

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARS YÖRESİNDEKİ BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM*  
ENFEKSİYONLARI PREVALANSININ MODİFİYE ASİT FAST  
(mAF) BOYAMA VE ELISA YÖNTEMLERİYLE  
BELİRLENMESİ**

**Bio. Neslihan GÜNDÜZ**

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mükremin Özkan ARSLAN**

**KARS- 2012**

**T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDEKİ BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM*  
ENFEKSİYONLARI PREVALANSININ MODİFİYE ASİT FAST  
(mAF) BOYAMA VE ELISA YÖNTEMLERİYLE  
BELİRLENMESİ**

**Bio. Neslihan GÜNDÜZ**

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mükremin Özkan ARSLAN**

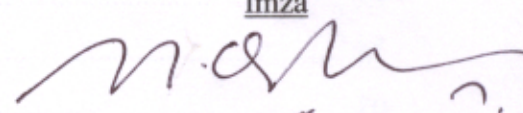
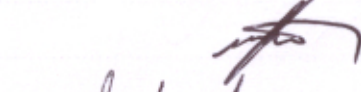

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından  
2010-VF-05 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

**KARS- 2012**

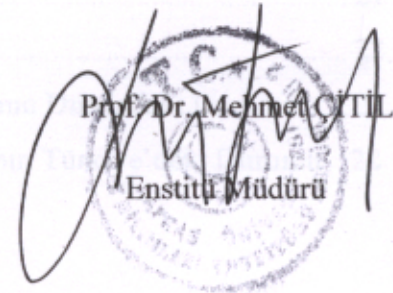
T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Bio. Neslihan GÜNDÜZ tarafından hazırlanmış olan, “**Kars Yöresindeki Buzağlarda *Cryptosporidium* Enfeksiyonları Prevalansının Modifiye Asit Fast (mAF) Boyama ve ELISA Yöntemleriyle Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunma sınavı sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY.BİRLİĞİ...ile...KABUL.....** edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2012

<u>Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Başkan Prof. Dr. M. Özkan ARSLAN	
Üye Prof. Dr. Murat KARA	
Üye Yrd. Doç. Dr. Neriman MOR	

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun...30.07.2012...gün ve ...27/152...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Mehmet CİTİL  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	I
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	III
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	IV
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	V
<b>ÖNSÖZ</b> .....	VI
<b>1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER</b> .....	1
1.1 Taksonomi .....	2
1.2 Etiyoloji.....	2
1.3 Morfoloji ve Yaşam Döngüsü .....	5
1.4 Epidemiyoloji .....	10
1.5. Klinik Bulgular, Pataloji ve Patogenez.....	12
1.6. Teşhis .....	14
1.6.1 Direkt Dışkı Muayenesi .....	14
1.6.2 Boyama Yöntemleri.....	14
1.6.2.1 Auramine Phenol Boyama Yöntemi .....	15
1.6.2.2 Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi .....	16
1.6.2.3 Kinyoun Asit-Fast Boyama Yöntemi .....	16
1.6.2.4 Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi.....	17
1.6.2.5 Karbol-Fuksin Boyama Yöntemi.....	18
1.6.3 İmmunolojik Yöntemler.....	19
1.6.3.1 Direkt İmmunfloresans Antikor Testi (DFA).....	19
1.6.3.2 İndirekt Floresan Antikor Test (IFAT) .....	20
1.6.3.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	20
1.6.4 Moleküler Biyolojik Yöntemler .....	21
1.7 Tedavi .....	21
1.8 Korunma ve Kontrol .....	22
1.9 Buzağlarda Cryptosporidiosis Enfeksiyonlarının Dünyadaki Durumu .....	21
1.10 Buzağlarda Cryptosporidiosis Enfeksiyonlarının Türkiye'deki Durumu .....	22

<b>2.</b>	<b>MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>27</b>
2.1	Materyal .....	27
2.1.1	Hayvan Materyali .....	27
2.1.2	Dışkı Örnekleri .....	27
2.2	Metot .....	28
2.2.1	Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi .....	28
2.2.1.1	Hazırlanan Solüsyonlar .....	28
2.2.1.2	Boyama Yöntemi .....	29
2.2.2	ELISA Metodu .....	30
2.2.2.1	<i>Cryptosporidium parvum</i> ELISA Kiti .....	31
2.2.2.1.1	Testin Prensibi .....	31
2.2.2.1.2	Kitin İçeriği .....	31
2.2.2.1.3	Örneğin Hazırlanması .....	32
2.2.2.1.4	Prosedür .....	32
2.2.2.1.5	Sonuçların Değerlendirilmesi .....	33
2.2.2.2	<i>Cryptosporidium sp.</i> ELISA Kiti .....	34
2.2.2.2.1	Testin Prensibi .....	34
2.2.2.2.2	Kitin İçeriği .....	34
2.2.2.2.3	Örneklerin Hazırlanması .....	35
2.2.2.2.4	Prosedür .....	35
2.2.2.2.5	Sonuçların Değerlendirilmesi .....	36
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>37</b>
3.1	Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi Sonuçları .....	37
3.2	<i>Cryptosporidium parvum</i> ELISA Kiti İle Yapılan Test Sonuçları .....	39
3.3	<i>Cryptosporidium sp.</i> ELISA kiti ile Yapılan Test Sonuçları .....	41
3.4	mAF Boyama Yöntemi İle ELISA Kitleri Test Sonuçlarının Karşılaştırılması .....	42
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>ÖZET</b> .....	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>55</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AP</b>	Auramine Phenol
<b>COWP</b>	Cryptosporidium oocyst wall protein
<b>Crypto</b>	Cryptosporidium
<b>DFA</b>	Direct Immunfloresans Assay
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>ELISA-(EIA)</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>GP60</b>	Glikoprotein 60
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>KOH</b>	Potasyum Hidroksit
<b>IFA</b>	İndirek Floresan Antikor Test
<b>mAF</b>	Modifiye Asit Fast
<b>mAF Boyama</b>	Modifiye Asit Fast Boyama
<b>mZN</b>	Modifiye Ziehl Neelsen
<b>ml</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>SAF</b>	Sodyum asetat-asetik asit formalin
<b>SSU rRNA(18rRNA)</b>	Small subunit ribosomal RNA
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PVA</b>	Polivinly alkol
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>rRNA</b>	Ribosomal Ribonükleik Asit

**TABLÖLAR DİZİNİ**

Tablo 1.1. <i>Cryptosporidium</i> Etkenlerinin Sistematikteki Yeri	2
Tablo 1.2. İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli <i>Cryptosporidium</i> türleri ve bazı özellikleri	5
Tablo 1.3. <i>Cryptosporidium</i> türlerinde prepatent ve patent süreler	9
Tablo 2.1. Çalışmada Kullanılan Dışkı Örneklerinin Gruplandırılması	27
Tablo 2.2. Dışkı örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti kriterleri	30
Tablo 3.1. Kars Yöresinde Buzağılarda Yaş ve Klinik Duruma Göre <i>Cryptosporidium</i> Yaygınlığı	43
Tablo 3.2. mAF boyama ve <i>Cryptosporidium parvum</i> ELISA kiti sonuçlarının karşılaştırılması	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un yaşam döngüsü.....	10
Şekil 1.2. Auramine Phenol Boyama Yönteminin Yapılışı .....	15
Şekil 1.3. Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama Yönteminin Yapılışı .....	16
Şekil 1.4. Kinyoun Asit-Fast Boyama Yönteminin Yapılışı.....	17
Şekil 1.5. Modifiye Asit-Fast Boyama Yönteminin Yapılışı.....	18
Şekil 1.6. Karbol-Fuksin Boyama Yönteminin Yapılışı.....	19
Şekil 2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> ELISA kiti.....	32
Şekil 2.2. <i>Cryptosporidium sp.</i> ELISA kiti .....	35
Şekil 3.1. Kars Yöresinde Buzağılarda <i>Cryptosporidium</i> Yaygınlığı .....	37
Şekil 3.2. Kars Yöresinde Buzağılarda mAF Boyama Yöntemine Göre Cryptosporidium Ookist Yoğunluğu.....	38
Şekil 3.3. mAF Boyama Yöntemine Göre Pozitif Olguların Klinik Durum ve Yaşa Göre Dağılımı .....	38
Şekil 3.4. mAF Boyama Yöntemiyle Saptanan <i>Cryptosporidium</i> Ookistleri .....	39
Şekil 3.5. Kars yöresindeki buzağılarda <i>C.parvum</i> koproantijenlerinin klinik durum ve yaşa göre yaygınlığı.....	40
Şekil 3.6. ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü .....	40
Şekil 3.7. Kars yöresindeki buzağılarda <i>Cryptosporidium</i> koproantijenlerinin yaygınlığı .....	41
Şekil 3.8. mAF boyama ve ELISA testinin <i>Cryptosporidium</i> ookistleri yaygınlığı üzerine karşılaştırılması .....	42



## ÖNSÖZ

Türkiye'nin en doğusunda bulunan Kars ilinin en önemli geçim kaynağı, sahip olduğu dağlık arazi yapısı nedeniyle hayvancılıktır. Son yıllarda sayısı ciddi oranda azalmasına rağmen Türkiye'deki hayvan varlığının büyük bir kısmı Kars yöresinde bulunmaktadır. Yöredeki hayvanların sağlığı, hem insan sağlığı hem de yöre halkının geçim kaynağı olması açısından oldukça önem arz etmektedir.

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de ve Kars yöresinde özellikle buzağuların sağlığını ciddi oranda tehdit eden hastalıklardan biri de cryptosporidiosistir.

İntestinal protozoonlardan olan Cryptosporidium türleri genç hayvanlarda ishaller, zoonotik özelliğiyle de insanlarda sindirim sistemi bozukluklarına neden olmaktadır.

Hayvancılığın önemli bir yere sahip olduğu Kars yöresinde yapılan bu çalışmada Cryptosporidium enfeksiyonunun yaygınlığının modifiye asit-fast boyama (mAF) ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana her zaman yön gösteren ve destek veren, çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. M. Özkan ARSLAN, Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Zati VATANSEVER, sayın Prof. Dr. Atila AKÇA, sayın Prof. Dr. Murat KARA'ya, sayın Doç. Dr. Barış SARI, sayın Dr. G. Taşkın TAŞCI, Kars Sağlık Yüksek Okulu Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Neriman MOR, Kars Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Dr. Aysel İTİK EKİNCİ'ye, ve materyal toplama esnasındaki yardımları nedeniyle Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hayvan Sağlığı Şube Müdürlüğü Veteriner Hekimlere ve çiftlik sahiplerine,

Projeye destek sağlayan KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığı'na,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* cinsi protozoon parazitlerin memeli, sürüngen, kanatlı ve balıklarda oluşturduğu zoonotik bir enfeksiyondur. Cryptosporidiosis evcil hayvanlarda ve insanlarda ishale neden olan dünya genelinde oldukça yaygın bir hastalıktır. *Cryptosporidium* türleri omurgalıların gastrointestinal sistemlerinde, epitel hücrelerindeki mikrovillusların kenar kısımlarında, intrasellüler-ekstrasitoplazmik olarak bir parazitofor vakuol içinde bulunmaktadır. Ayrıca, kanatlılarda solunum sistemi, bursa fabricius ve konjunktivada, insan ve domuzlarda solunum sisteminde, maymunlarda safra kesesi, safra yolları ve pankreasta *Cryptosporidium* türleri saptanmıştır. Cryptosporidiosisde, insan ve hayvanlarda immun sistemin rolü oldukça önemlidir. Zira immun sistemi baskılanmış konaklarda hastalık ileri düzeye ulaşabilmekte ve ölümler görülebilmektedir (Thompson ve ark., 2005, O'Handley ve Olson 2006, Fayer, 2008).

*Cryptosporidium* türleri, konakta merogoni, gametogoni ve sporogoni olmak üzere üç endojen gelişme dönemi geçirerek dışkı ile 4-6 mikron büyüklüğünde ve 4 adet sporozoit içeren ookist olarak atılmaktadır. Bu ookistler atıldığı andan itibaren enfektiftir ve fekal-oral bulaşma biçimi ile hastalığın yayılışında önemli rol oynarlar. Ayrıca bu ookistlerin yaklaşık %20'si konak içinde parçalanıp otoenfeksiyonlara da neden olmaktadır (Tzipori ve Ward 2002, Xiao ve ark. 2004, O'Handley ve Olson 2006, Fayer 2010).

İnsan ve hayvanların sindirim sistemlerine yerleşen *Cryptosporidium*'ların 20. yüzyıl başlarında belirlenmiş olması, dönem dönem salgınlara neden olması, zoonotik yönü, immun yetmezlik durumlarındaki önemi ve özellikle buzağılardaki ekonomik kayıpları dikkati çeker boyuttadır. *Cryptosporidium*'lar dünyada ve Türkiye'de de yaygın olarak görülmekte olup, buzağı gibi genç hayvanlar dışkıları ile daha fazla ookist atarak hastalığın bulaşmasında önemli rol oynarlar. Bugüne kadar sığırlarda *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* olmak

üzere dört tür bildirilmiştir. Bunlardan *C. parvum*'un konak spektrumu daha geniş olup, buzağılarda yaygın olarak görülmektedir. Ayrıca *C. parvum* türü insanlarda cryptosporidiosis etiyolojisinin %45 ini oluşturmaktadır (Thompson ve ark. 2005, Nichols 2008, Fayer 2010).

