıyla 96° (1 dakika), absolut alkol serisi (2 dakika) ve ksilolden (2 kez 5'er dakika) geçirildi. Kesitler lamel ile kapatıldı ve tüm kesitler ışık mikroskobunda (DP72 kameralı Olympus BX51, Tokyo, JAPONYA) sırasıyla 4X, 10X ve 40X büyütme ile incelendi. Uygun görülenlerden mikroskopik fotoğraflar çekildi.

3.6. İmmunfloresan İncelemeler

İmmunohistokimyasal boyamalarda uygulanan prosedürün primer antikor ile inkubasyon kısmına kadar olan bölümü İmmunfloresans boyamalarda da aynı şekilde uygulandı. Bu aşamadan sonra primer antikor uzaklaştırılarak PBS (2 defa 5'er dakika) ile yıkandı. Daha sonra dokular 37°C de 45 dakika boyunca 1/20 oranında sulandırılmış Goat anti Mouse Ig FITC (Biox, Katalog No. BIO156) ile inkubasyona bırakıldı. Tekrar PBS ile yıkanan (5 dakika) kesitlerin üzerine gliserin damlatılıp, lamel ile kapatıldı ve floresans mikroskopta (Carl Zeiss axioskop A1, Colibri 2 led fluorescence) incelendi. Uygun görülenlerden mikroskopik fotoğraflar çekildi.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Aylara Göre Dağılımı

Çalışma süresi içerisinde 0-30 günlük ve ishal şikayeti bulunan 145 kuzudan örnek alınmıştır. Dönem içerisinde Aralık, Ocak, Şubat, Mart ve Nisan aylarında materyal temini yapılmış olup, Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim ve Kasım aylarında yaş grubu dahilinde örnek temini yapılmamıştır. Elde edilen örneklerin aylara göre dağılımı ve pozitif örnek sayıları Tablo 4.1’de sunulmuştur.

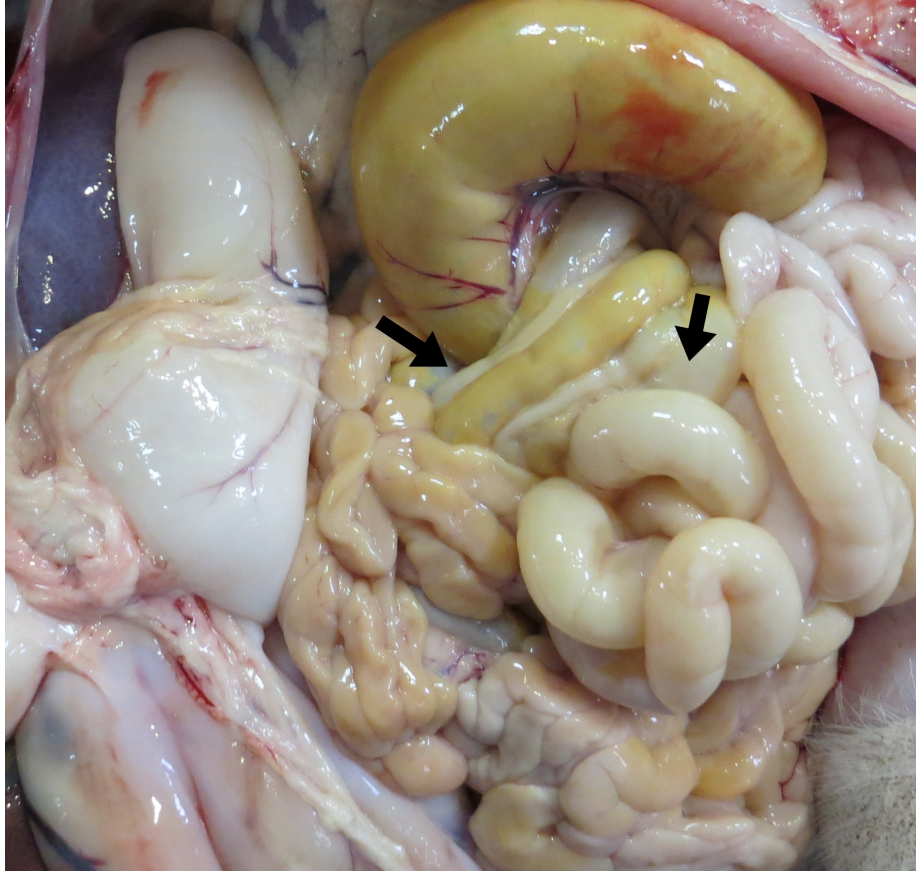
Tablo 4.1. Örneklerin aylara göre dağılımı ve *C. parvum* pozitif örnek sayıları

Aylar (2013-2014)	Örnek alınan kuzu sayısı	<i>C. parvum</i> pozitif örnek sayısı (n=20)	<i>C. parvum</i> pozitiflik oranı % (n=145)
Aralık	8	2	1,38
Ocak	20	2	1,38
Şubat	56	8	5,52
Mart	48	4	2,76
Nisan	13	4	2,76
TOPLAM	145	20	13,8

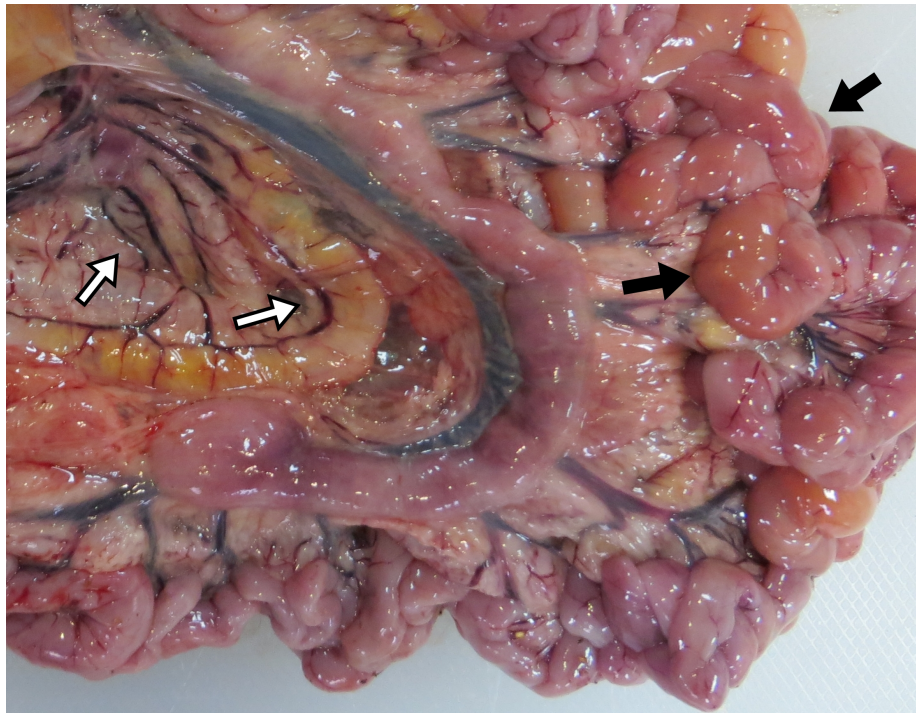
4.2. Makroskopik Bulgular

Çalışma süresi içerisinde nekropsileri yapılan kuzularda dış bakıda soluk-sarı renkli veya daha açık renkte ishal, değişen düzeyde dehidrasyon ve kaşeksi bulguları gözlemlendi. İç bakıda ise karın boşluğunda sıvı, bağırsak serozalarında ve mezenteryumda ödem ve hiperemi (**Şekil 4.1**) görüldü. Bağırsakların bazı olgularda sarımsı-beyaz (**Şekil 4.2**) bazen de daha koyu bir içerik (**Şekil 4.3**) dolu olduğu dikkati çekti. Mezenterik lenf düğümlerinde büyüme (**Şekil 4.3**), bağırsak mukozal yüzeyinde hiperemi ve genelde müköz eksudatla kaplı olduğu tespit edildi.

İshal şikayetli, 0-30 günlük 125 ve ishal ile birlikte *Cryptosporidium parvum* tespit edilen 20 kuzuda görülen makroskopik bulguların görülme oranları Tablo 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Karın boşluğu ve bağırsak serozalarında hafif ödem. Beyaz-sarımsı içerikle dolu ince bağırsaklar (oklar).



Şekil 4.2. Mezenteriyumda hiperemik damarlar (beyaz oklar), serozada ödem, hiperemi ve sulu içerikle dolu ince bağırsaklar (siyah oklar).



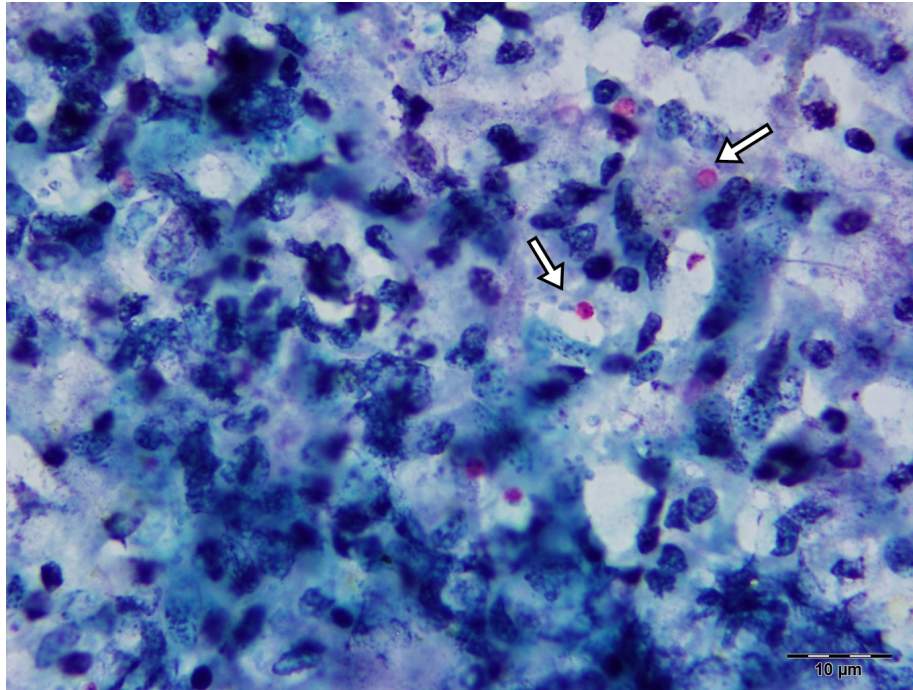
Şekil 4.3. Mezenterik lenf düğümlerinde büyüme (ok).

Tablo 4.2. *C. parvum* tespit edilen ve edilmeyen kuzularda görülen makroskobik bulgular ve oranları

Makroskobik bulgu	<i>C. parvum</i> 'lu kuzularda (n=20)		Diğer ishalleri kuzularda (n=125)	
	Görülme sayısı	%	Görülme sayısı	%
ishal	20	100	125	100
dehidrasyon	20	100	76	60,8
kaşeksi	11	55	51	40,8
karın boşluğunda sıvı	2	10	3	2,4
mezenteriyum ve serozada ödem	6	30	21	16,8
seroza yüzeylerinde kanama	1	5	7	5,6
mezenterik lenf düğümlerinde büyüme	12	60	110	88
bağırsak mukozal yüzeyde hiperemi	7	35	73	58,4
mukoza yüzeyinde kanama	1	5	13	10,4
mukoza yüzeyinde mukus	13	65	54	43,2
mukoza yüzeyinde irin	0	0	1	0,8
mukoza yüzeyinde fibrin	0	0	0	0

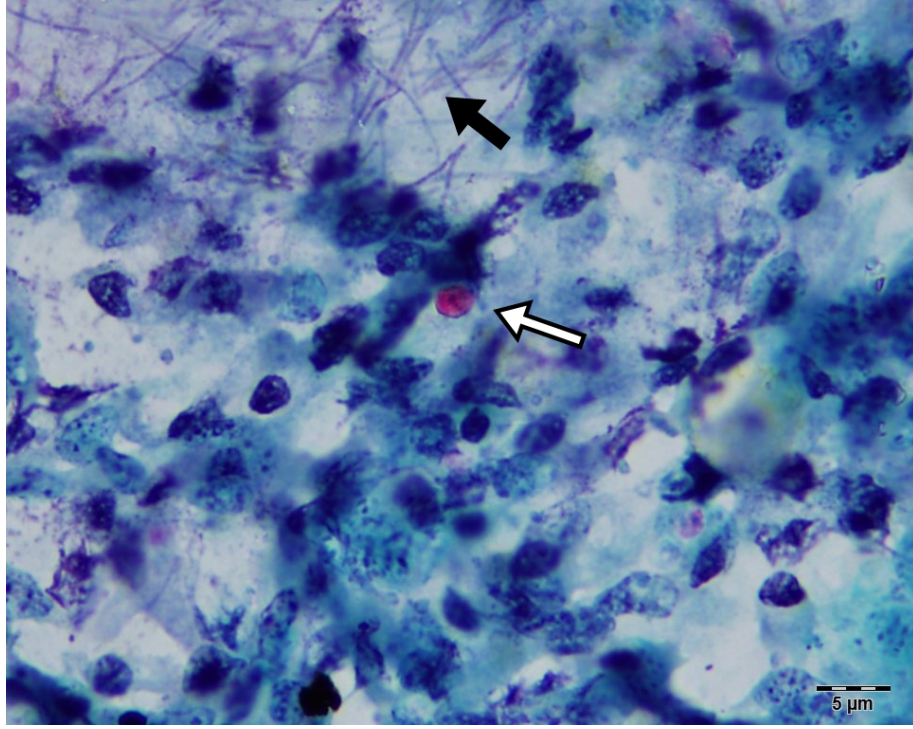
4.4. MZN Boyama Sonuçları

Çalışmada agoni halde olup nekropsileri yapılan ve ince bağırsaklardan taze olarak hazırlanan 60 örneğin MZN boyamalarında, 8 örnekte (%13.3) etken gözlenmiştir. Koyu pembe- açık kırmızı tonlarda boyanan etkenler yuvarlak yapılı, 3-4 mikron çapında ve kümelenme özelliği göstermeden, dağınık olarak yayılmışlardı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Bağırsak epiteli ve yangı hücreleri arasında dağılmış *C. parvum* ookistleri (oklar). İnce bağırsak smearı. MZN boyama.

Arka planın açık-koyu mavi tonlarda boyandığı smear örneklerinde, mikroskop alanında *C. parvum* ookistleri ile birlikte epitel hücreleri, yangı hücreleri ve çoğu zaman bakteriyel yapılar da dikkati çekti (Şekil 4.5). Epitel hücre çekirdekleri daha poligonal ve soluk boyanmışken, lenfositik hücreler yuvarlak ve daha koyu boyanmış olarak dikkati çekti. Smear örnekleri genel olarak eritrositlerden fakirdi.



Şekil 4.5. *C. parvum* ookisti (beyaz ok) ve bakteri kümeleri (siyah ok). İnce bağırsak smearı. MZN boyama.

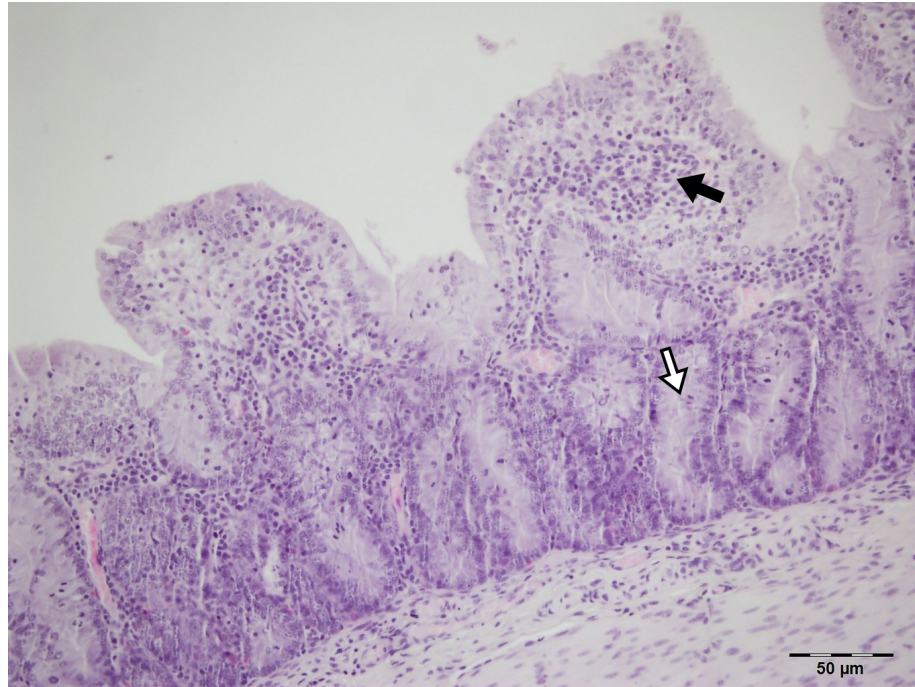
4.3. Histopatolojik Bulgular

Hastalıktan etkilenmiş hayvanların bağırsak kesitlerinin histopatolojik incelemelerinde; villuslarda kütleşme (Şekil 4.6 ve 4.7), epitel dejenerasyonu ve deskuomasyonu, propriada eozinofil granülosit (Şekil 4.8) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 4.9), kript epitelinde mitoz artışı (Şekil 4.10 ve 4.11), lenfatik kanallarda genişleme (Şekil 4.12), lenfoid dokuda azalma (Şekil 4.10) ve intraepitelyal lenfositler (Şekil 4.13) gözlemlendi. Etkilenmiş bağırsak kesitlerinde, parazite ait yapıların epitel yüzeyi boyunca ve bazen kriptlerde dağılım gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.14). Az sayıda örnekte ise başka bir protozoon enfeksiyonu olan koksidiozis etkenleri *Cryptosporidium parvum* ile birlikte ya da bağımsız olarak dikkati çekti.