### 1.1. Taksonomi

Cryptosporidium adlı protozoonun sistematikteki yeri 1911 yılında Leger tarafından belirlenmiştir. Cryptosporidium'lar ökaryotik protozoonlar olup, tek hücreli organizmalardır. DNA'ları bir çift zarla etrafı çevrili olarak nükleus içinde bulunmaktadır. Cryptosporidium etkenlerinin sistematikteki yeri Tablo 1.1'de verilmiştir (Xiao ve ark. 2004, Fayer 2010, Karaer ve Dumanlı 2010)

**Tablo 1.1.** Cryptosporidium Etkenlerinin Sistematikteki Yeri (Fayer 2008)

<b>Alem</b>	Protista
<b>Kök</b>	Alveolata
<b>Kökaltı</b>	Apicomplexa, Levine, 1970
<b>Sınıf</b>	Coccidea, Leuckart, 1879
<b>Dizi</b>	Cryptosporiida
<b>Aile</b>	Cryptosporidiidae Leger, 1911
<b>Soy</b>	Cryptosporidium, Tyzzer, 1910
<b>Tür</b>	<i>C. parvum</i> , Tyzzer 1912 <i>C. andersoni</i> , Lindsay, Upton, Owens Morgan, Mead ve Blagburn 2000 <i>C. bovis</i> , Fayer, Santin, Xiao 2005 <i>C. ryanae</i> , Fayer, Santin, Trout 2008

### 1.2. Etiyoloji

Cryptosporidium türleri ilk kez 1885 yılında Clarke tarafından bulunmuş ve “fare mide epitelinde bulunan spor kümeleri” olarak tanımlanmıştır. Ernest Edward Tyzzer tarafından 1907 yılında yapılan laboratuvar çalışmalarında farelerin mide epitel hücrelerinde etken ilk kez açıkça belirlenmiştir ve yayımlanmıştır. Tyzzer fare dışkısında ookistleri belirleyerek bu paraziti *Cryptosporidium muris*

olarak isimlendirmiştir. Araştırmacı 1912’de farenin ince bağırsağında gelişen ve ookistleri *Cryptosporidium muris*’ inkinden daha küçük yapıda olan yeni bir türü bulmuş ve bu yeni türü *Cryptosporidium parvum* olarak isimlendirmiştir. Devam eden çalışmalar sürecinde kanatlılarda, memelilerde ve sürüngenlerde etkili olan türler tespit edilmiştir. Tyzzer 1929 yılında, tavukların sekum epitellerinde *Cryptosporidium* etkenini tespit etmiştir. Slavin tarafından 1955’te hindilerde yeni bir tür tespit edilmiş ve *Cryptosporidium meleagridis* olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca bu etkenin nadirde olsa ölüme sebebiyet verdiği belirtilmiştir. Sığırlarda *Cryptosporidium* etkeninin diyareye neden olduğu 1970’lerin başında rapor edilmiş ve bununla beraber hastalığın önemi ortaya çıkmıştır (Sears ve Kirkpatrick 2001, Fayer, 2008).

*Cryptosporidium* etkenini, buzağılarda ilk olarak 1971 yılında Paancier ve ark. saptamışlardır. Klinik olarak, kronik zayıflama, dehidrasyon ve ishal görülen bir buzağının nekropsisinde ince bağırsaklara yapılan histopatolojik bakıda villuslarda genel atrofi ve *Cryptosporidium* türlerinin çeşitli gelişme dönemlerine rastlanmıştır. İkinci olgu 1974 yılında Meuton ve ark. tarafından, 2 haftalık bir buzağının otopsisinde ileum ve kolonlarda lezyonlara rastlanmış ve histopatolojik bakılarda yine *Cryptosporidium* etkenlerinin çeşitli gelişme dönemlerine rastlandığı bildirilmiştir (Tzipori ve Ward 2002).

*Cryptosporidium* etkenlerinin insanlarda da ishalle seyreden bir hastalık oluşturduğu 1976 yılında bildirilmiştir. Bu durum ilk olarak kronik ishal ile seyreden 3 yaşındaki bir çocukta ve kemoterapi alan, bunun sonucunda da şiddetli ishal gösteren bir hastada saptanmıştır. Current ve ark. (1983), yaptıkları bir çalışmada *Cryptosporidium*’un normal ve immünsüpresif hastalarda ishale neden olduğunu rapor etmişlerdir. A.B.D.’de Güney Milwaukee bölgesinde içme suyu kaynaklı olarak ortaya çıkan ve 403.000 kişide şiddetli hastalık oluşturan, en çok AIDS hastalarını etkileyen salgınla, olgu epidemik karakter taşıyan önemli hastalıklar grubuna dâhil edilmiştir (Sears ve Kirkpatrick 2001, Truong ve Ferrari 2006, Fayer, 2008).

Türkiye’de ise *Cryptosporidium* ookistleri ilk defa 1984 yılında Burgu tarafından, Karacabey Harasında 1-28 günlük buzağılarda tespit edilmiştir (Burgu 1984).

Dünyada son 20 yıldan beri *Cryptosporidium*’larla ilgili biyolojik, epidemiyolojik ve moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Bugüne kadar balıklarda 2, amfibi ve sürüngenlerde 3, kuşlarda 3 ve memelilerde 12 adet olmak üzere toplam 20 *Cryptosporidium* türü kesin olarak belirlenmiştir (Fayer 2010). Memelileri enfekte eden *C. parvum* türünün ookistlerinde bulunan sporozoitlerin çeşitli nükleik asit ve enzimlerini kodlayan genlerin moleküler analizlerine göre farklı çok sayıda genotipinin varlığı tespit edilmiştir. Moleküler analizler sonucunda insanlardaki cryptosporidiosisden sorumlu olan *C. parvum* etkeninin 2 farklı genotipinin olduğu, bunlarda insan genotipinin (genotip 1; genotip H) sadece insanlarda, sığır genotipinin (genotip 2; genotip C) ise sığır, insan, koyun, geyik ve nadiren domuz ve fareleri enfekte edebildikleri belirlenmiştir. Bu genotipler sonradan *C. hominis* (genotip 1) ve *C. parvum* (genotip 2) olarak isimlendirilmiş ve farklı 2 tür olarak tanımlanmıştır (Fayer, 2008, Fayer ve ark. 2008). Bu türün son çalışmalarda *C. ryana* olduğu belirtilmiştir. (Fayer, 2010).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, buzağılarda identifiye edilen *C. ryanae* türü; *C. bovis*, *C. andersoni* ve *Cryptosporidium* sp. geyik genotipi gibi yaşlı sığırlarda yada süttten kesim sonrası yaşlarda görülmektedir. Bu türlerin aksine *C. parvum* türüne genellikle süt kesim öncesi yaşlarda rastlanmaktadır. *C. ryanae* türünün sığırlarda bildirilen *Cryptosporidium* geyik genotipi olabileceği ve ileriki araştırmalarda bunun kesinlik kazanabileceği de iddia edilmektedir (Fayer ve ark. 2008).

*Cryptosporidium parvum* genç ruminantlarda, süttten kesilmiş yetişkin hayvanlarda öncelikle ishale neden olur. İshalli buzağılar dışkıının her gramında  $5 \times 10^5$  ve  $2 \times 10^6$  arasında ookist dışarı atmaktadırlar. *Cryptosporidium andersoni* ise genellikle süttten kesim sonrası denilen 3 aylıktan itibaren olan yaşlarda yani daha yaşlılarda görülmektedir. *Cryptosporidium andersoni* mideye yerleşmekte, diyareye yol açmamakta fakat kilo kaybı ve süt veriminin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Enfekte olmuş hayvanlar aylarca ookistleri dışarı atabilir fakat *C.*

*parvum*'la enfekte olmuş hayvanlara göre daha az ookist atma eğilimindedirler (dışkıının her gramı için 300-1500 e kadar) (Smith, 2008).

Sığırlarda *C. parvum* öncelikle neonatal buzağı diyaresinin etiyolojik ajanlarından biridir ve potansiyel olarak önemli kayıplara neden olur. *C. andersoni* değişik zamanlarda sığırlardan izole edilmiştir. Bu organizma morfolojik karakterleriyle *C. parvum*'dan kolaylıkla ayırt edilir (Starkey ve ark. 2005).

İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli *Cryptosporidium* türleri ve bazı özellikleri Tablo 1.2'te özetlenmiştir (Fayer 2008).

**Tablo 1.2.** İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli *Cryptosporidium* türleri ve bazı özellikleri

Tür	Başlıca konağı	Enfeksiyon Yeri	OOKİST büyüklüğü	İnsan enfeksiyonu
<i>C. hominis</i>	İnsan	İnce barsak	4.5x5.5	Var
<i>C. parvum</i>	Çiftlik hayvl., insan	İnce barsak	4.5x5.5	Var
<i>C. suis</i>	Domuz	İnce barsak	4.4x5.1	Var
<i>C. felis</i>	Kedi	İnce barsak	4.5x5.0	Var
<i>C. canis</i>	Köpek	İnce barsak	3.7-5.9x3.7-5.9	Var
<i>C. meleagridis</i>	Hindi	Barsak	4.5-5.0x4.6-5.2	Var
<i>C. muris</i>	Rodentler	Mide	5.5x7.4	Var
<i>C. andersoni</i>	Sığır	Mide	5.6x7.4	Yok
<i>C. wrairi</i>	Kobay	İnce barsak	4.0-5.0x4.8-5.6	Yok
<i>C. bovis</i>	Sığır	İnce barsak	4.2-4.8x4.8-5.6	Yok
<i>C. baileyi</i>	Kümes hayvl.	Trkea, bursa fabricius, kloaka	4.6-6.2	Yok
<i>C. gali</i>	Tavuk, ispinoz	Proventrikulus	6.2-6.4x8.0-8.5	Yok
<i>C. ryanae</i>	Sığır	?	3.7x3.2	?

### 1.3. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

*Cryptosporidium* türlerinin biyolojik gelişmelerinde konak dışında (eksojen=exogenous) ve konak içinde (endojen=endogenous) olmak üzere iki ana dönemde gelişme görülmektedir. Konak içinde aseksüel çoğalma (merogoni) ve seksüel üreme (gametogoni) ve sporogoni dönemleri görülür (Fayer ve ark. 2008).

Çevresel olarak parazitin bulaşıcı ve enfektif formu ookistlerdir. Sporlanmış ookistlerin yalnızca ekzojen evrede dışkı ile enfekte olmuş konağın vücudundan dışarı atıldığı saptanmıştır. Enfekte hayvan dışkılarında milyonlarca ookist dışarı atılır. Bu ookistler atıldığı andan itibaren enfektif oldukları için, su (waterborne=su ile taşınan), gıda (foodborne=gıda ile taşınan) ya da yakın temasla ile oral yolla alınarak konağın enfekte olmasına neden olurlar (Fayer ve ark. 2008).

Buzağılarda yaygın olarak görülen *C. parvum* türünde genellikle su kaynaklı bulaşma söz konusudur. Çünkü hayvanların dışkısı ile suların bulaşması ve buradan hayvanlara ve zoonotik olarak ta insanlara enfeksiyon bulaşır. Yani *C. parvum*'un sığırlarda bulunan subtipleri (zoonotik türler) genellikle su yoluyla, insanlarda bulunan (antroponotik türü) subtipleri ile *C. hominis* türü gıda ve su yoluyla bulaşmaktadır (Fayer ve ark. 2008).

Etkenin dışkı ile dış ortama atılan formu; sporlanmış ve tam olarak enfektivite kazanmış, içerisinde 4 adet sporozoit bulunan ookistlerdir. Sporlanmış bir ookist elverişsiz koşullar altında, 4 sporozoitin yaşamını sürdürmesini sağlayan ve çevresini saran dayanıklı bir yapı olan üç katmanlı (trilaminar) duvardan meydana gelmiştir. Bu sporozoitler yeni enfeksiyon ajanlarına dönüşmektedirler (Fayer ve ark. 2008).

*Cryptosporidium parvum* ve *C. hominis*'in esas yerleşim yeri ince bağırsaklardır. *Cryptosporidium parvum*, buzağılarda genellikle ileum üst kısmından sekuma kadar olan bölgede yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca hayvanlarda ve immun sistemi baskılanmış insanlarda ekstraintestinal olarakta rastalanabilir. *Cryptosporidium muris*, *C. andersoni* ve *C. serpentis* türleri ise mide mukozasında yerleşmektedir.

Yaşam döngüsü, *Eimeria* ve *Isospora* gibi coccidian parazitlerin yaşam döngülerine benzer şekildedir ve 6 gelişim evresi geçirmektedirler (Fayer ve ark. 2008).



## A) Ekskistasyon dönemi

Endojen safha, uygun konak tarafından ookistin parçalanmasından sonra başlar. Enfeksiyona doğru ilk adım ekskistasyondur. Bu olayda ookistin iç kısmında direk bir sütür boyunca ookist duvarı açılarak 4 sporozoit ookistten ayrılır. *Cryptosporidium* ile akraba olan Apicomplexan parazitlerin birçoğu için ince bağırsaktaki safra tuzları, midede ki değişik indirgeyici etmenler, pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler ve vücut ısısı gibi etkilere maruz kalınması durumunda sporozoitlerin ekskistasyonu gerçekleşir. *Cryptosporidium* için böyle koşullar ekskistasyonu arttırabilir ancak deneysel koşullar altında, ılık aköz solüsyon içinde ookistlerden ekskist olabilen sporozoitler görülmüştür. Bu durum, vajina, uterus, ovaryum, testisler, lenf nodülleri, safra kesesi, solunum sistemi, gözlerde konjunktiva gibi ekstraintestinal yerlerde enfeksiyonlar oluşmasına ve otoenfeksiyona imkan vermektedir. Ookistlerden ekskist olan sporozoitler hareketlidirler, ilk olası giriş yerleri konak hücrenin apikal ucudur ve aktif bir şekilde hücreye saldırırlar.

## B) Merogoni Dönemi (Aseksüel Çoğalma)

Dünyada yaygın olarak görülen, insan ve hayvanlarda da önemli olan *C. parvum*' un merogoni döneminde 2 tip meront (şizont) görülmektedir (*C. baileyi*' de 3 tip meront vardır). Aseksüel çoğalma olarak isimlendirilen merogoni (şizogoni) sonuçlandığı zaman trofozoitlerin nukleusları bölünür. Serbest kalan sporozoitler konağın epitel hücreleri içerisine girmektedirler. Parazitin konak hücresi ile temasında sporozoitlerin sahip olduğu glikoprotein önemlidir. Mucin benzeri bu glikoprotein sayesinde temas oluşmakta ve bir parazitofor vakuol şekillenmektedir. Bu parazitofor vakuol içindeki sporozoitler intrasellüler olup, konak-hücre sitoplazması ile direkt teması yoktur yani ekstrasitoplazmiklerdir. Bu parazitofor vakuol süresince parazit konoid, roptri ve mikronem ile oluşturulan konak hücresi arasındaki bağ sayesinde ilişki kurulmakta ve bu organeller ile konak hücre sitoplazması ile direkt temas kurulmaktadır. Epitel hücrelerin mikrovillus bölgesine parazitofor vakuoller içinde tek nukleuslu olan merontlar trofozoitlere dönüşmektedir. Daha sonra eşeysiz olarak (merogoni) çoğalarak Tip I merontları

oluşturmaktadırlar. Tip I merontlardan meydana gelen merozoitler yeni hücrelere girerek tekrar eşeysiz çoğalma ile Tip I merontları veya Tip II merontları oluşturmaktadır.

### **C) Gametogoni Dönemi (Seksüel Çoğalma)**

Tip II merontlardan meydana gelen merozoitler seksüel üremeyi başlatırlar ve farklı konak hücrelerine girerek mikrogamont (erkek, mikrogametosit) ve makrogamont (dişi) oluştururlar. Mikrogamontlar çok nukleusludur ve bir sperm hücresiyle eşit olan mikrogametlere dönüşmektedirler. Makrogamontlar ise tek nukleusa sahiptir.