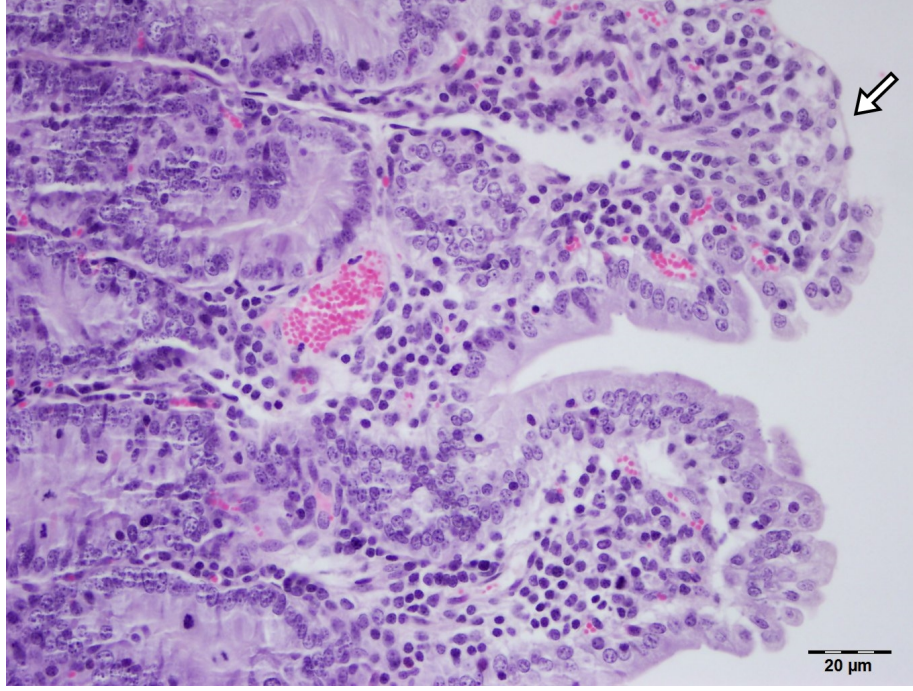
Histopatolojik bulgular ve yaygınlığının değerlendirilmesi tablo 4.3'de sunulmuştur.

Tablo 4.3. *Cryptosporidium parvum* tespit edilen ve edilmeyen kuzularda görülen histopatolojik bulgular ve oranları

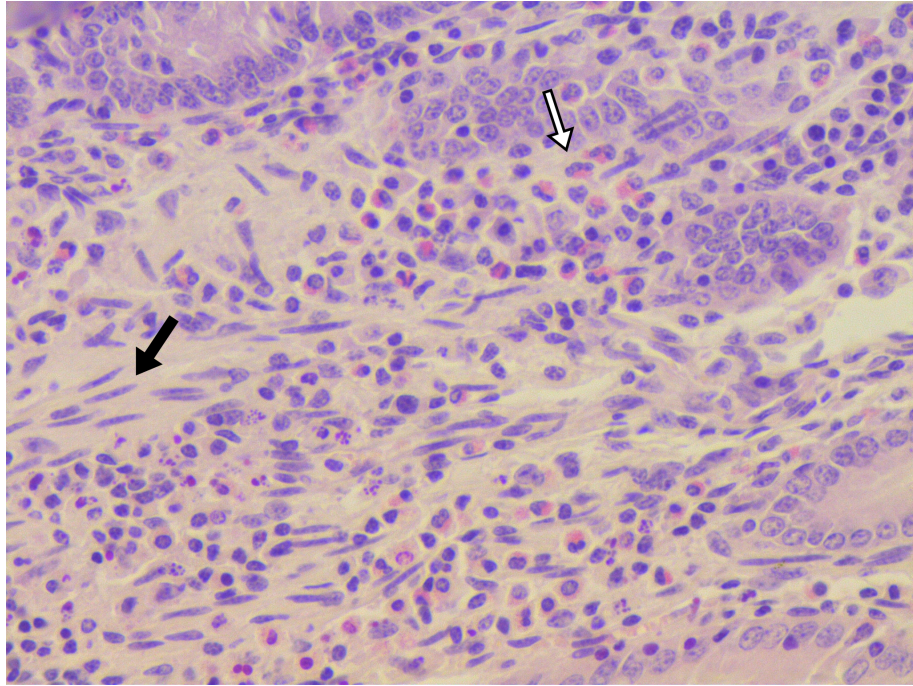
Histopatolojik değişiklik	<i>Cryptosporidium parvum</i> 'lu kuzularda (n=20)		Tüm ishalleri kuzularda (n=125)	
	Görülme sayısı	%	Görülme sayısı	%
Villuslarda atrofi	12	60	56	44,8
Deskuamasyon	15	75	84	43,2
Epitel nekrozu	17	85	39	31,2
Propriyada hiperemi	14	70	106	84,8
Propriyada nötrofil granülosit	3	15	21	16,8
Propriyada eozinofil granülosit	10	50	27	21,6
Propriyada mononükleer hücre	18	90	88	70,4
Lenfoid dokuda azalma	2	10	29	23,2
İntraepitelyal lenfosit artışı	14	70	67	46,2
Kript epitelinde mitoz	13	65	71	56,8
Kilus kanalında genişleme	6	30	11	8,8
Propriyada kanama	1	5	4	3,2
Eimeria sp.	3	15	11	8,8



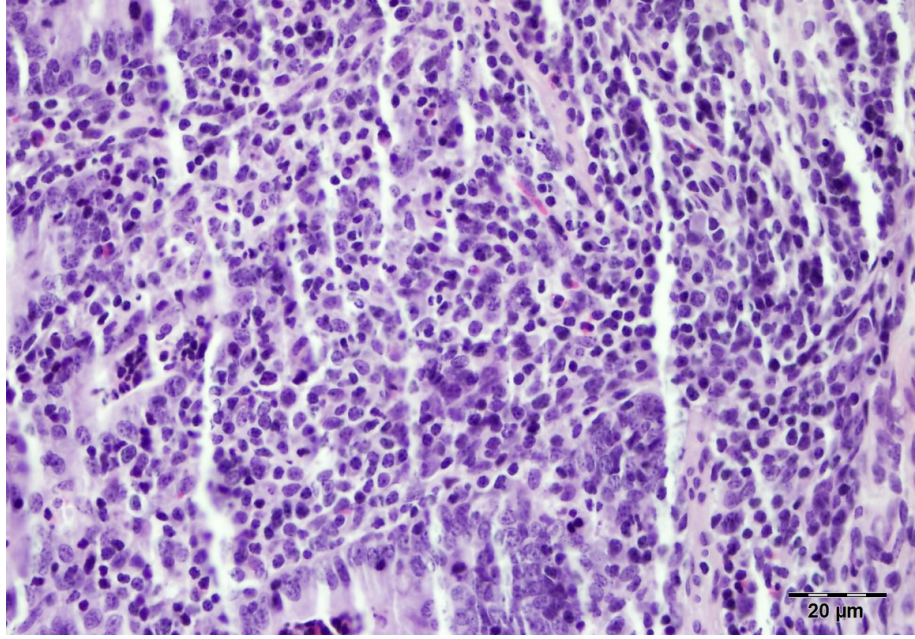
Şekil 4.6. Kütleleşmiş atrofik villuslar, propriyada yangısal hücre infiltrasyonu (siyah ok) ve kript epitelinde mitoz (beyaz ok). HE boyama.



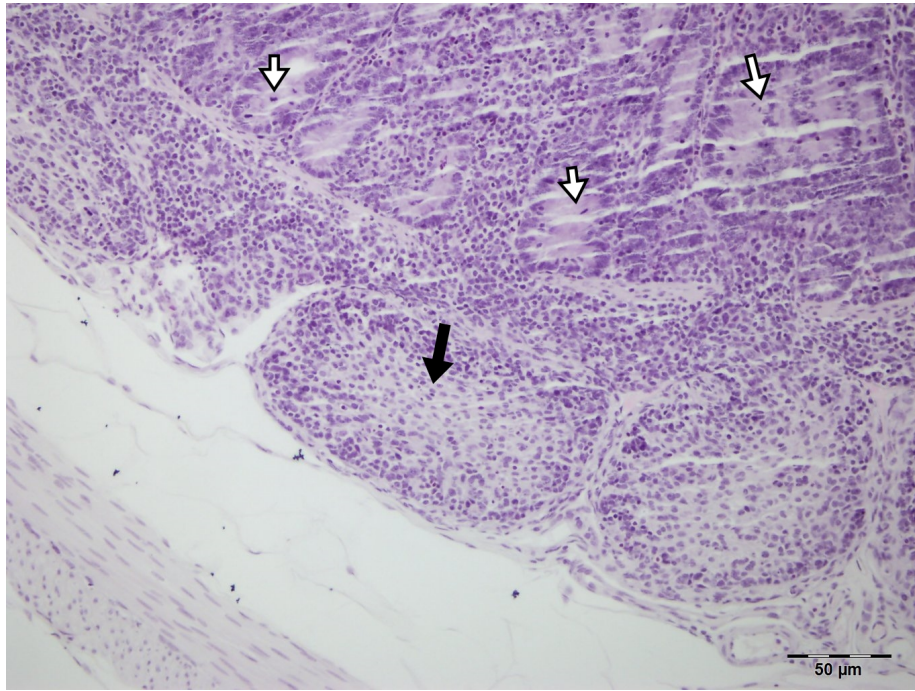
Şekil 4.7. Atrofik villuslar ve epitel kaybı (beyaz ok) propriyada yangısal hücre infiltrasyonu ve hiperemi. HE boyama.



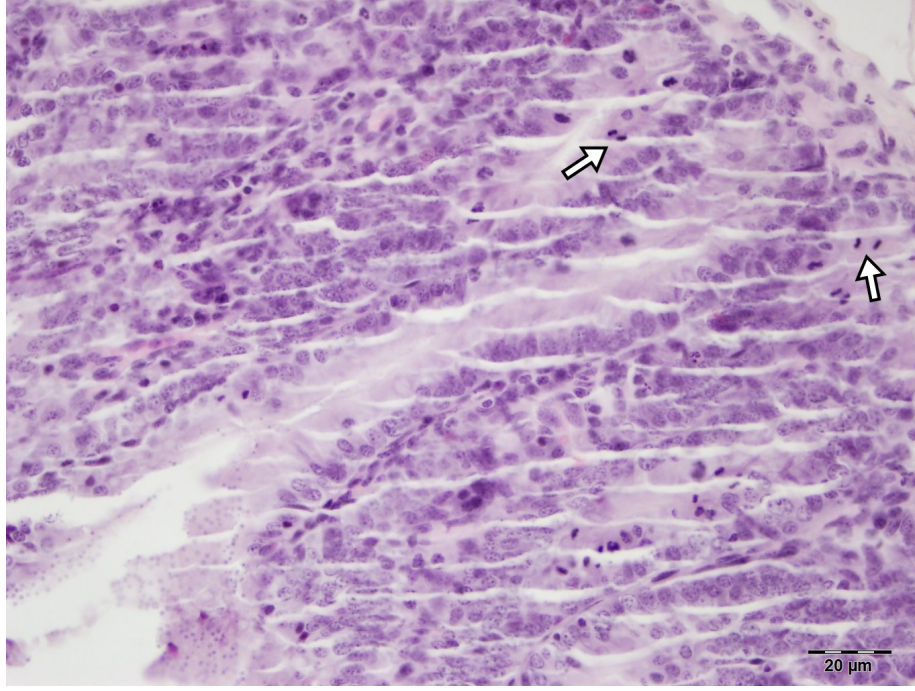
Şekil 4.8. Proriyada eozinofil granulositler (beyaz ok) ve fibröz proliferasyon (siyah ok). HE boyama.



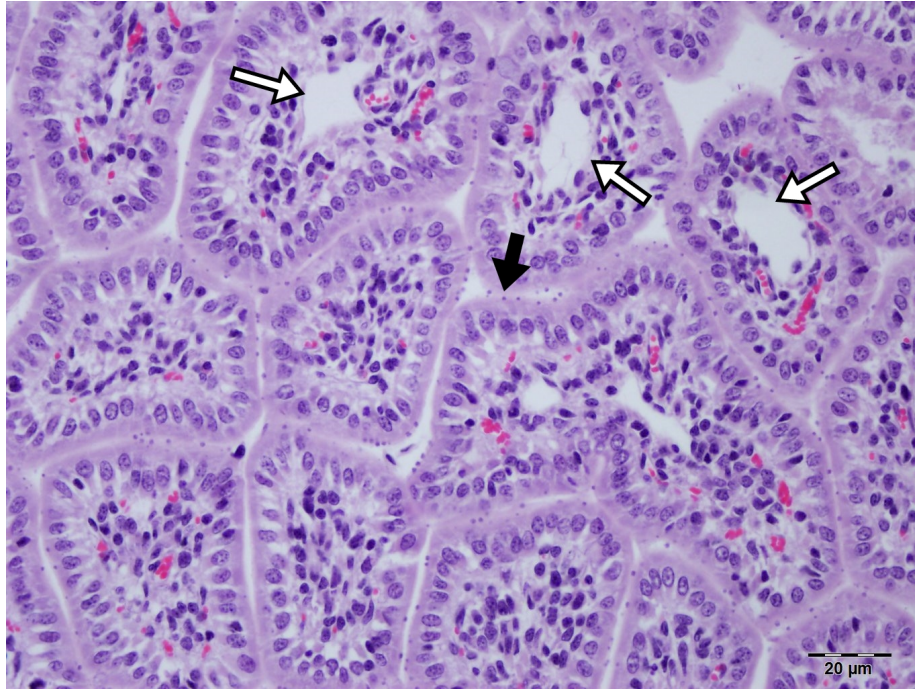
Şekil 4.9. Propriyada yağışal hücre infiltrasyonu. HE boyama.



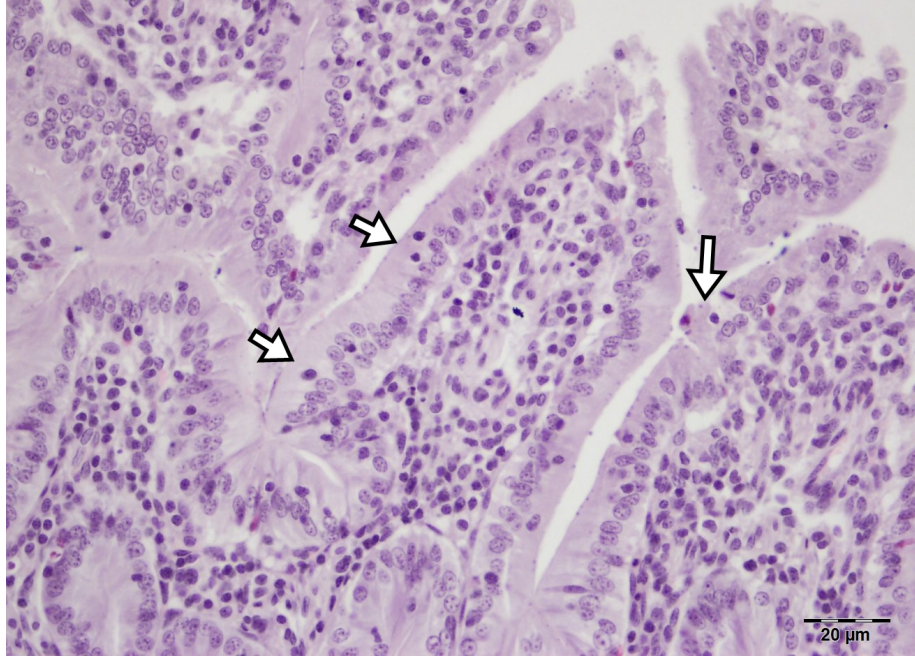
Şekil 4.10. Lenfoid dokuda (peyer plakları) azalma (siyah ok) ve kript epitelinde mitoz (beyaz oklar). HE boyama.



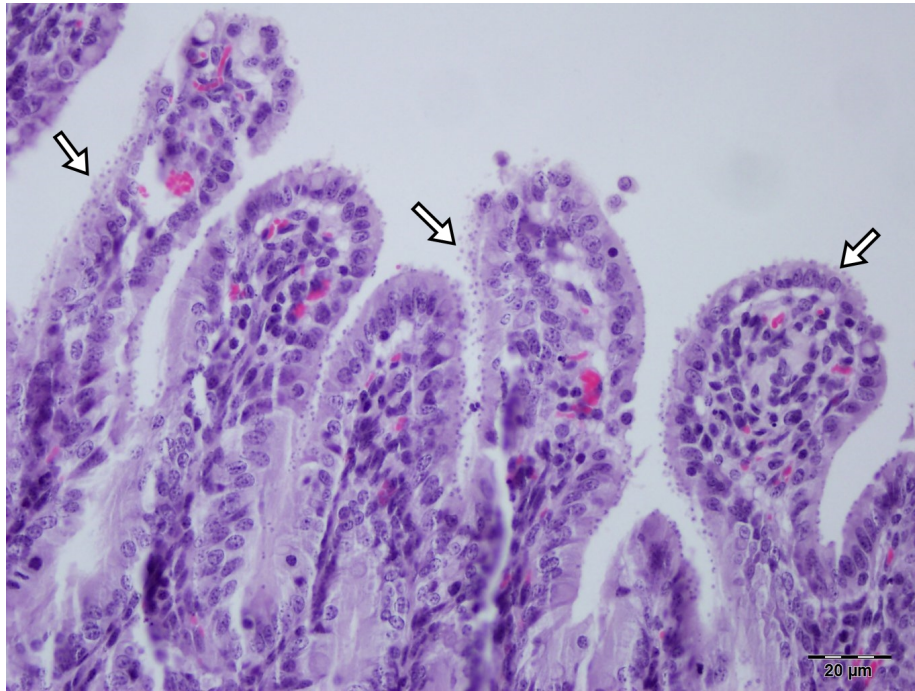
Şekil 4.11. Kript epitelinde mitoz, yakın görünüm (beyaz oklar). HE boyama.



Şekil 4.12. Lenf kanallarında genişleme (beyaz oklar) ve epitel boyunca yerleşmiş *C. Parvum*'un gelişim evreleri (oklar). HE boyama.



Şekil 4.13. İntraepitelyal lenfositler (oklar). HE boyama.