### **D) Döllenme Dönemi**

Kamçısız, hareketli olan mikrogamontlar, makrogamont sitoplazmasına girerek döllenmeyi gerçekleştirirler ve döllenme sonucunda makrogamontlardan ookist gelişmektedir.

### **E) Ookist Dönemi**

Zigot duvarı kalınlaşarak, dış ortama dayanıklı ve konak türleri için enfektif olan ookist formu gelişmektedir.  $2n$  kromozomlu döllenmiş makrogamontlar, mayoz bölünme geçirmekte ve 4 adet  $1n$  yapılı sporozoitler gelişmektedir.

### **F) Sporogoni Dönemi**

Konağın gastrointestinal sisteminde sporlanan ookistler dışkı ile dışarı atılmaktadırlar. Konağın solunum sisteminde yerleşenlerde ise solunum ve burun akıntıları ile dışarı atılmaktadırlar. Oluşan ookistlerden ince cidarlı olanlar konakta otoenfeksiyona neden olmaktadır. Dış çevre şartlarına dirençli olan kalın cidarlı ookistler vücut dışına atılmaktadırlar.

Cryptosporidium ookistleri konak hücre içindeyken sporogoni geçirdikten sonra bağırsak lümenine döküldüklerinde enfektif hale geçmektedirler (Sears ve Kirkpatrick 2001, Fayer, 2008)

Prepatent periyot (süre), enfektif ookistlerin alınmasından parazitin konak içinde gelişmesini tamamladığı, ookistlerin ilk olarak oluştuğu, dışkıyla atıldığı süreye kadar geçen zamana verilen isimdir.

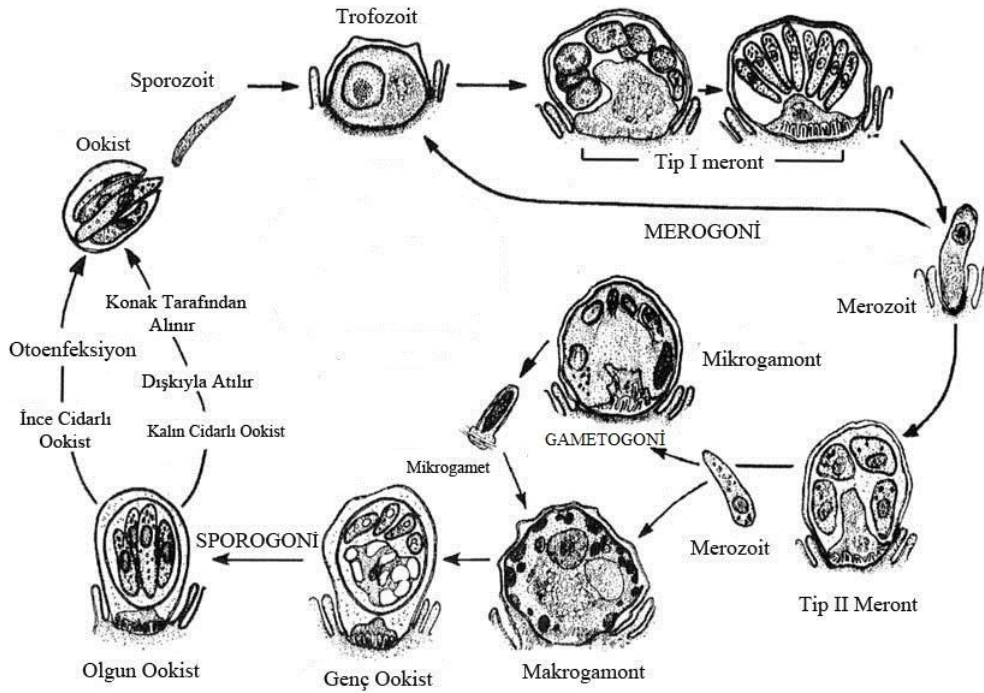
Ookist atılımının devam ettiği güne kadar enfeksiyonun devam ettiği döneme ise patent periyot (süre) adı verilir. Enfeksiyonun sürekliliği genellikle ookistlerin ekskresyon günleri ile karakterizedir. Bu dönem konak ve enfektif doz gibi Cryptosporidium türlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Fayer, 2008).

Cryptosporidium türlerinde prepatent ve patent süreler (gün) Tablo 1.3.'te görülmektedir (Fayer 2008).

**Tablo1. 3.** Cryptosporidium türlerinde prepatent ve patent süreler (gün).

Tür	Konak	Prepatent süre	Patent Süre
<i>C.parvum</i>	Buzağı	2-7	1-12
	İnsan	4-22	1-20
<i>C.suis</i>	Domuz	2-9	9-15
<i>C.muris</i>	Fare	6-21	
<i>C.felis</i>	Kedi	5-6	7-10
<i>C.bovis</i>	Sığır	10-12	18
<i>C.baileyi</i>	Tavuk	4-24	18
<i>C.ryanae</i>	Buzağı	11	15-17

*Cryptosporidium parvum*' un yaşam döngüsü Şekil1.1'de gösterilmiştir (Fayer 2008).



**Şekil 1.1:** *Cryptosporidium parvum* 'un yaşam döngüsü (Fayer 2008).

#### 1.4.Epidemiyoloji

*Cryptosporidium* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde etken, konak ve çevre önemli rol oynamaktadır. Etken olan *Cryptosporidium* türü, konağın türü ve yaşı, çevresel özellikler, konağın bulunduğu ahır ve ahırın koşulları ile çiftlik yönetimi cryptosporidiosisin epidemiyolojisinde rol alan faktörlerdir. Sığırlarda *C. parvum*'un prepatent süresi 2–7 gün olup, enfekte hayvanlar dışkıları ile 2-3 hafta kadar (ortalama 10 gün) enfektif olan ookistleri dışarı atarlar. İshalli olan neonatal buzağılar gram dışkıda  $10^7$  den daha fazlaya varan sayıda ookist atabilirler. Cryptosporidiosisin klinik hal almasında ve patojenitesinde alınan ookist sayısı oldukça etkilidir. *Cryptosporidium. parvum*'da minimum enfektif doz 30 ookisttir. Dışkı ile dışarı atılan kalın cidarlı enfektif bu ookistler su, gıda ya da yakın temasta oral yolla alınarak konakların enfekte olmasına neden olmaktadır. Buzağılarda yaygın olarak görülen *C. parvum* türünde genellikle su kaynaklı bulaşım söz konusudur. Buzağuların dışkıları ile kirlenen suların içilmesi ile hayvanlara ve zoonotik olarak ta insanlara enfeksiyon bulaşmaktadır (O'Handley ve ark.1999, Fayer 2008, Nichols 2008).

Ookistlerin çevre koşullarına son derece dirençli olmaları bulaşmaya yardımcı olmakta ve hastalığın prevalansını etkilemektedir. Ookistler soğuk ve nemli havalarda aylarca canlı kalabilmektedirler. Ayrıca sularda yapılan standart klorlama düzeylerine de dirençlidir. Bu nedenle insanlar arasında epidemik salgınların görülmesinde çoğunlukla su kaynaklı bulaşmalar ön plana çıkmaktadır (O'Handley ve ark.1999, Thompson ve ark. 2005, Nichols 2008).

Dünyada daha önemli tür olan *C. parvum* neonatal buzağular başta olmak üzere diğer ruminantlarda ve insanlarda cryptosporidiosisin başlıca etkenidir. Hastalık 3 günlüğe kadar olan ruminantlarda görüldüğü halde en yaygın olarak görüldüğü yaş grubu 1-3 haftalıklardır. Enfeksiyona 1 aylık üzerindeki hayvanlarda nadiren rastlanmaktadır. Ancak hastalığın yayılışında etkili risk faktörlerin uygun olması ve salgınların ortaya çıkması olguları bu yaş grubu sınırlamaları dışındadır (O'Handley ve ark.1999, Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008, Nichols 2008).

Cryptosporidium enfeksiyonları kendi kendini sınırlayan özellikte olup, ookist atılımı 1-2 hafta kadar devam etmektedir. Enfeksiyonları takiben immunité gelişir ve daha sonraki enfeksiyonlara karşı hayvanlar dirençli hale gelmektedir. Yani ilk enfeksiyonlarda ookist atılımı daha fazla olmaktadır ve yaşla beraber azalmaya başlamaktadır. İlk enfeksiyonlar özellikle neonatal dönemde şiddetli seyretmekte, klinik cryptosporidiosis oluşmakta ve hatta tedavi edilmezse ölümler şekillenmektedir. *C. parvum* türü daha çok gençlerde yani neonatal dönemde ya da buzağı, oğlak ve kuzularda görülmekte ve yaygınlığı %100'lere kadar varmaktadır (O'Handley ve ark.1999, Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008, Nichols 2008).

Neonatal ruminantlarda *C. parvum* enfeksiyonları etçi buzağulara göre sütçü buzağularında daha yaygın olarak görülmektedir. Bunda sütçü işletmelerdeki buzağı sayısının fazla olması ve bu buzağularında daha fazla ookist çıkarabileceği etkili olabilen faktörlerdir. Yetiştirme tiplerinin yani kapalı veya yarı açık kapalı, iklim, mera dönemi olup olmaması, yaşlılarla bir arada bulunma, altlık durumu, su içme düzeni, altlık temizlenme biçimi ve sıklığı, hayvan sayısı, farklı yaş gruplarındaki hayvanları aynı bölmelerde bulunması gibi çeşitli faktörler cryptosporidiosisin

yayıllığında etkili faktörler olarak sayılabilir (O’Handley ve ark.1999, Thompson ve ark. 2005).

*Cryptosporidium andersoni* türü ilk olarak 1987 yılında sığırlarda tespit edilmiştir (daha önce *C. muris* olarak adlandırılmıştır). Koyun ve kuzular deneysel olarak bu türle enfekte edilememiş ancak son yıllarda bir koyunda *C. andersoni* ookistleri saptanmıştır. Prevalansı %5 ler düzeyinde olup, bazı sürülerde %30 lara kadar varmaktadır. *Cryptosporidium. andersoni* esas olarak süt kesim sonrası yaşlarda ya da erişkin sığırlarda görülür ve enfeksiyon genellikle kronik seyirlidir ve aylarca hatta yıllarca devam etmektedir. Bu türlerden başka hakkında daha sınırlı bilgi bulunan *C. bovis* türü ise daha yaşlı buzağılarda görülmektedir (O’Handley ve ark.1999, Thompson ve ark. 2005,Fayer 2008, Nichols 2008).

### **1.5. Klinik Bulgular ve Patogenez**

Neonatal ruminantlarda *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonlarında klinik olarak diyare, belirgin ve bilinen önemli bir bulgu olarak görülmektedir. Dışkı, genellikle soluk sarımsı renkte olup bol sulu özelliindedir. İshal bazen mukuslu olabilir. Genel halsizlik, iştahsızlık, hayvanın arka tarafının dışkı ile bulaşık olması, kılların canlılığını yitirmesi ve matlaşması ve dehidrasyon da ishale eşlik eden belirtilerdir. Klinik belirtiler ookistlerin alınmasından sonraki 3-5 günde belirgin olarak ortaya çıkmakta ve 4-18 gün kadar devam edebilmektedir (O’Handley ve ark. 1999, Thompson ve ark., 2005, Fayer 2008).

Şiddetli cryptosporidiosis olgularında aşırı dehidrasyon, metabolik asidozis ve ölüm görülebilmektedir. Ancak bu tip durumlara nadiren rastlanılmaktadır. Etçi buzağılarda cryptosporidiosis salgınlarına sütçü buzağılara göre daha az sıklıkla rastlanmakla beraber, cryptosporidiosis etçi buzağılarda daha şiddetli seyretmektedir. Etçi buzağılarda mortalite oranı daha yüksek olup %30 lara kadar varmaktadır. Sütçü buzağılarda klinik cryptosporidiosis olguları doğum sezonunda buzağuların sürüye girmesiyle daha çok ortaya çıkar. Neonatal diyareli olgularda, *Cryptosporidium* türleriyle beraber diğer enteropatojenler de görülebilmektedir. Ayrıca klinik belirtilerin görülmediği hayvanlarda da (buzağı gibi) *Cryptosporidium* ookistleri

saptanabilir. Cryptosporidiosisin şiddetli seyretmesinde, alınan ookist sayısı, sürü bağışıklığı, başka enfeksiyonların varlığı, besleme ve çiftlik yönetimi-idaresi etkili faktörlerdir. İyi bir çiftlik yönetimi; *C. parvum* enfeksiyonlarının ciddi sorunlar oluşturmasını engelleyebileceği gibi cryptosporidiosisin daha hafif geçmesini sağlamaktadır (O'Handley ve ark. 1999, Thompson ve ark., 2005).

Klinik belirtiler intestinal cryptosporidiosisde gözlenmektedir. Bu tip hastalıkta malabsorpsiyon (kötü emilim, bağırsakta emilimin iyi olmaması) ve sıvı sekresyonunda artış meydana gelmektedir. Bu olayda hem parazite hem de konağa ait faktörler etkili olmaktadır. *Cryptosporidium parvum* esas olarak ince barsak distal kısmına (ileum) yerleşmektedir. Ayrıca, ince barsak proksimal kısımları (jejunum, duodenum) ile sekum ve kolonda da görülebilirler. Enfeksiyon sonucunda patolojik olarak villus atrofisi, villuslarda birleşme, kript hiperplazisi, mikrovilluslarda bozulma, yangısal hücre infiltrasyonu şekillenir. Tüm bu değişiklikler bağırsak yüzey kısımlarında hasara, beslenme bozukluklarına, enzim kayıplarına ve elektrolit transportunda bozulmalara ve nihayet malabsorpsiyona neden olabilmektedir. Ayrıca parazitlerin salgıları ve toksinlerin bulunması da salgısal tip diyarenin gelişmesine neden olabilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar *Cryptosporidium* türlerinin apoptozise neden olabileceği iddia edilmekle beraber, barsak epitellerin dar birleşme yerlerinde yıkılaşmaya, barsak bariyer fonksiyonlarında kayıplara yol açabileceği de iddia edilmektedir. Bu patolojik olayların neticesinde *Cryptosporidium*'larla enfekte konaklarda malabsorpsiyon ve salgısal ishal (sekratoryal diyare) gelişmektedir (O'Handley ve ark. 1999, Thompson ve ark., 2005,).

*Cryptosporidium andersoni*'nin neden olduğu abomazal cryptosporidiosisde klinik belirtiler belirgin değildir ve patolojik lezyonlar sınırlıdır. Bu tip cryptosporidiosisde peptik ve pilorik bezler etkilenir ve bunun sonucunda ise mide mukozasında hipertrofi, gastrik bezlerde dilatasyon şekillenebilir. Bu tablo tip 2 ostertagiosis'e benzer yapıdadır. Abomazal PH ve plazma pepsinojen düzeyi yükselmektedir (Thompson ve ark., 2005, O'Handley ve ark. 2006).

## 1.6. Teşhis

Cryptosporidium enfeksiyonlarının diagnozunda boyasız preparatlar, boyama yöntemleri, immunolojik yöntemler ya da antijen tanı yöntemleri ve moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan rutin olarak boyama yöntemleri ve direkt floresan antikor testi (DFA) ile enzim immunoassay (EIA, ELISA) ve hızlı dipstick benzeri testler, parazitin prevalansını belirleme çalışmalarında tercih edilmektedir. Boyama yöntemlerine göre immunolojik metotların tanıda daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Ok ve ark. 1997, Geurden ve ark. 2008, Smith 2008, Uyar ve Taylan Özkan 2009).

### 1.6.1. Direkt Dışkı Muayenesi

Cryptosporidium tanısı için alınan dışkı örnekleri ookistler yönünden incelenmektedir. Bunun için dışkı örneği sulu ise direkt olarak yada 2 veya 3 katı kadar sulandırılarak, yumuşak yada katı kıvamda ise sulandırılarak iyice ezildikten sonra süzülerek santrifüj edilir ve dipteki sedimentten yaymalar hazırlanarak ya da sukroz flotasyon yöntemi ile flote edilerek incelenmektedir.

Dışkı örnekleri direkt olarak hemen inceleneceği zaman herhangi bir koruyucuya gerek olmaz. Ancak uzun süre saklanıp ve sonra incelenecekse %10 luk formalin, sodyum asetat-asetik asit formalin (SAF) ve polivinly alkol (PVA) fiksatifleri koruyucu olarak (prezervatif) kullanılmaktadır. Boyama metotlarının birçoğunda PVA pek tercih edilmemektedir. Ookist canlılığının uzun süre devamı için dışkı örneklerinin %2,5 luk potasyum dikromat eklenerek 4°C de saklanması önerilmektedir. Fakat moleküler analizler yapılacaksa formalinde saklanması tercih edilmelidir (Smith, 2008).

### 1.6.2. Boyama Yöntemleri

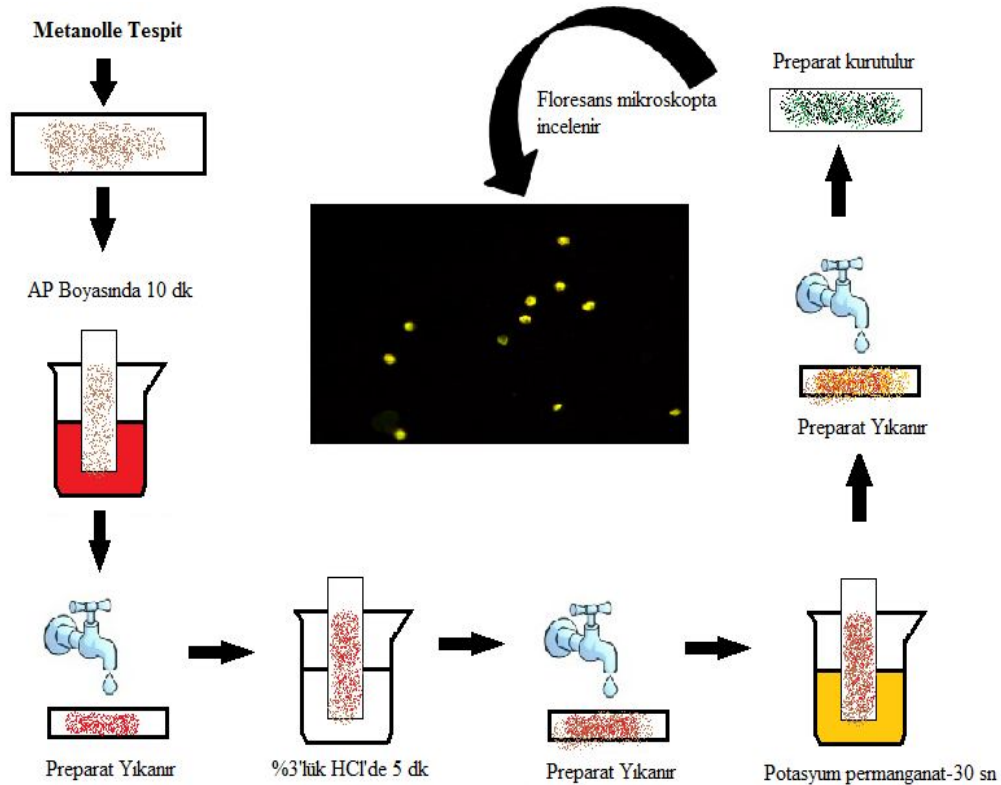
Cryptosporidium enfeksiyonlarının diagnozunda Karbol Fuksin, Auramin Fenol (AP), Modifiye Ziehl-Neelsen, Kinyoun Asit-fast, Modifiye Asit-fast (mAF) boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Boyama yöntemlerine göre immunolojik



metotların tanıda daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Geurden ve ark. 2008, Ok ve ark. 1997, Smith 2008, Uyar ve Taylan Özkan 2009). Boyama yöntemlerinde hazırlanan preparatlarda görülen *Cryptosporidium* ookistleri sayılarak, ookist atılım yoğunluğu ve hayvandaki enfeksiyon şiddeti belirlenmektedir (Burgu 1984, Castro-Hermida ve ark. 2002).

### 1.6.2.1. Auramine Phenol (AP, Auramin Fenol) Boyama Yöntemi

*Cryptosporidium* ookistlerinin saptanmasında kullanılan bir boyama yöntemidir. Hazırlanan dışkı yaymaları *Cryptosporidium* ookistleri yönünden floresans mikroskopta incelenir. Oldukça hızlı bir tekniktir. *Cryptosporidium* ookistleri siyah zemin üzerinde parlak yeşil floresans veren, yuvarlak, 3-7 mikron büyüklüğünde görülmektedir. AP ile boyanmış preparatlardaki ookistler daha sonra DNA ekstraksiyonu için kullanılabilirler (Smith, 2008).

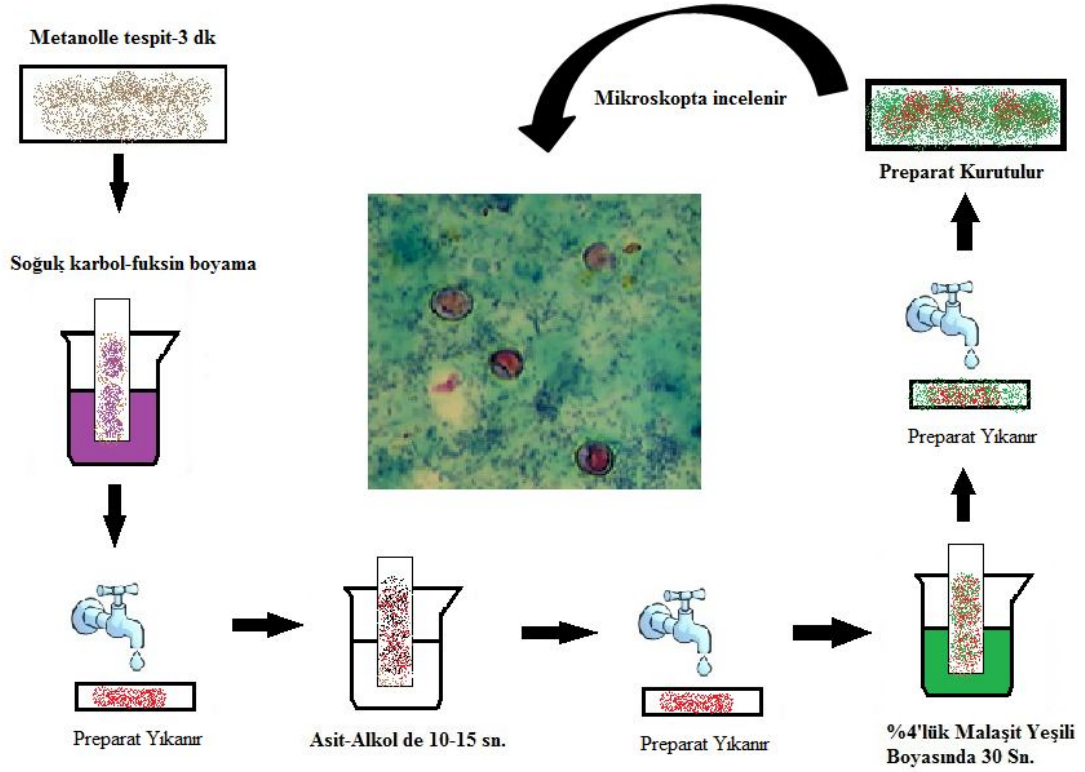


**Şekil 1.2:** Auramine Phenol Boyama Yönteminin Yapılışı (Çizim: Orijinal, Resim:

<http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/1149/resources/image/bp/2.html>)

### 1.6.2.2. Modifiye Ziehl-Neelsen (mZN) Boyama Yöntemi

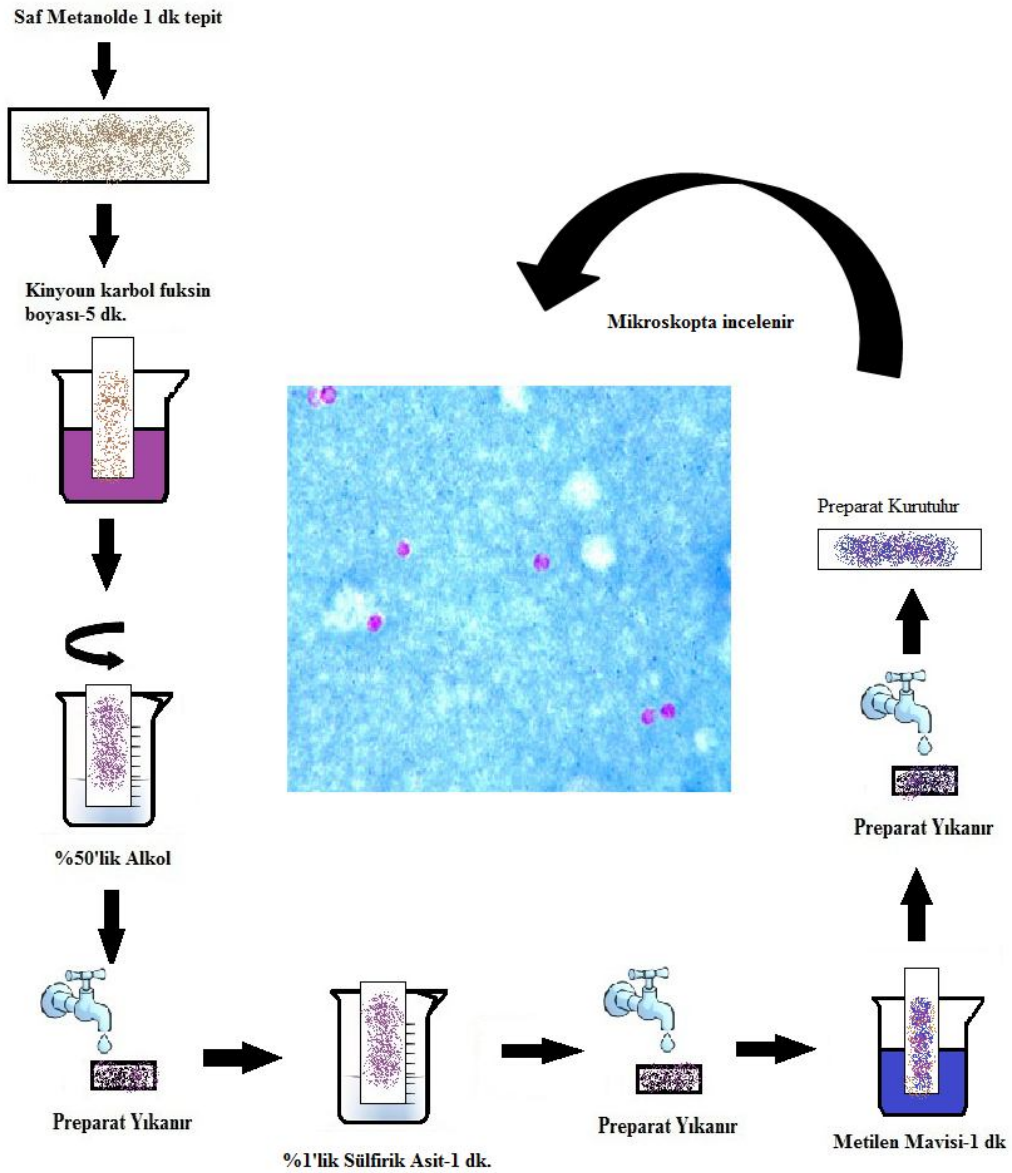
Dışkıda *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı yönünden yapılan bir boyama yöntemidir. Ookistler 20 lik objektifte görülebilir. Ookistler solgun yeşil zemin üzerinde kırmızı yapılarda görülmektedir. Boyanmış preparatlardaki ookistler daha sonra DNA ekstraksiyonu için kullanılabilirler (Smith, 2008).



**Şekil 1.3:** Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama Yönteminin Yapılışı (Çizim: Orijinal, Resim: <http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/ArticleStandard/Article/detail/509560>).