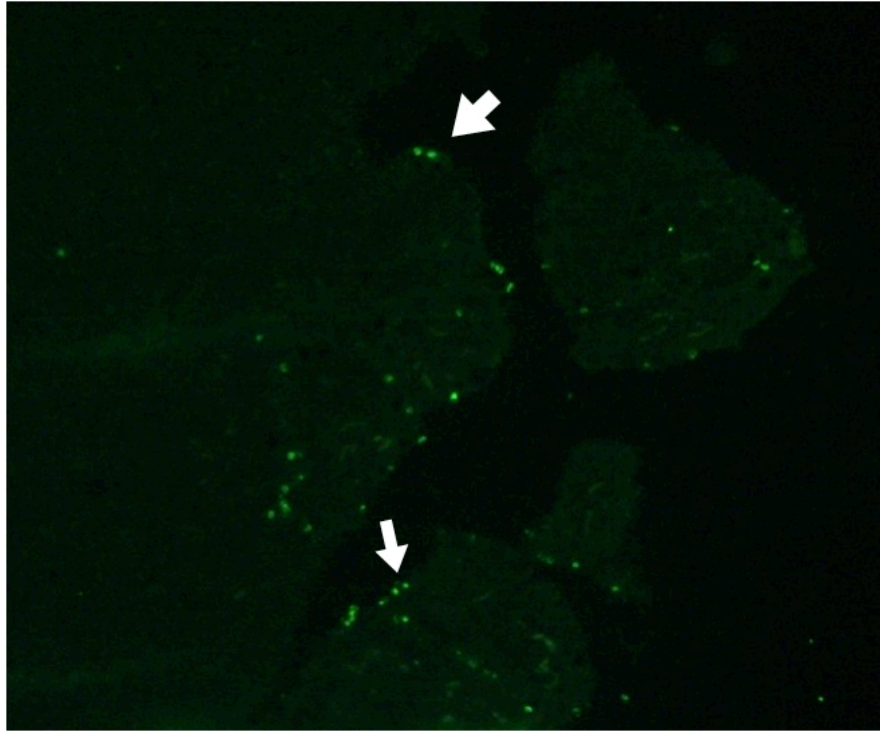
Şekil 4.14. Villusların epitel yüzeyleri boyunca *C. Parvum*'un gelişim evreleri (oklar). HE boyama.

4.4. İmmunfloresan Boyama Sonuçları

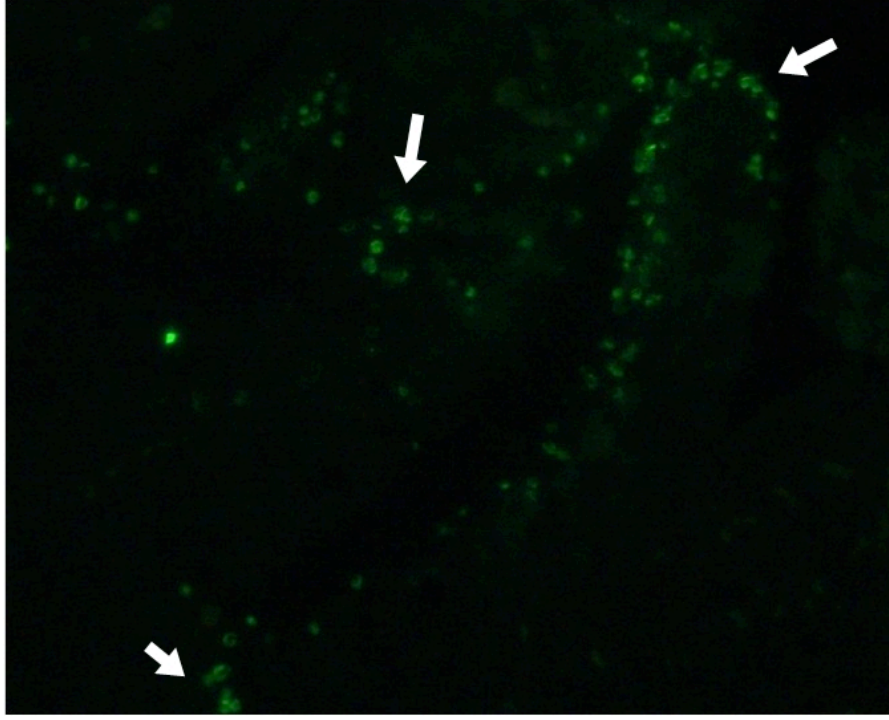
Kesitlerin İmmunfloresan incelemelerinde 20 örnekte (%13.8) pozitif reaksiyon elde edildi (Şekil 4.15). Pozitif boyanmalar zaman zaman tipik olarak zincir şeklinde sıralanma göstermekteydi (Şekil 4.16).

4.5. İmmunohistokimya Boyama Sonuçları

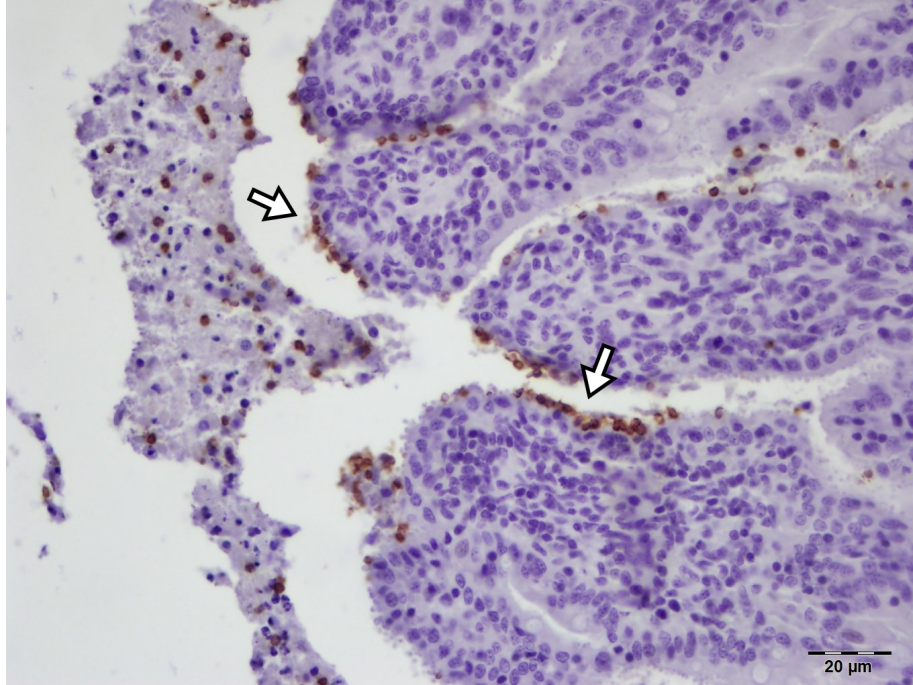
İmmunohistokimyasal boyamalarda da immunfloresan boyamalarda olduğu gibi 20 örnekte (%13.8) pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.17). Pozitif reaksiyon veren antijenik lokalizasyonların bağırsak villuslarının epitel yüzeyi boyunca dizildiği dikkati çekti (Şekil 4.18). Benzer boyanmalar eksudat içerisinde ve az da olsa kriptlerde lokalize olduğu dikkati çekti.



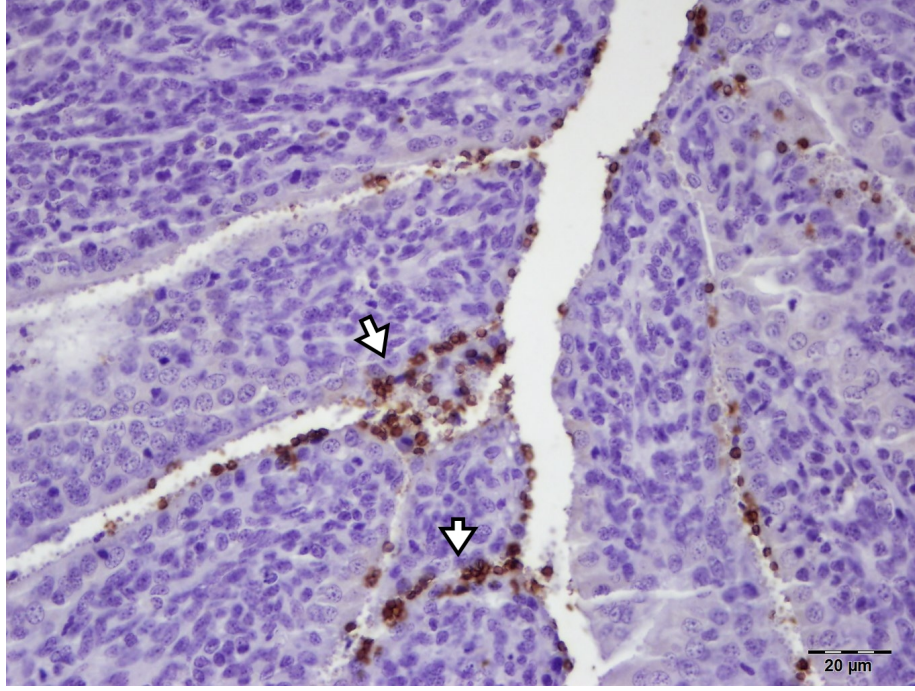
Şekil 4.15. Parafin kesitlerde pozitif reaksiyon. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, Goat anti Mouse Ig FITC.



Şekil 4.16. Farklı bir örneğe ait parafin kesitlerde pozitif reaksiyon. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, Goat anti Mouse Ig FITC.



Şekil 4.17. Parafin kesitlerde epitel yüzeyi boyunca ve eksudatta antijen pozitif reaksiyon. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, streptavidin- peroksidaz, DAB kromojen. Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama.



Şekil 4.18. Başka bir örneğe ait parafin kesitte epitel yüzeyi boyunca antijen pozitif reaksiyon. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, streptavidin- peroksidaz, DAB kromojen. Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama.