### 1.6.2.3. Kinyoun Asit-Fast Boyama Yöntemi

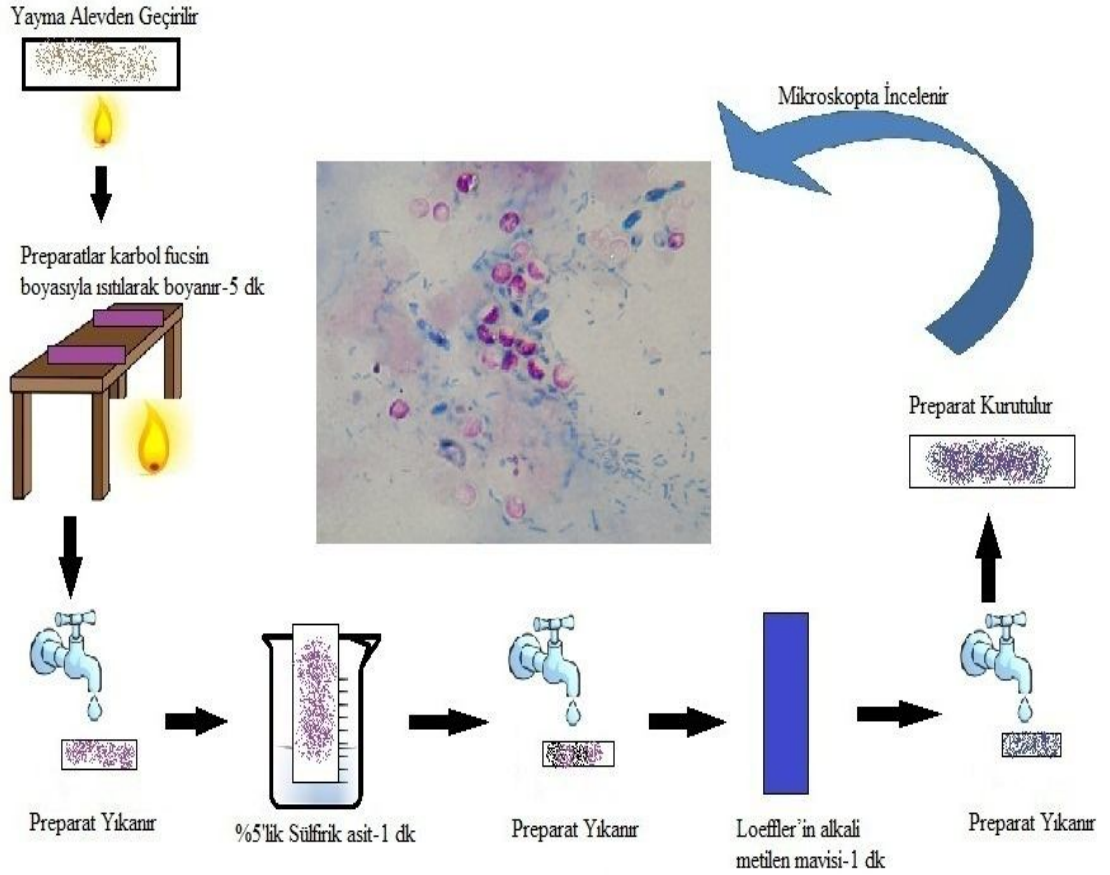
*Cryptosporidium* ookistleri mavi veya soluk kırmızı zeminde açık pembeden kırmızıya çalan renkte boyanmaktadır. Ookistler modifiye asit-fast boyasında olduğu gibi parlak kırmızı değildir. Ookistler dışkıda seyrek bulunduğu gözden kaçabilirler (Mıstık ve ark. 1992, Ok ve ark. 1997).



**Şekil 1.4:**Kinyoun Asit-Fast Boyama Yönteminin Yapılışı (Çizim: Orijinal, Resim: <http://www.tparazitolderg.org/text.php3?id=358>)

#### 1.6.2.4. Modifiye Asit-Fast Yöntemi

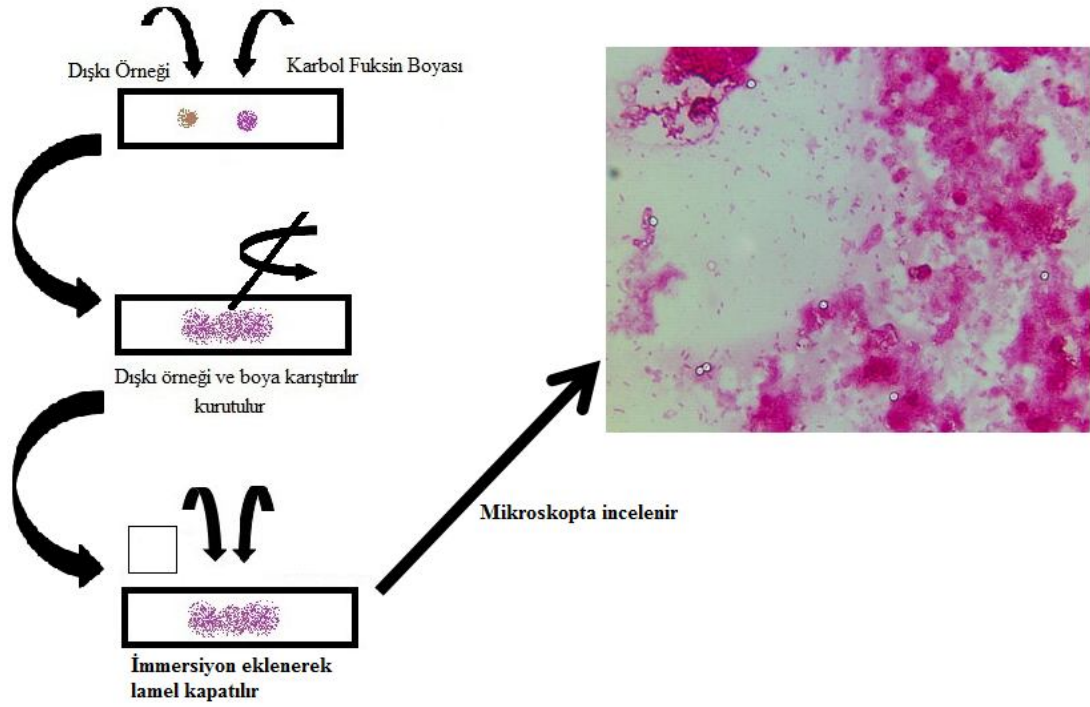
Cryptosporidium oökitleri, modifiye asit fast boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlarda yoğun kırmızı-pembe renge boyanır ve çoğunun içinde birden fazla sayıda siyah muntazam olmayan granüller görülmektedir. Oökitler mavi zemin üzerinde kolaylıkla fark edilmektedir. Mayaları maviye boyayan metilen mavisi karşıt boya olarak kullanılmaktadır (Ok ve ark. 1997)



**Şekil 1.5:** Modifiye Asit-Fast Boyama Yönteminin Yapılışı (Çizim: Orijinal, Resim: Orijinal)

#### 1.6.2.5. Karbol Fuksin Boyama Yöntemi

Bu yöntemde eter-alkol karışımında temizlenmiş dışkı örneği lam üzerine bir baget yardımı ile bir damla kadar alınır. Aynı miktar karbol-fuksin dışkı örneğinin yanına konularak bir lamelin köşesi yardımı ile karıştırıldıktan sonra ince bir dışkı frotisi hazırlanır. Hazırlanan froti 1-2 dakika kuruması için bekletilir. Kuruyan froti üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılır ve lamelle kapatılarak 40x10 büyütmede incelenir. Mikroskobun bu büyütmesinde 20 sahadaki ookist sayılarak ortalaması alınır. Boyama sonunda ookistler kırmızı zemin üzerinde şiddetli ışık kırıcı özellikte, şeffaf, parlak, düzgün duvarlı ve oval yapıda gözlenirler. Karbol fuksin boyama yönteminde x40'luk objektifte mikrometre ile ayar yapılarak ookistler içinde sporozoitler görülebilir (Burgu 1984, Özlem ve ark. 1997).



**Şekil 1.6:** Karbol-Fuksin Boyama Yönteminin Yapılışı (Resim: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307000123>)

### 1.6.3. İmmunolojik Yöntemler

İmmunolojik tanı yöntemleri parazitolojide yaklaşık 30 yıl kadar önce kullanılmaya başlanmıştır. *Cryptosporidium* türlerinin dışkıda immunolojik olarak araştırılmasında, Direct Immunofloresans Assay (DFA), İndirekt Floresan Antikor Assay (IFA) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve hızlı tanı testleri geliştirilmiştir (Özcel ve ark 1997, Carey ve ark. 2004, Doğruman-Al F, 2011). Bu testlerin kısa sürede çok sayıda örneğin çalışılabilmesi, değerlendirme yapılmasında deneyim gerektirmemesi gibi avantajları laboratuvarlarda tercih edilmesine neden olmuştur (Doğruman-Al F, 2011). Bu immünolojik teknikler boyama yöntemlerinden daha duyarlılardır (Starling ve Arrowood 1993).

#### 1.6.3.1. Direkt İmmunofloresans Antikor Testi

Direkt immunofloresans testi (DFA), *Cryptosporidium* türlerinin yüzey antijenlerini tanıyan floresan işaretli monoklonal antikor içermektedir. Bu test

modifiye asit-fast boyama yöntemlerine göre daha yüksek duyarlılık (%99) ve özgüllüğe (%100) sahip olması sayesinde günümüzde referans test olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem aynı zamanda SAF solüsyonu içinde saklanılan dışkı örneklerine de uygulanabilmektedir (Doğruman-Al F, 2011)

### **1.6.3.2. İndirekt Floresan Antikor Test**

Immunolojik yöntemlerden olan IFA testi, monoklonal antikor kullanılarak yapılmaktadır ve özgüllüğü oldukça yüksektir. Aside dirençli boyama tekniklerinden daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Emre ve Fidancı 1997). IFA yönteminde ookistlerin antijenik yapıları floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlara bağlanarak ookistler siyah zemin üzerinde yeşil renkte görülürler. IFA tekniği ile az sayıda ookist içeren dışkı örnekleri bile saptanabilmesi ve dolayısıyla hastalığa erken dönemde tanı konulması ve asemptomatik taşıyıcıların belirlenmesini sağlamaktadır. Pahalı bir teknik olması ve uygulama için floresans mikroskoba ihtiyaç duyulması ise testin dezavantajlarından (Carey ve ark. 2004).

### **1.6.3.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Enzimli İmmun Test veya Enzyme Immun Assay (EIA) olarak ta adlandırılan ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi, antijen antikor reaksiyonlarını göstermek için enzimlerin kullanıldığı serolojik bir tanı yöntemidir. Yüksek duyarlılık, kolay uygulama, kullanılan reaktiflerin uzun süre saklanabilmesi, çok sayıda numunenin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak değerlendirilebilmesi gibi avantajlara sahip olması nedeniyle parazitolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Zeyrek ve Dirim Erdoğan 2011).

Bu yöntemin esası; oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli, antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen var ise renk oluşumunun gözlenmesidir. Buradaki renk oluşumu, kimyasal bir olaydır ve enzimin aktivitesine bağlıdır (Ak 1997).

Dışkıda kopro antijenlerin aranması yöntemi de renk oluşumuna dayanan bir yöntemdir. Bu amaçla rapid testler ya da EIA teknikleri kullanılmaktadır.

Monoklonal antikor emdirilmiş ELISA mikropalaklarına Şüpheli dıŐkđ örneği konularak renk oluşumuna göre teşhis edilmektedir.

DıŐkđda Cryptosporidium ookistlerinin tespitinde kullanılabilecek uygun bir cihaza gereksinim duyulması ve pahalı olması ELISA'nın kullanımını sınırlamaktadır (Kehl ve ark. 1995).

#### **1.6.4. Moleküler Biyolojik Yöntemler**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR, PCR) Cryptosporidium ookistlerinin tanısı için Laxer ve ark. tarafından ilk defa 1990 yılında kullanılmıştır (Laxer ve ark. 1990). Moleküler yöntemler tür/genotip ve subtiplendirme düzeyinde farklı Cryptosporidium türlerini ayırt etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemler genellikle insan ve hayvanlardaki Cryptosporidium türlerini karakterize etmek için kullanılmaktadır (Xiao 2010). PCR çok hızlı olmasına rağmen çok hassastır. Cansız mikroorganizmalar, laboratuvar kontaminasyonu, çıplak nükleik asitlerden kaynaklanan yanlış pozitifler ortaya çıkabilmektedir (Fayer ve ark. 2000)

#### **1.7. Tedavi**

Evcil hayvanlar için cryptosporidiosis enfeksiyonuna karşı bir tedavi Őimdilerde mevcut değildir. Hastalık sıklıkla genç buzağılarda 2 hafta süresince kendini sınırlamaktadır (Thompson ve ark. 2003). Cryptosporidiosisin tedavisinde çeşitli kimyasal maddeler (çeşitli antiprotozoal bileŐikler, geniş spektrumlu antibiyotikler) kullanılmaktadır (Sears ve Kirkpatrick 2001, Xiao ve ark. 2004). Paramomycin, halofugione lactate, lasalocid gibi ilaçlar kuzu ve buzağılarda umut verici olduğu saptanmıştır. Buzağılarda cryptosporidiosisin tedavisinde, sıvı tedavisi ve asit-baz dengesini düzenleme yoluyla tedavi edilebilmektedir (Thompson ve ark. 2003). Elektrolit tedavisiden özellikle normal immuniteye sahip hastalarda çok iyi sonuç alınmaktadır (Sears ve Kirkpatrick 2001, Fahey 2003). Anti-Cryptosporidium antikorları içeren kolostrum da faydalı olabilmektedir (Thompson ve ark. 2003).

## 1.8. Korunma ve Kontrol

Evcil ve yabani hayvanlarda *Cryptosporidium*'un birçok türü ve genotipleri enfeksiyona neden olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar klinik seyirli ya da subklinik seyirli olabilmektedir. Enfeksiyonlar beslenme bozukluğu, kilo kaybı ve ölümlerle sonuçlanabileceğinden ekonomik olarak önemlidirler (Thompson ve ark.2003).

İnsanlarda cryptosporidiosisin salgın halde görülmesinde ruminantlar ve özelliklede sığırlar önemli rol oynar. Bu hastalığa neden olan türlerden *C. parvum* türü ana zoonotik tür olup, insan olgularında kişilerin çiftlik ziyaretleri ya da buzağılarla direkt teması sonucu rastlanılmaktadır. *Cryptosporidium* türlerinin bulaşmasında genç ruminantlar ve özellikle neonatal dönemdeki hayvanlar risk faktörü olarak rol oynamaktadırlar. Çünkü *C. parvum* enfeksiyonlarına 30 günlükten büyük hayvanlarda nadiren rastlanmakta ve yaşlı hayvanlarda atılan ookist sayısı da düşmektedir. Ayrıca yaşlı hayvanlarda *C. andersoni* ve *C. bovis* türleri daha yaygın olarak görülmektedir (O'Handley ve ark. 1999).

Yetiştirme tipi (kapalı veya yarı açık) iklim, hayvanların merada olup olmaması, yaşlılarla bir arada bulunma, altlık durumu, su içme düzeni, su içme şekli, altlık temizleme biçimi ve sıklığı, hayvan sayısı, farklı yaş gruplarındaki hayvanların aynı bölmelerde bulunması gibi çeşitli faktörler cryptosporidiosisin yayılışında etkili faktörler olarak sayılabilir. Bunun için hijyen, güvenli su ve yetiştirme tiplerine dikkat edilmelidir (Thompson ve ark. 2005, O'Handley ve Olson 2006, Nichols 2008,).

Ookistlerin uzun süre dış ortamda canlı kalmaları ve bir çok dezenfektana karşı dirençli olmaları, az sayıda ookistin enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olması, bazı genotipler için hayvanların rezervuar olmaları ve konağın bağışıklık sisteminin baskılanmış olması cryptosporidiosisin yayılmasında etkili olduğu için önlemler alınmalıdır (Truong ve Ferrari 2006, Fayer 2008).

Ookistler atıldığı andan itibaren enfektif oldukları için bulaşım kaynaklarının önüne geçilmelidir. Önlem olarak; hayvanlar tek tek barındırılmalı, ahırda yeterli havalandırma bulunmalı, ahır ve kullanılan malzemeler sıcak suyla sık sık yıkanmalı, her hayvan için ayrı ayrı su kovası kullanılmalı, altlık sık değiştirilmeli, buzağılar anneleri ile bir arada barındırılmamalı, yemlik ve samanlıkların dışkı ile bulaşmasına



engel olunmalıdır. Hasta hayvanlar, bulaşmayı önlemek için ayrı yerde barındırılmalıdır (Thompson ve ark. 2005).

## **1.9. Buzağılarda Cryptosporidiosis Enfeksiyonlarının Dünyadaki Durumu**

### **Modifiye Asit-Fast Boyama ile Yaygınlığı**

Dünya’da buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaygınlığı, hangi türlerin bulunduğu, zoonotik önemi ve bu hastalığın yayılışında etkili olan risk faktörlerinin durumu ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır (Santin ve Trout 2008). İsveç’te asit fast boyama ile üç aylağa kadar olan ishallerli buzağılarda %11, sağlıklı buzağılarda %5 (Björkman ve ark. 2003), Almanya’da 3-15 günlük neonatal buzağılarda asit fast boyama ile %36 (Broglia ve ark. 2008) oranında pozitiflik saptanmıştır.

### **ELISA Metodu ile Yaygınlığı**

İspanya’da 1-30 günlük ishallerli buzağılarda ELISA yöntemi ile %40,7 (de la Fuente ve ark. 1999) oranlarında *Cryptosporidium* prevalansı bildirilmiştir. Fransa’da anti-*Cryptosporidium* monoklonal antikorları kullanılan ticari ELISA kiti ile yapılan araştırmada, *Cryptosporidium* enfeksiyonları büyük çoğunluğu (%90,5) ishallerli olan 4-21 günlük buzağılarda %43,4 oranında, ishal olguları düşük olan (%5,3) 4-12 günlük buzağılarda %17,9 olarak tespit etmişlerdir. Çiftliklerin ise %55,6’sında pozitiflik saptamışlardır (Lefay ve ark. 2000).

Zambia’da ELISA tekniği ile dışkıda antijen aranarak yapılan çalışmada, üç aylağa kadar olan buzağılarda *Cryptosporidium* yaygınlığı %19,2 olup, sütçü, etçi ve ticari işletmelerdeki prevalansı ise sırası ile %42,8, %8 ve %6,3 olarak bulunmuştur (Geurden ve ark. 2006).

## 1.10. Buzağlarda Cryptosporidiosis Enfeksiyonlarının Türkiye'deki Durumu

### Modifiye Asit-Fast Boyama ile Yaygınlığı

Cryptosporidium'ların yaygınlığı mAF boyama yöntemiyle, Sivas yöresindeki normal dışkılu buzağlarda mAF boyama yöntemi ile yapılan araştırmada %8-62,4 arasında değişmekte (Değerli ve ark. 2005, Mamak ve ark. 2000), Van yöresindeki buzağlarda %13,2 oranında (Gül ve ark. 2008), aynı metotla Erzurum yöresinde yapılan araştırmada ise ishallerli buzağlarda %30,3 iken sağlıklı buzağlarda %10 olarak saptanmıştır (Sarı ve ark. 2008). Türkiye genelinde mAF boyama yöntemiyle yapılan incelemeler ele alındığında Kars yöresindeki cryptosporidiosis varlığının yine büyük oranda düştüğü tespit edilmiştir.

### ELISA Metodu ile Yaygınlığı

Sevinç ve ark. (2003), ELISA metodu ile Konya yöresindeki buzağlarda Cryptosporidium prevalansının %27,3 olduğunu, bu oranın ishallerli olanlarda %63,9, sağlıklılarda ise %9,8 oranında saptandığını ve mAF boyama yöntemi ile genel prevalansın daha düşük (%20,7) bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca boyama yöntemlerine göre dışkıda *C.parvum* koproantijenlerinin saptandığı ELISA metodunun daha duyarlı olduğu, pozitiflik oranının mAF boyama ile %2,97 bulunduğu halde ELISA ile bundan daha yüksek (%9,13) gözlemlendiği kaydedilmiştir (Sevinç ve ark. 2003). Kars yöresinde yapılan bu çalışmada ise ELISA metoduyla Cryptosporidium' un genel prevalansını %5,1 oranında, mAF boyama yöntemiyle ise %3,8 olarak tespit edilmiştir. Genel yaygınlık ELISA metoduyla daha yüksek iken mAF boyama yöntemiyle daha düşük olduğu saptanmış ve Cryptosporidium koproantijenlerinin saptandığı ELISA metoduyla %5,1 pozitiflik bulunurken mAF boyama yönteminin daha düşük (%3,1) olduğu ve ELISA metodunun daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Özcelik ve ark. (2012) Sivas yöresinde ELISA yöntemiyle yaptıkları çalışmada 68 buzağının %5,8'inde *Cryptosporidium spp.* yönünden pozitiflik saptamışlardır. Bu çalışmayla Kars yöresinde ELISA metoduyla tespit edilen pozitiflik oranı (%5,1) birbiriyle örtüşmektedir.

Kars yöresinde bugüne kadar sadece üç aylığa kadar olan ishallerde buzağılarda araştırma yapılmış ve sadece mAF boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* oocistleri incelenmiş ve cins/soy düzeyinde tanı konulmuştur. Normal dışkı olan buzağılarda oldukça sınırlı inceleme olmuştur. Serolojik tanıya yönelik hiçbir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmada, buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının prevalansını belirlemek için iki farklı yöntem olan mAF boyama ve ELISA metodu kullanılmıştır. *Cryptosporidium*'ların tanısında duyarlılığı boyama yöntemlerine göre daha yüksek olduğu bildirilen immunolojik tekniklerden olan ELISA metodu ile elde edilen sonuçlar, mAF boyama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile altı aylığa kadar ishallerde ya da sağlıklı buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının prevalansı saptanmış ve buzağuların yaşı ile klinik durum gibi risk faktörlerinin bu prevalanstaki etkileri belirlenmiştir.

Bu noktadan hareketle; Kars yöresinde çiftlik veya köy koşullarında, sütçü işletmelerde bulunan buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının prevalansı modifiye Asit Fast (mAF) boyama ve Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Kars ve çevresinde bulunan modern çiftlik ve yöresel ahır tipi yetiştirmelerde altı aylığa kadar olan buzağılarda; *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaygınlığı ve bulaşmasında etkili olan;

-Buzağuların yaşı (3 aylığa kadar, 3-6 aylık),

-Buzağuların klinik durumu (ishallerde veya sağlıklı/normal dışkı olması)

gibi temel risk faktörleri dikkate alınarak her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Ayrıca mAF boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlarda *Cryptosporidium* oocist yoğunluğu yönünden değerlendirme (+, ++, +++) yapılmıştır. Bu değerlendirme ile farklı yaş gruplarında, ishallerde ve sağlıklı buzağılarda oocist atılımı tespit edilmiştir. Yine bu oocist yoğunluğuna göre enfeksiyonun şiddeti (hafif, orta ve şiddetli enfeksiyon) ortaya konulmuştur.

ELISA testinde *C. parvum* türüne ait koproantijen kiti kullanılarak yapılan bu çalışma ile buzaşlarda cryptosporidiosis etkenlerinden en yaygın tür olarak görülen *C. parvum*'un prevalansı saptanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmanın yürütüleceği hayvanlar, Kars ve çevresindeki modern çiftlik ve köy ahırlarındaki sığır işletmelerinde bulunan buzağılardan oluşmuştur. Yöredeki sığır yetiştirme tarzı sütçü işletme tarzında olduğundan her işletmede buzağı bulunmaktadır.

#### 2.1.2. Dışkı Örnekleri

Araştırma materyalini oluşturan dışkı örnekleri; Mart-Haziran 2011 doğum sezonunda Kars ili merkez köyleri ve çiftlikler olmak üzere 22 odadaki (Kümbetli, Büyük Aküzüm Kars-Merkez, Boğazköy, Ağadeve, Esenyazı, Kocabahçe, Çağlayan, Cumhuriyet, Başgedikler, Dikme, Karakaş, Esenkent, Halefoğlu, Söğütlü, Oğuzlu, Büyük Boğatepe, Ataköy, Azat köyleri, KAÜ Veteriner Fakültesi Çiftliği, Nadiroğlu Çiftliği ve ishal vakalı kliniklere gelen hastalar) buzağuların rektumlarından alınmıştır. Buzağular 3-90 günlük (3 aylağa kadar) ve 91-180 günlük (3 aylıktan büyük) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışma materyali 313 dışkı örneğinden (146'sı ishali, 167'si sağlıklı) oluşmuştur. Buzağuların 253'ü 3 aylağa kadar, 60'ı ise 3 aylıktan büyük buzağılardan oluşmuştur. Çalışmada kullanılan dışkı örnekleri Tablo 2.1.'deki gibi gruplandırılmıştır.

**Tablo 2.1.** Çalışmada Kullanılan Dışkı Örneklerinin Gruplandırılması

< 3 aylık		3-6 aylık	
İshali	Sağlıklı	İshali	Sağlıklı
138	115	8	52
253		60	

Çalışma için alınan dışkı örneklerinin tümü modifiye asit-fast (mAF) boyama yöntemiyle incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Her dışkı örneği ELISA testinde kullanılmak üzere +4 C° de saklanmıştır.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. Modifiye Asit-Fast (mAF) Boyama Metodu**

İshalli olan dışkı örnekleri direkt olarak, normal kıvamlı olanlar ise sulandırılarak ezildikten sonra 15 ml'lik santrifüj tüplerine 5-10 ml alınarak üzerine su eklenerek santrifüj sedimentasyon yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst kısım atılmış ve dipteki pellet karıştırılarak bu kısımdan yayma preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dışkı yayma preparatları modifiye asit fast (mAF) boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta 40'lık objektifte incelenmiştir. (Ok ve ark. 1997).

Boyama yöntemi için bazik fuksin, % 95 etil alkol, fenol kristalleri, konsantre sülfürik asit, metilen mavisi, potasyum hidroksit (% 10 ve % 0.01 sulu solüsyonları) ve % 10 formol kullanılmıştır.

#### **2.2.1.1. Hazırlanan Solüsyonlar**

##### **Karbol fuksin boyası**

a) Boyayı ezmek için havan ve havaneli kullanarak 3.15 gr fuksin 100 ml % 95 etil alkol içinde eritilmiştir (bazik fuksin topaklaşmışsa alkolü eklemeyen havaneli yardımı ile iyice toz hale getirilmelidir. Daha sonra alkol damla damla eklenmiş ve iyice ezilmiştir).

b) Fenol kristalleri 56 °C'lık su banyosunda eritildi ve 45 ml erimiş fenol kristaline toplam hacim 900 ml oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir.

c) Fuksin alkol karışımı fenol solüsyonuyla karıştırılmış 1-2 gün bekletilmiş ve solüsyon süzülerek kullanılmıştır.

### **%5 Aköz sülfürik asit (dekolorizan ajan)**

Sülfürik asitten 5 ml dikkatli ve yavaş bir şekilde 95 ml distile suya eklenerek hazırlanmıştır.

### **Loeffler'in alkali metilen mavisi (karşıt boya)**

Metilen mavisinden 0.3 gr 30 ml etil alkolde eritilmiş ve 100 ml % 0.01 potasyum hidroksit solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır (Ok ve ark. 1997).

#### **2.2.1.2. Boyama Yöntemi**

1. Yaymalar havada kurutulmuş ve lamlar alevden yavaşça geçirilerek fikse edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır.
2. Lamlar boyama sehпасı üzerine yere paralel gelecek biçimde yerleştirilmiş ve üzerlerine lamları tam kaplayacak biçimde karbol-fuksin boyası dökülmüştür.
3. Elli santimetre kadar uzunluktaki bir kalın tel çubuğun ucuna pamuk sarılmış, alkolle ıslatıldıktan sonra yakılarak, lamların altında gezdirilmiştir.
4. Lamlar kurumaya başladığı zaman üzerlerine boya eklenmiştir. Isıtma işlemi 5 dakika sürdürülmüştür. Boyanın kaynamamasına özen gösterilmiştir.
5. Lamlar soğuduktan sonra fazla boya dökülerek hafif akan çeşme suyunda yıkanmıştır.
6. Lam dekolorizasyon ajan olarak % 5'lik sulu sülfürik asit içeren şaleye batırılıp 1 dk tutulmuştur.
7. Şaleden çıkarılan lamlar hafif akan çeşme suyunda yıkanmış ve tekrar boyama sehпасı üzerine dizilmiştir.
8. Lamların üzerine Loeffler'in alkali metilen mavisi dökülüp (preparatın üzerini tam kaplayacak şekilde) 1 dk beklenmiş, daha sonra lamlar musluk suyunda yıkanıp kurutulmuştur.
9. Boyanarak hazırlanan preparatlar mikroskopta 40'luk objektifte incelenmiştir (şüpheli durumlarda immersiyon objektifte de incelenmiştir).

Mikroskopik olarak X40'lık büyütmede 10 farklı sahadaki ookist sayısı dikkate alınarak ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti belirlenmiştir. Ookist yoğunluğunun değerlendirilmesi ve preparatlardaki ookist sayılarına göre enfeksiyon şiddetinin yorumlanmasında daha önce yapılan laboratuvar çalışmaları ve diğer ilgili literatürlerden (Burgu 1984, Castro-Hermida ve ark. 2002, Çitil ve ark. 2004, Sarı ve ark. 2008) modifiye edilerek hazırlanan Tablo 2.2' deki kriterler dikkate alınmıştır.