5. TARTIŞMA

Neonatal dönem olarak tanımlanan 0-28. günlerde ortaya çıkan ishalli hastalıklar kuzu kayıplarının en önemli sebeplerinden birisidir.^{1,2} Yeterli koruma tedbirleri alınmamış işletmelerde altlık, ahır, mera ve birlikte barındırılan diğer yaşlı hayvanlarda bulunan ishal etkenleri ile karşı karşıya kalınması, kolostrum veya pasif bağışıklıkla kazanılması gereken immunoglobulin yetersizlikleri, annedeki latent enfeksiyonlar, bakım-besleme koşullarının uygunsuzluğu, doğum zamanı, doğum ağırlığı ve parite neonatal dönem hastalıklarının oluşmasında hazırlayıcı rol oynayan önemli etmenler olarak bildirilmektedir.¹⁰⁻¹²

Türkiye’de neonatal kuzu problemleri üzerine yapılan bir araştırmada total morbidite oranı % 48.6 olarak belirlenirken, bunların içerisinde ishal olguları % 15.4 ile en başta yer aldığı bildirilmiştir.¹⁰

Neonatal dönem kuzu ve oğlak ishallerinin en önemli enfeksiyöz sebepleri olarak; rotavirus ve coronaviruslar, enteropatojenik ve toksijenik *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Cl. perfringens* tip B (kuzu dizanterisi), *Salmonella* sp. ve *Listeria monocytogenes* görülmektedir.^{2,11}

Neonatal ishalin 4-5 günlükten küçük buzağılarda görülmesi, Enterotoksijenik *E. coli* enfeksiyonlarını, 5-15 günlüklerdeki ishallerde ise; rotavirus, coronavirus ve *C. parvum* ya da kombine enfeksiyonlar göz önünde bulundurulmalıdır.²⁸

Neonatal dönem olarak kabul edilen 0-28. günler arasında ishalli kuzularda yapılan çalışmalarda önemli sonuçlar ortaya konulmuştur. Gökçe ve ark.² tarafından neonatal dönem ishalli kuzuların dışkı örneklerinde yapılan ELISA çalışmasında; *E. coli* F5 %10.5, *E. coli* O157 %10.9, *C. parvum* %21.05, rotavirus %5.3, coronavirus %21.4 oranında belirlenmiştir. Türkiye dışında yine kuzularda yapılan başka bir çalışmada da *C. parvum* %45, *E. coli* %48, rotavirus %8.1, *Cl. perfringens* %10.8 olarak

belirlenmiştir.³⁸ Literatür bilgileri doğrultusunda, *C. parvum* enfeksiyonunun neonatal dönem kuzularda önemli bir ishal etkeni olduğu görülmektedir.

Dünya üzerinde koyunlarda Cryptosporidiosis ilk olarak 1974 yılında Avustralya'da 1-3 aylık kuzularda rapor edilmiştir.³⁹ Cryptosporidiosis hastalığının prevalans veya insidensi; Norveç'te %15.4, İngiltere'de %36-50, İspanya'da %30.7-45, Belçika'da %13.1, Polonya'da %10.1, İtalya'da %17.44, Kanada'da %24, Amerika Birleşik Devletleri'nde %77.4-85, Brezilya'da %1.6, Meksika'da %34.3, Çin'de %4.85, Avustralya'da %18.5-24.5, Tunus'da %11.2 Mısır'da %68.3 ve İran'da %4 olarak bildirilmiştir.³⁰

Türkiye'de kuzularda Cryptosporidiosis üzerine yapılan ilk araştırma Özer ve ark²¹ tarafından gerçekleştirilmiş ve incelenen 267 ishalleri kuzunun 32'sinde (%12) Cryptosporidium oocistleri tespit edilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise hastalık; İzmir yöresinde %23.3²³, Aydın yöresinde %46.5²², Konya merkez ve köylerinde yapılan bir çalışmada MZN yöntemiyle %2.97, ELISA tekniği ile %9.13 oranında pozitiflik tespit edilmiştir.⁶ Bu verilere ilave olarak Cryptosporidiosis, Van yöresinde %13.63²⁵, Kars yöresinde ise iki farklı çalışmada sırasıyla %21.05 ve %38.8 oranlarında rapor edilmiştir.^{2,26}

Çoğunluğu parazitolojik olmak üzere yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçlarına göre, Türkiye'de ishalleri kuzularda Cryptosporidiosis oranının, %2.97 ile %46.5 arasında değiştiği dikkati çekmektedir. Araştırma sonuçlarının farklılık göstermesinde çalışma metodlarının farklılığı, örnekleme şekillerinin (hayvanların yaş durumları, salgın) sonuçlar üzerine etkili olduğu söylenebilir.

Sunulan çalışmamızda mevsimsel etkilenmeler de dikkate alınarak Haziran 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında 1 yıl süre ile 129 farklı işletmeden ishal şikayeti ile ölmüş veya agoni haldeki 0-30 günlük 145 adet kuzudan alınmış bağırsak örnekleri

incelenmiştir. Çalışma sonunda şüpheli bağırsak kesitlerinin immunfloresan ve immunohistokimyasal boyamalarında %13.8 oranında antijen varlığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda örnek toplama işleminin belirli bir peryoda yayılması, farklı sürülerden toplanması ve doku düzeyinde teşhisinin yapılması sebebiyle sonuçlarımız değerli olduğunu düşünülmüştür.

Çalışmada örnek toplama bakımından 12 aylık periyod dikkate alınmış, ancak Aralık-Nisan ayları arasında uygun örnekler toplanabilmiştir. Haziran-Kasım ayları arasında ise yaş grubuna uygun (0-30 günlük) hayvan bulunmadığından ishal sebebiyle ölümler Aralık-Nisan aylarında kendini göstermiş, dolayısıyla *C. parvum* enfeksiyonunun da bu dönem içerisinde etkili olduğu dikkati çekmiştir. Aylar değerlendirildiğinde ise sırasıyla Şubat, Mart ve Nisan aylarında hastalık daha fazla görülmüştür. Bu durum bölgede kuzulama dönemi ve neonatal dönemin bu aylara karşılık gelmesi ile açıklanabilir.

Yapılan çalışmalarda enfeksiyon prevalansının hastalanma yaşı ile yakın ilişkili olduğu ortaya konmuş, hastalıktan etkilenme yaşının kuzularda en çok 1-21. günler olduğu 30. günden sonra azaldığı bildirilmiştir.^{14,40} Naciri ve ark. tarafından buzağılarda yapılan bir çalışmada, süt emen erken dönem buzağılarda enfeksiyon daha yüksek oranda tespit edilmiştir.⁴¹ Sevinç ve ark. tarafından yine buzağılarda yapılan ayrı bir çalışmada, hastalığın görülme oranı yaş grubu olarak 1-10 günlüklerde %50.75; 10-20 günlüklerde %35.71; 20-30 günlüklerde %25.45; 30-45 günlüklerde %14.71 ve 45 günden büyüklerde ise %13.24 oranında bildirilmiştir.⁴³

Neonatal dönem kuzuları için enfeksiyon kaynağı olarak hastalık belirtisi göstermeyen daha büyük kuzular ve erişkin koyunların önemine vurgu yapılmaktadır.^{14,42} Sunulan çalışmamızda 0-30 günlük ishallerli kuzularda %13.8 oranında enfeksiyon tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *C. parvum* tespit edilen kuzuların dış bakılarında soluk-sarı renkli ishal, dehidrasyon ve kaşeksi önemli oranda dikkati çekmiştir. Ulutaş ve ark. Cryptosporidiosis enfeksiyonlu bir sürüde yaptıkları çalışmada *Cryptosporidium spp.* ookistlerini ishalli kuzularda %79.1, ishalsiz kuzulara ise %18.2 oranında rapor etmişlerdir.²² Benzer olarak Casuape ve ark.'da hastalığın %79.4 oranında ishal ile birlikte seyrettiğini bildirmişlerdir.⁴⁰ Benzer olarak Sevinç ve ark. buzağılarda yaptıkları ayrı bir çalışmada, ishalli buzağılarda %63.92; ishalsiz buzağılarda ise %9.85 oranında Cryptosporidiosis bildirilmiştir.⁴³ Sunulan çalışmamızda bu veriler dikkate alınarak ishalli kuzulardan örnek toplanmış ve 145 örneğin 20'sinde, %13.8 oranında *C. parvum* antijeni tespit edilmiştir.