**Tablo 2.2.** Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti kriterleri.

Ookist Sayısı	Ookist yoğunluğu	Enfeksiyon şiddeti
Ookist yok	-	-
1-10 ookist	+	Hafif
11-25 ookist	++	Orta
>25 ookist	+++	Şiddetli

### 2.2.2. ELISA Metodu (Enzim Linked Immunosorbent Assay)

Örneklerin değerlendirilmesinde önce mAF boyama yöntemi ile incelenmiş olan örneklerden 222'si *Cryptosporidium parvum* ELISA kiti (Bio-X Diagnostics, Veterinary, cattle ) ile 91'i ise *Cryptosporidium* ELISA kiti (Diagnostic Automation, Inc., USA, Veterinary cattle ) ile üretici firmanın önerdiği biçimde *Cryptosporidium* koproantijenleri yönünden incelenmiştir. Yani ELISA metodu ile *Cryptosporidium* koproantijeni aranan toplam 313 dışkı örneğinin 222'sinde *Cryptosporidium parvum* tür düzeyinde ve 91'i ise *Cryptosporidium* cins düzeyinde belirlenmiştir.

Hazırlanan mikroyağlar ELISA okuyucusunda (Spectramax 384 plus) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur.



### 2.2.2.1. *Cryptosporidium parvum* ELISA kiti

#### 2.2.2.1.1. Testin Prensibi

*Cryptosporidium parvum* ookistleri için spesifik antikorlar tarafından sensitive edilmiş 96 kuyucuklu mikropletleri kullanılan bir testtir. Bu antikorlar dışkı örneklerinde mevcut olan patojenlerin spesifik yakalanmasına müsaade etmektedir. A, C, E ve G sıraları bu antikorlarla kaplanmıştır ve B, D, F ve H sıraları spesifik olmayan antikorları (kontrol kuyuları) içermektedir. Bu kontrol sıraları spesifik immunolojik reaksiyon ile non-spesifik bağlanmaları ayırt etmeyi sağlamaktadır. Böylece, yanlış pozitiflerin büyük bir çoğunluğu elimine edilir.

#### 2.2.2.1.2. Kitin İçeriği:

**Mikroplates- (ELISA Plakları):** 2 adet 96 kuyucuklu plak içermektedir. Bu plakların A C E G sıraları anti-crypto spesifik antikorlarla kaplanmış iken B D F H sıralarındaki kuyucuklar non-spesifik antikorlarla kaplanmıştır. Bu sıradaki kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanılacaktır.

**Washing Solition – (Yıkama Solüsyonu):** Her kit 1 adet 100 ml'lik 20 kat konsantre yıkama solüsyonu içermektedir. Solüsyonu 1:20 oranında distile ya da deiyonize suyla sulandırılmalıdır. Dilue edilmiş solüsyonu +2 ile +8 C° arasında saklayınız.

**Dilution Buffer- (Dilüsyon Solüsyonu):** Her kitle örnekleri dilue etmek için bir 50 ml'lik 5 kat konsantre buffer gelmektedir. Bu konsantre solüsyonu 1:5 oranında distile veya deiyonize suyla dilue edilmelidir. Dilue edilmiş solüsyonu +2 ile +8 C° arasında saklanmalıdır.

**Conjugat- (konjugat):** Bu kitle 1 adet 25 ml'lik şişe içinde anti-crypto peroksidaz konjugatı (horse-radish peroksidaz ile işaretli anti-crypto monoclonal antikoru) gelmektedir. Bu solüsyon kullanıma hazırdır.

**Pozitif kontrol:** 4 ml'lik solüsyon kullanıma hazırdır.

**TMB- (Substrat):** 25 ml'lik tetramethylbenzidine kromojen solüsyonu kullanıma hazırdır.

**Stopping Solition- (Durdurma Solüsyonu):** Bir adet 15 ml'lik şişe içinde 1M fosforik asit stop solüsyonu.

Kitin içeriği Şekil 2.1.'de gösterilmiştir



**Şekil 2.1:** *Cryptosporidium parvum* ELISA kiti

#### 2.2.2.1.3. Örneğin Hazırlanması

2,5 ml'lik godeler içinde 1-1 oranında dilüsyon buffer ile sulandırılan dışkı örnekleri yaklaşık 10 dakika dik durumda bekletildi ve tortu oynatılmadan üst kısımdan numune kuyucuklara koyulmak üzere alındı.

#### 2.2.2.1.4. Prosedür

- 1- Tüm malzemeleri (solüsyonlar + plate) kullanmadan en az yarım saat önce oda ısısına (+21 C°, +- 3 C°) çıkartılmıştır.
- 2- Yıkama solüsyonunu 20 kat distile su ile seyreltildi. Dilüsyon solüsyonu ise 5 kat distile su ile seyreltildi.

- 3- Dışkı örnekleri 1'e 1 oranında hazırlanan Dilüsyon buffer ile sulandırıldı ve dilue edilmiş örnekler her bir göze 100 mikrolitre aşağıda tarif edildiği şekilde konuldu;
  - ✓ 1.örnek A<sub>1</sub> ve B<sub>1</sub> gözlerine; yani 1 numaralı örnekten önce 100 mikrolitre bir pipet yardımıyla alınıp önce A<sub>1</sub> gözüne konuldu. Sonra aynı örnekten dipteki tortu oynatılmaksızın tekrar 100 mikrolitre çekilerek B<sub>1</sub> gözüne konuldu.
  - ✓ Sonra pipet ucu değiştirilip 2.örnekten alındı. Yukarıdaki gibi 2. Örnekte C<sub>1</sub> ve D<sub>1</sub> gözlerine konuldu. Bu işlem tüm örnekler bitene kadar sırayla yapıldı.
  - ✓ Aynı şekilde hazır olarak sunulan pozitif kontrol örneği hafifçe çalkalandıktan sonra 100 mikrolitre sıradaki gözlere konuldu.
- 4- Numuneler plakaya konulduktan sonra plakanın üstü alüminyum folyo ile kapatılarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- 5- İnkübasyondan sonra plaka daha önce (2 numaralı aşamada açıklandığı gibi) hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6- Kullanıma hazır konjugat her göze 100 mikrolitre olacak şekilde tüm gözlere eklendi ve yine plakanın kapağı kapatılarak oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
- 7- Plaka tekrar yıkandı.
- 8- Plakadaki her bir göze 100 mikrolitre kullanıma hazır olarak sunulan kromojen (substrat) solüsyonundan eklendi. Plaka, substrat eklendikten sonra oda ısısında 10 dakika karanlık bir ortamda inkübe edildi.
- 9- Her göze 50 mikrolitre kullanıma hazır stop solüsyonu eklendi.
- 10- Renk değişimi 450 nm filtre kullanarak ELISA okuyucusunda okutuldu.

#### **2.2.2.1.5. Sonuçların Değerlendirilmesi:**

Her bir örnek için net OD değerini, pozitif kuyucuktaki (A<sub>1</sub> mesela) OD değerinden onun eşi olan negatif kuyucuktaki (örneğin B<sub>1</sub>) OD değerinin çıkarılmasıyla hesaplanmaktadır. (A<sub>1</sub>'de ki OD- B<sub>1</sub>'de ki OD = örneğin net OD okuma değeri). Bu test yalnızca 10 dakikalık bir kromojen karbasyonundan sonra pozitif kontrol antijeni ile elde edilen OD 'nin veri sayfasında (1 numaralı değer=0,895) verilen değerden büyük olması halinde geçerli kabul edilir. Daha sonra her bir örnek için elde edilen NET OD değerleri aynı plakada yürütülen NET pozitif

kontrol antijen OD değerine bölünür ve 100 ile çarpılarak yüzde pozitivite hesaplanır.

[% pozitifite = NET OD (örnek)/NET OD (pozitif kontrol)\*100]

Daha sonra %8,38'in üzerindeki pozitif olan örnekler (+), diğerleri (-) olarak belirlenir.

## 2.2.2.2. *Cryptosporidium spp.* ELISA kiti

### 2.2.2.2.1. Testin Prensibi

Bu kit, anti-Cryptosporidium poliklonal antikorları kullanılarak sandwich ELISA tekniğine göre hazırlanmış olup dışkı süpernatandan antijen yakalama özelliğine sahiptir.

### 2.2.2.2.2. Kitin İçeriği:

- Test strips:** Kuyucukları anti-Cryptosporidium antikorları içeren 96 kuyucuklu ELISA plağı
- Enzyme Conjugate:** Thimerosal ile anti-Cryptosporidium antikoruna etiketli peroksidaz içeren 11 ml'lik 1 şişedir.
- Pozitif Kontrol:** 2 ml'lik şişede kullanıma hazırdır.
- Negatif Kontrol:** 2 ml'lik şişede kullanıma hazırdır.
- Kromojen:** Chromogen tetramethylbenzidine (TMB) içeren 11 ml'lik şişe kullanıma hazırdır.
- Yıkama Solüsyonu:** 25 ml'lik 2 şişe.
- Dilüsyon Solüsyonu:** 30 ml'lik 4 şişe.
- Durdurma solution:** 1 molar phosphoric asid içeren 11 ml'lik şişede kullanıma hazırdır.

Kitin içeriği Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2.: *Cryptosporidium sp.* ELISA kiti

#### 2.2.2.2.3. Örneklerin Hazırlanması

Her örnek 2,5 ml'lik godeler içinde (ishalli örnekler direkt, katı kıvamlı örnekler sulandırılarak) alındı ve yaklaşık 10 dakika dik durumda bekletildikten sonra supernatant kısmı testte kullanılmak için alındı.

#### 2.2.2.2.4. Prosedür

- 1- İstenilen sayıda kuyucuk hazırlandı (pozitif ve negatif kuyucuklar için fazladan iki kuyucuk) ve plağa yerleştirildi.
- 2- Mikropipetle 1. kuyucuğa 100 µl negatif kontrol, 2.kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol eklendi.
- 3- Kontrol kuyucukları hariç her kuyucuğa 50 µl dilüsyon buffer eklendi.
- 4- Dilüsyon buffer eklenmiş her kuyucuğa sulandırılarak santrifüj edilen dışkı örneklerinin supernatant kısmından 50 µl eklendi.
- 5- Oda ısısında (15-25 °C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra yıkama solüsyonu kuyucuklara eklenerek yıkandı.
- 6- Her kuyucuğa 2 damla Enzim Konjugat eklendi.

- 7- Oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra yıkama solüsyonu kuyucuklara eklenerek yıkandı.
- 8- Her kuyucuğa 2 damla Kromojen eklendi
- 9- Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 10- Her kuyucuğa 2 damla stop solüsyonu eklendi.
- 11- Sonuçlar ELISA okuyucusunda 450 nm'de okutuldu.

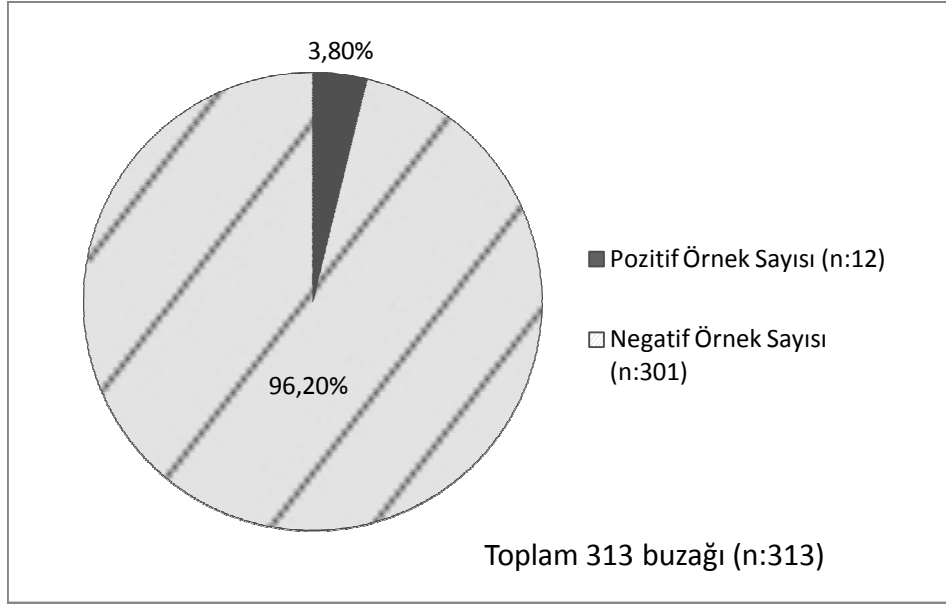
#### **2.2.2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi**

Sonuçların değerlendirilmesi, çalışma kılavuzuna uygun olarak, absorbans değeri 0.15 OD ve üzeri olanlar pozitif, altında olanlar ise negatif olarak belirlendi

### 3. BULGULAR

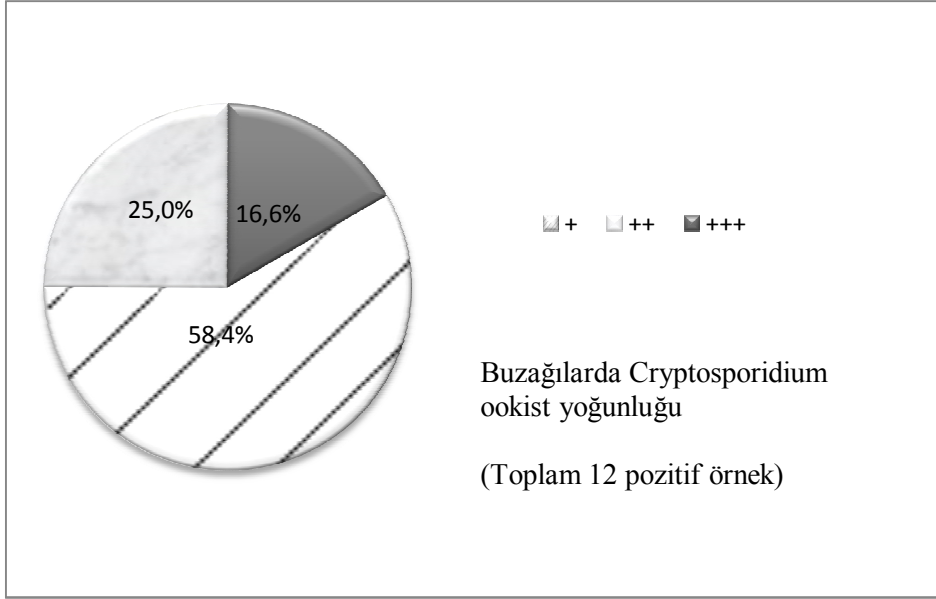
#### 3.1. Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi Sonuçları

Buzağılarda *Cryptosporidium* yaygınlığı; toplam 313 dışkı örneğine yapılan mAF boyama yöntemi ile %3.8 (12/313) olarak bulunmuştur (Şekil 3.1).