Cryptosporidiosisde villus atrofisi ile birlikte gelişen absorpsiyon bozukluğu ishalin temel sebebi olarak gösterilmektedir. Absorptif hücre yüzeyleri büyük oranda *Cryptosporidium* etkenleri tarafından işgal edilmiştir. Mukoza yüzeyinde olgunlaşmamış epitel hücre popülasyonunda artış vardır. Başta prostoglandinler olmak üzere yangısal mediatörlerin salgılanması mukozal sekresyonu ve epitel hücrelerinin permeabilitesini artırır.¹⁶

Bağırsakların makroskopik muayeneleri dikkate alındığında, *C. parvum* antijeni tespit edilen vakalarımızda önceki raporlara uyumlu olarak mezenterik lenf düğümlerinde büyüme, bağırsak mukozasında ödem ve kataral eksudat önemli oranda tespit edilmiştir.^{1,11,44}

Araştırmamızda histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde, bağırsak değişikliklerin özellikle epitel katında dejenerasyon, nekroz, dökülme ve villus atrofisi ile propria kısmında mononükleer hücre ve eozinofil granülosit infiltrasyonları dikkati çekmiştir. Bu bulgulara ilave olarak hiperemi, lenf kanalarında genişleme ve bazı olgularda lenfoid doku kayıpları ve intraepitelyal lenfosit ile karakterize olduğu

gözlenmiştir. *Cryptosporidium* etkenleri ise farklı gelişim evrelerinde, tipik olarak enfekte hücrelerin mikrovillus kenarlarında dikkati çekmiştir. Mikroskopik bulgular önceki araştırma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.^{16,28,45,46}

Histopatolojik değişikliklerin daha çok epitel bölgesinde olmasının sebebi etkenin biyolojisi ile ilişkilendirilebilir. Brown ve ark. *Cryptosporidium*ların merogoni, gametogoni ve sporogoni dönemleri enfekte epitel hücrelerinin fırçamsı kenarlarında yerleştiğini bildirmiştir.¹⁶ Ayrıca neonatal dönem içerisinde *C. parvum*, *E. coli*, rotavirus ve coronavirus gibi etkenler tek başlarına enfeksiyon oluşturdıkları gibi genelde miks enfeksiyon şeklinde ortaya çıkmaktadır.^{1,11} Enfeksiyonun durumu, bireysel direnç, immunité gibi diğer faktörler de göz önüne alındığında histopatolojik bulguların morfolojik karakteri ve şiddetinin de vakadan vakaya değişkenlik gösterebileceği söylenebilir. Araştırmamızda *C. parvum* dışında diğer enfeksiyon etkenleri belirlenmediğinden makroskopik ve histopatolojik bulguların ne düzeyde *C. parvum* enfeksiyonu ile ilişkili olduğu hakkında bir fikir yürütmek zor olacaktır. Tüm bunların yanında araştırmamızda *C. parvum* tespit edilen bağırsak kesitlerinde histopatolojik olarak villus atrofisi, epitel dejenerasyonu, eozinofil granulosit infiltrasyonu, intraepitelyal lenfosit artışı, kript epitelinde mitoz ve lenfatiklerde genişleme öne çıkan bulgular olarak dikkati çekmiştir.

Cryptosporidiosis tanısı için en güvenilir yöntem dışkı örneğinde ookistlerin görülmesi veya antijenlerinin belirlenmesi olarak bildirilmiştir.⁴⁷ Ookist tespiti için dışkı örneklerinin Ziehl-Neelsen yanında Auramine boyamalarının da oldukça etkili hatta daha pratik olduğu Kuhurana ve ark. tarafından rapor edilmiştir.⁴⁸

Sevinç ve ark tarafından yapılan bir araştırmada, aynı dışkı örneklerinde MZN yöntemiyle %2.97, ELISA tekniği ile %9.13 oranında pozitiflik tespit edilmiştir.⁶ Bu sonuç doğrultusunda dışkı örneklerinden MZN yöntemi ile hastalık teşhisinin yetersiz

kaldığı düşünülebilir. Bu hipotezi destekleyici olarak, klinik gözlemlerde asemptomatik olan bazı hayvanlarda, ookist saçılımının da yetersiz olduğu durumlarda ookist tespitinin zor olduğu belirtilmiştir.⁴⁷

Çalışmamızda dışkı örneğinden farklı olarak, smearlar doğrudan bağırsak mukoza kazıntılarından hazırlanmıştır. Bu yolla hazırlanan 60 smear örneğinin MZN boyamalarında %13.3 oranında etken tespit edilmiş olup doku kesitlerinden immunohistokimyasal ve immunfloresan sonuçlarına yakın oranda bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, özellikle nekropsi sırasında taze hazırlanacak bağırsak kazıntı smearlarının MZN boyamalarının, hastalığın teşhisinde etkili olacağı söylenebilir.

Bağırsak kazıntı smearlarının MZN boyamalarının ışık mikroskopik incelemelerinde, etkenler kırmızı renkte, morfolojik olarak oval-yuvarlak şekilli ve 3-4 µm çapında olup, kümelenme göstermeden dağınık yayıldıkları görüldü. Aynı preparat alanında, epitel hücreleri, bakteriyel flora ve yangı hücreleri de hastalık etkenleri ile birlikte dikkati çekti. Epitel hücre çekirdekleri daha poligonal ve soluk boyanmışken, lenfositik hücreler daha yuvarlak ve koyu boyanmış olarak dikkati çekti. Smearlardaki lenfositik ve diğer yangısal hücrelerin yoğunluğu da, enfeksiyon tablosunun önemli bir göstergesi olarak değerlendirildi. Smear örnekleri genel olarak eritrositlerden fakirdi. Yapılan literatür araştırmasında bağırsak smearlarından yapılmış benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Literatür taramalarında *C. parvum* antijenlerinin immunfloresan yöntemi ile teşhisine yönelik çalışmaların genelde dışkı örneklerinden,⁴⁹⁻⁵² daha az olarak da parafin kesitlerden⁴⁶ yapıldığı görülmektedir. Çalışmamızda da parafin kesitlerinden yapılan immunfloresan boyamalarla %13.8 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Sferik yapılı

ookistler enfekte hücre yüzeyleri boyunca tespit edilmiş ve bu bulgular Bejan ve ark. ile uyumlu bulunmuştur.⁴⁶

Araştırmamızda doku kesitlerinin immunohistokimyasal boyamalarında da immunfloresan boyamalarla uyumlu olarak %13.8 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Pozitif reaksiyon veren antijenik lokalizasyonların epitel boyunca dizildiği dikkati çekmiş ve Loose ve ark.'nın bulguları ile uyumlu bulunmuştur.⁵³

İmmunohistokimya ve immunfloresan boyamalarda kullanılan primer antikorun 1/50 sulandırmasında daha etkili sonuçlar alınmıştır.

Cryptosporidiosis, özellikle ruminantların neonatal dönemlerinde etkisini gösteren ve aynı zamanda zoonoz özelliği olan önemli bir enfeksiyondur.³⁻⁵ Sunulan çalışmada Konya ve çevresinde ishal sebebiyle ölmüş 0-30 günlük kuzularda Cryptosporidiosis oranı %13.8 olarak belirlenmiştir. Bağırsak smearlarının MZN boyamaları ile birlikte immunohistokimya ve immunfloresan boyamaların benzer sonuçlar verdiği ve histopatolojik tanıyı kesinleştirmek için her üç testin de etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada kuzuların neonatal dönem ishallerinde önemli patojenlerden birisi olan *Cryptosporidium parvum* etkenleri, bağırsak smearı ve parafin kesitlerden MZN, immunohistokimyasal ve immunfloresan boyama yöntemleri ile teşhisi yapılmış, makroskopik ve histopatolojik bulgularını değerlendirilmiştir.

Araştırmada 0-30 günlük ishalleri kuzularda, bağırsak smearlarının MZN boyamalarında %13.3, Parafin blokları hazırlanan kesitlerin immunfloresan ve immunohistokimyasal boyamalarında ise %13.8 oranında pozitif olguya rastlanmıştır. Her üç teşhis yönteminin de hastalık teşhisinde etkili olduğu görülmüştür. Araştırma sonuçları dikkate alındığında, Cryptosporidiosis hastalığının kuzu kayıplarında önemli bir yeri olduğu dikkati çekmiştir.

Cryptosporidiosis hastalığı için etkili bir tedavi yöntemi olmadığından koruma tedbirleri öncelikle uygulanmalıdır. Koruma için, özellikle hastalığın neonatal dönem kuzulara bulaşması engellenmelidir. Ancak bu zor ve sabırlı bir mücadele gerektirmektedir. Dış ortama atılan ookistler oldukça dirençlidirler. Ortak yaşam alanları ve kontamine su bu aşamada önemli rol oynar. Enfeksiyon dozu çok düşük olup çok az sayıda ookist bile enfeksiyon oluşturabilir. Genç kedi ve kemirgenler ookistleri yayarlar. Serbest dolaşımli bir çok hayvan asemptomatiktir. Ayrıca kuşlar ve karasinekler mekanik olarak etkeni taşırlar.^{3,11}

Bu bilgiler doğrultusunda, özellikle neonatal dönem kuzuların yaşam alanlarının ayrılması gerekir. Yine, yaşam alanlarının ve içme sularının hijyenik durumuna dikkat edilmelidir. Kemirgen ve karasineklerle mücadele edilmeli, bu zararlıların çiftlik ortamından uzaklaştırılması sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Aytuğ N, Alaçam E, Özkoç Ü, Yalçın BC, Gökçen H, Türker H. *Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği*, İstanbul, TÜM VET Hayvancılık Hizmetleri, 1990: 212-213.
2. Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM. İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010, 16: 717-722.
3. Coop RL ve Wright SE. Cryptosporidiosis and Coccidiosis. In: Martin WB ve Aitken ID (ed) *Diseases of Sheep*. 3th ed, Blackwell Science, USA, 2003: 153-155.
4. Sevinç F ve Dik B. Cryptosporidia. İçinde: Dumanlı N, Karaer Z (editörler) *Veteriner Protozooloji*, 1. Baskı. Ankara, Medisan, 2010: 155-161.
5. İnci A. Sığırlarda Cryptosporidiosis. İçinde: Özcel MA (ed). *Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları*, İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2013: 135-142.
6. Sevinç F, Uslu U, Derinbay Ö. The prevalance of cryptosporidium parvum in lambs around Konya. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2005, 29:1191-1194.
7. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü. Hayvancılık Sektör Raporu. <http://www.tigem.gov.tr/Sektrel%20Deerlendirme%20Raporlar/2013%20TIGEM%20HAYVANCILIK%20SEKTOR%20RAPORU.pdf>. 15 Kasım 2014.
8. Günaydın G. Koyun Yetiştiriciliğinin Ekonomi Politikası. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2009, 23: 15-32.
9. Oruç E, Bali F, Gözün H. Konya ve çevresinde 2000-2003 yılları arasında incelenen kuzu ve oğlaklarda patolojik bulgular. *Veterinarium*, 2003, 14: 32-38.
10. Gökçe E, Erdoğan HM. An epidemiological study on neonatal lamb health.

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2009, 15: 225-236.

11.Bilal T ve Bilal T. *Koyun-Keçilerin İç Hastalıkları ve Beslenmesi*, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, 2005: 17-21.

12.Gökçe E, Kırmızıgül AH, Erdoğan HM, Çitil M. Risk factors associated with passive immunity, health, birth weight and growth performance in lambs: I. effect of parity, dam's health, birth weight, gender, type of birth and lambing season on morbidity and mortality. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2013, 19 (Suppl-A): A153-A160.

13.Karaer Z ve Dumanlı N. Genel protozooloji. İçinde: Dumanlı N, Karaer Z (editörler) *Veteriner Protozooloji*, 1. Baskı. Akara, Medisan, 2010: 18-19.

14.Fayer L ve Xiao L. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Florida, Taylor and Francis Group, 2008.

15.Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *The International Journal for Parasitology*, 2000, 30:1305-1322.

16.Brown CC, Baker DC, Barker IK. Alimentary System. İçinde: Maxie MG (ed) *Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Philadelphia, Saunders/Elsevier, 2007: 274-277.

17.Tzipori S, Angus KW, Campbell I and Grey EW. Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolated from a human patient with diarrhoea. *Gut*, 1982, 23:71-74.

18.Angus KW. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1983, 76: 62–70.

19.Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 2010, 124:80–89

- 20.Fayer R, Santín M ve Macarisin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinar Parasitology*, 2010, 172: 23–32.
- 21.Ozer, E., Erdogmus, S.Z. ve Koroglu, E. Investigation on the incidence of Cryptosporidia of calves and lambs in Elazig vicinity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 1990, 14: 439–445.
- 22.Ulutaş B, Voyvoda H. Cryptosporidiosis in diarrhoeic lambs on a sheep farm. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2004, 28:15-17.
- 23.Erman N, Beyazırt A, Oz I. Prevalence of cryptosporidiosis in lambs and goat kids in İzmir province. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2000, 25: 33-38.
- 24.Ozmen O, Yukari BA, Haligur M, Sahinduran S. Observations and immunohistochemical detection of Coronavirus, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal diarrhoea in lambs and kids. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 2006, 148:357-64.
- 25.Ozdal N, Tanrıtanır P, Göz Y, Deger S, Kozat A. Parasitic protozoans (Eimeria, Giardia, and *Cryptosporidium*) in lambs with diarrhoea in the Van province. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2009, 53: 47-51.
- 26.Sari B, Arslan MO, Gıcık Y, Kara M, Taşçı GT. The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, 2009, 41:819-26.
- 27.Abrahamson MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahamson JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 2004, 304: 441-445.

28. Milli ÜH. Sindirim sistemi. İçinde: Milli ÜH, Hazıroğlu R (editörler) *Veteriner Patoloji*, Ankara, Tamer Matbaacılık, 1997: 132-134.
29. Wright SE ve Coop RL. Cryptosporidiosis and Coccidiosis. In: Aitken ID (ed) *Diseases of Sheep*, 4th ed. Oxford, Blackwell Publishing. 2007: 179-185.
30. İça A. Cryptosporidiosis. İçinde: Özcel MA (ed). *Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları*, İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2013: 846-854.
31. Huang BQ, Chen XM and LaRusso NF. Cryptosporidium parvum attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphologic study. *The Journal of Parasitology*, 2004, 90 :212-21.
32. Umemiya R, Fukuda M, Fujisaki K, Matsui T. Electron microscopic observation of the invasion process of Cryptosporidium parvum in severe combined immunodeficiency mice. *The Journal of Parasitology*, 2005, 91:1034-9.
33. Brasseur P, Agnamey P, Emmanuel E, Pape JW, Vaillant M, Raccourt CP. Cryptosporidium contamination of surface and water supplies in Haiti. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 2011, 66:12-17.
34. Maikai BV, Baba-Onoja E.B.T, Elisha I.A. Contamination of raw vegetables with *Cryptosporidium* oocysts in markets within Zaria metropolis, Kaduna State, Nigeria. *Food Control*, 2013, 31: 45–48.
35. Ranjbar-Bahadori Sh, Mostoophi A, Shemshadi B. Study on Cryptosporidium contamination in vegetable farms around Tehran. *Tropical Biomedicine*, 2013, 30:193-198.
36. Angus KW, Appleyard WT, Menzies JD, Campbell I, Sherwood D. An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. *Veterinary Record*, 1982, 110:129-30.
37. Perkins ME, Riojas YA, Wu TW, Le Blancq SM. CpABC, a

Cryptosporidium parvum ATP-binding cassette protein at the host-parasite boundary in intracellular stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96:5734–5739.

38.Munoz M, Alvarez M, Lanza I and Carmenes P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiology & Infection*, 1996. 117: 203-11.

39.Barker IK, Barker CPL *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1974, 44: 289-298.

40.Casuape AC, Quilez J, Acedo CS, Cacho E, Bernad FL. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 2002, 104: 287-98.

41.Naciri M, Paul Lefay MP, Mancassola R, Poirier P, Chermette R. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Veterinary Parasitology*, 1999, 85: 245-247.

42.Ortega-Mora LM, Requejo-Fernández JA, Pilar-Izquierdo M, Pereira-Bueno J. Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to lambs: confirmation of periparturient rise. *The International Journal for Parasitology*, 1999, 29:1261-8.

43.Sevinc F, Irmak K, Sevinç M. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoeic and non- diarrhoeic calve. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2003, 5:357-361.

44.Ahourai P, Ezzi A, Gholami MR, Vandyoosefi J, Kargar R, Maalagh N. *Cryptosporidium* spp. in new born lambs in Iran. *Tropical animal health and production*, 1985 17: 6-8.

45.Angus KW, Tzipori S, Gray EW. Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from calves with diarrhea. *Veterinary Pathology*, 1982, 19:67-68.

46.Bejan A., Bolfa P., Magdas C., Pop R., Mircean Viorica, Cătoi C., Taulescu M., Cozma V. Morphological, histopathological and immunofluorescence characterization of *Cryptosporidium parvum* natural infection in goat kids from Romania. *Acta Veterinaria*, 2011, 61: 609-619

47.OIE Terrestrial Manual. Cryptosporidiosis.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPTO.pdf.
02.05.2015

48.Khurana S, Sharma P, Sharma A, Malla N. Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Tropical Parasitology*, 2012, 2:20-3.

49.Stibbs HH, Ongerth JE. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986, 24:517-21.

50.Arrowood MJ, Sterling CR. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27:1490-5.

51.Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27:1135-6.

52.Quílez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, del Cacho E, López-Bernad F. Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle

and pigs. *Veterinary Parasitology*, 1996, 67:75-81.

53. Loose JH, Sedergran DJ, Cooper HS. Identification of cryptosporidium in paraffin-embedded tissue sections with the use of a monoclonal antibody. *American Journal of Clinical Pathology*, 1989, 91:206-9.

EK 1: ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Yusuf AKPINAR Doğum tarihi: 22.06.1972 Doğum yeri: Konya Medeni hali: Evli, 3 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü, Meram, KONYA Tel: 0-505-8158309 E-mail: yusufakpinar42@hotmail.com
Eğitim
Lise: 60. Yıl Lisesi, .konya Lisans: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1990-1995
Yabancı Dil Bilgisi
Almanca, orta düzey
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Konya Veteriner Hekimler Odası
İlgi Alanları ve Hobiler

Yüzme, kitap okuma, spor müsabakalarını izleme

EK 2: ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-9

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

04.06.2013

ERZURUM

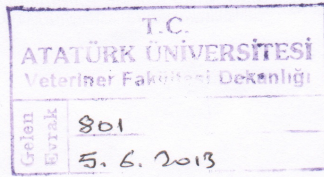
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 14.05.2013 tarih ve 36643897-432 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Ertan ORUÇ'un yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığının Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Kuzu Enteritislerinde Cryptosporidiosis Hastalığının Patolojik Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 31.05.2013 tarih ve 1 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 2 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan Vekili

Toplantı Tarihi : 31.05.2013

Toplantı Sayısı : 1

KARAR N0 : 2- Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Ertan ORUÇ'un yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığının Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Kuzu Enteritislerinde Cryptosporidiosis Hastalığının Patolojik Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 14.05.2013 tarih ve 36643897-432 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM

Telefon : 0-442-236 08 80

Fax : 0-442-236 08 81

e-mail: hadyek@atauni.edu.tr