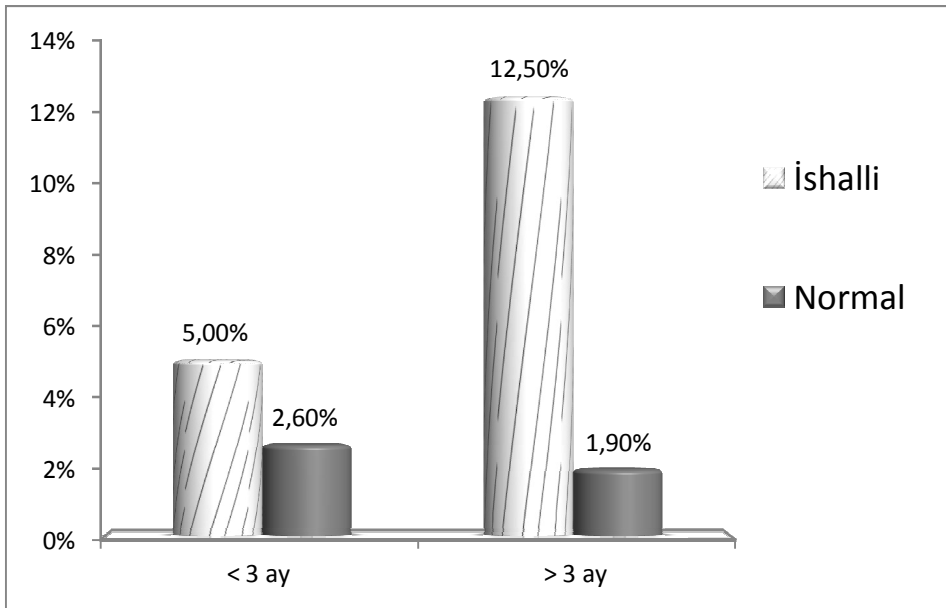
**Şekil 3.1:** Kars yöresinde buzağılarda *cryptosporidium* yaygınlığı.

Modifiye asit-fast boyama yöntemine göre pozitif saptanan örneklerin ookist yoğunlukları; 7 örnekte (+), 3 örnekte (++) ve 2 örnekte (+++) olarak belirlenmiştir. Bu örneklerden 11 tanesi 3 aydan küçük (7'si ishalleri 4'ü normal dışkı), 1 tanesi ise 3-6 aylık normal dışkılu buzağı örneğinde saptanmıştır (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.:** Kars yöresinde buzağılarda mAF boyama yöntemine göre cryptosporidium oocist yoğunluğu

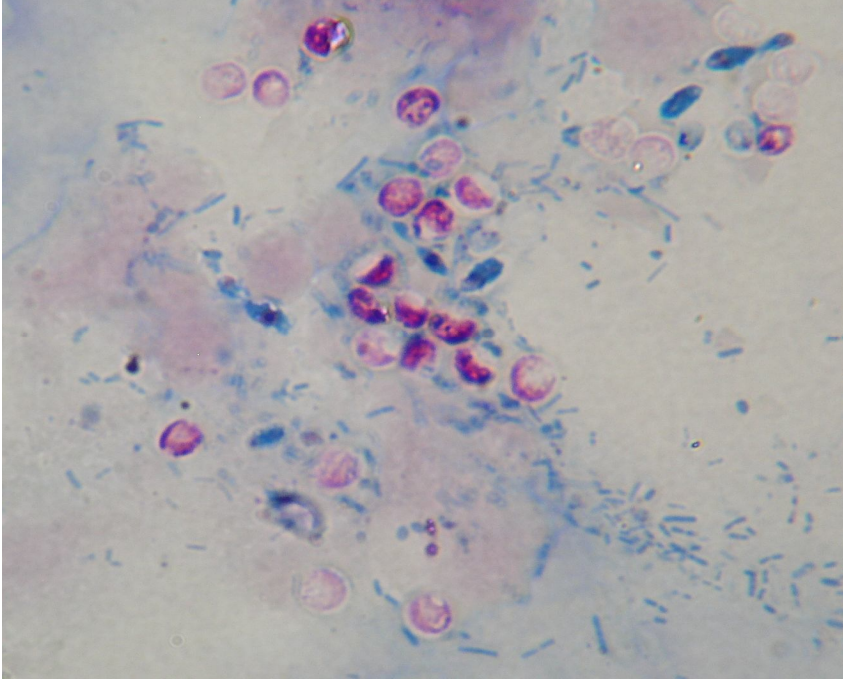
Cryptosporidium görülme oranı mAF yöntemine göre; üç aylığa kadar ishalleri buzağılarda %5 (7/138), sağlıklı olanlarda %2,60 (3/115), 3-6 aylıklarda ise ishalleri olanlarda %12,5 (1/8), sağlıklı olanlarda ise %1,9 (1/52) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.:** Modifiye asit-fast boyama yöntemine göre pozitif olguların klinik durum ve yaşa göre dağılımı



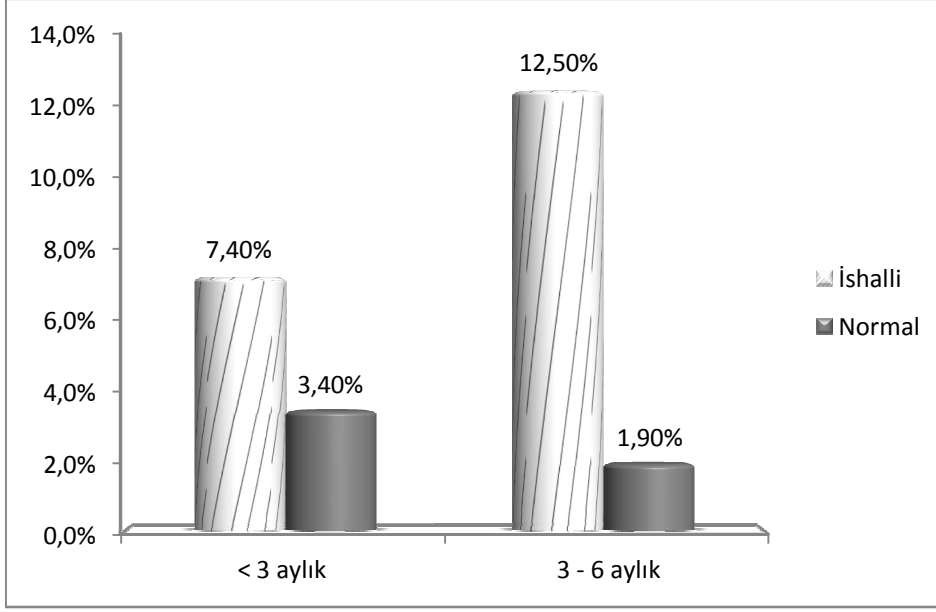
Çalışmada mAF boyama yöntemiyle saptanan *Cryptosporidium* ookistleri şekil 3.4.'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.:** Modifiye asit-fast boyama yöntemiyle saptanan *Cryptosporidium* ookistleri (x100)

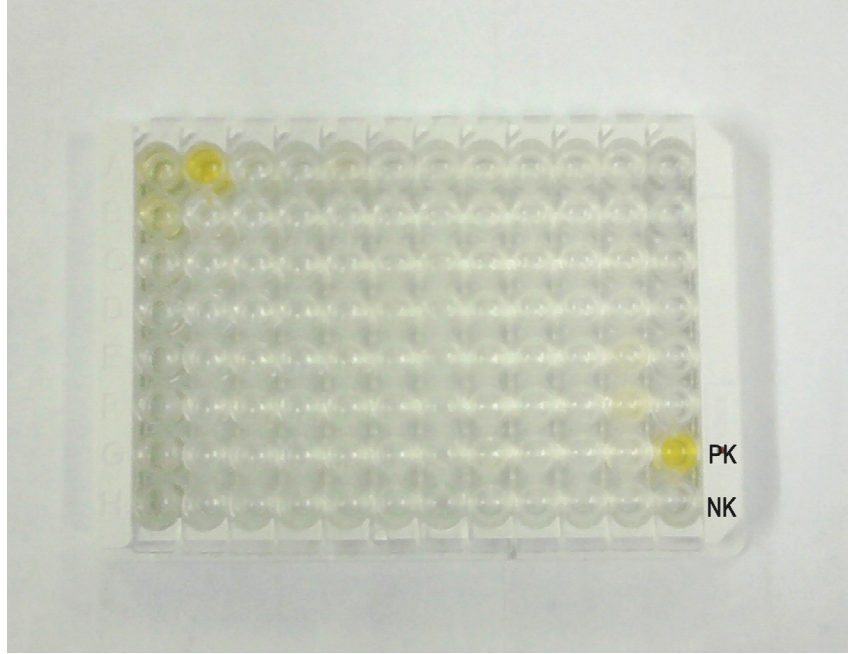
### **3.2. *Cryptosporidium parvum* ELISA kiti ile Yapılan Test Sonuçları**

*Cryptosporidium parvum* ELISA kiti (Bio-X Diagnostics, Veterinary, cattle ) ile koproantijenler yönünden incelenen 222 dışkı örneğinin sonuçları Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.5.** Kars yöresindeki buzağılarda *C.parvum* koproantijenlerinin klinik durum ve yaşa göre yaygınlığı.

ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü Şekil 3.6.'da verilmiştir.

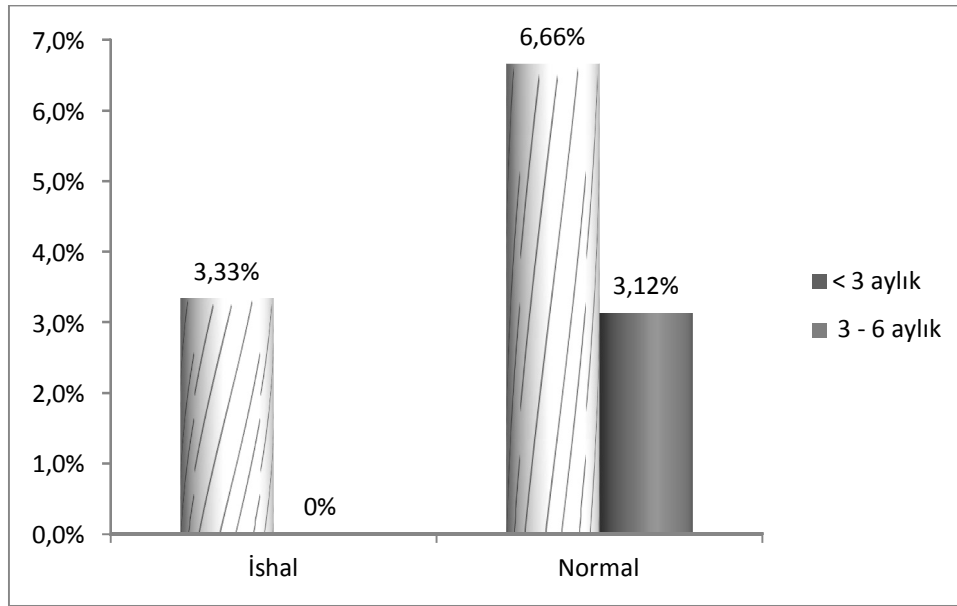


**Şekil 3.6:** ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü

*Cryptosporidium parvum* yaygınlığı %5.9 (13/222) bulunmuş olup, bu oran üç aylıktan küçük buzağılarda (%6.2; 12/194) 3-6 aylık gruba göre (%3.6; 1/28) daha yüksek saptanmıştır. *C. parvum* saptanan 13 pozitif olgunun 9'nun ishalleri, 4'nün sağlıklı olduğu gözlenmiştir. *C. parvum* koproantijenleri en yüksek oranda (%7.4; 8/108) üç aylıktan küçük ishalleri buzağılarda görülmüştür.

### 3.3. *Cryptosporidium sp.* ELISA kiti ile Yapılan Test Sonuçları

*Cryptosporidium*'ları cins/soy düzeyinde belirleyen *Cryptosporidium* ELISA kiti (Diagnostic Automation, Inc., USA, Veterinary cattle ) ile *Cryptosporidium* koproantijenleri yönünden incelenen 91 örneğe ait sonuçlar ise Şekil 3.7.'de sunulmuştur.

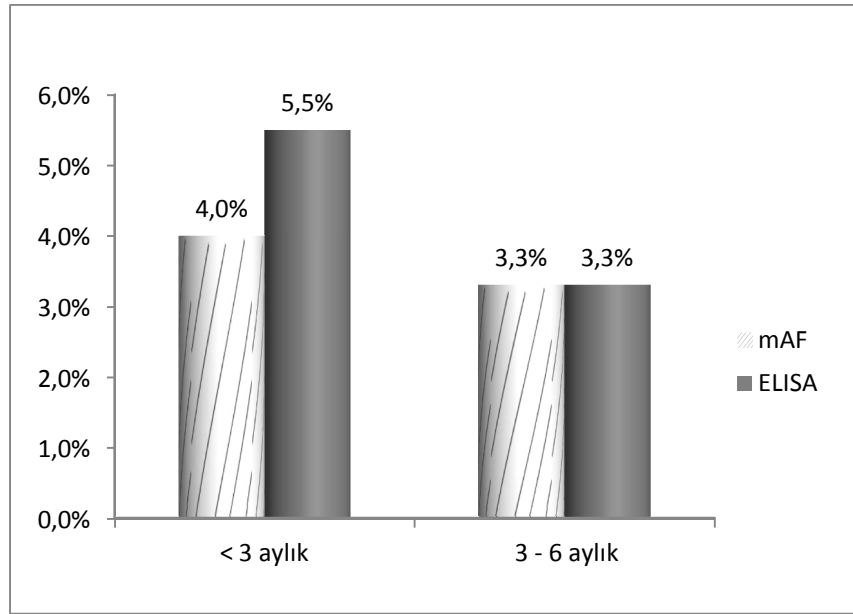


**Şekil 3.7.** Kars yöresindeki buzağılarda *Cryptosporidium* koproantijenlerinin yaygınlığı.

Şekil 3.7.'de görüldüğü gibi cins düzeyinde *Cryptosporidium* etkenlerinin belirlendiği ELISA testi ile ise buzağılarda *Cryptosporidium* koproantijenlerinin görülme oranı %3.3 (3/91) bulunmuş olup, bu oran üç aylığa kadar olanlarda %3.4 (2/59), 3-6 aylıklarda %3.1 (1/32) olarak belirlenmiştir.

### 3.4. Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi ile ELISA Kitleri Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

Buzağılarda *Cryptosporidium* yaygınlığı; mAF boyama yöntemi ile %3.8 (12/313), ELISA ile %5.1 (16/313) oranında bulunmuştur. mAF boyama ile *Cryptosporidium* oookisti görülen tüm örnekler ELISA yöntemi ile de pozitif saptanmıştır (Şekil 3.8.).



**Şekil 3.8.:** Modifiye asit-fast boyama ve ELISA testinin *Cryptosporidium* oookistleri yaygınlığı üzerine karşılaştırılması

Kars yöresinde buzağılarda yaş ve klinik duruma göre *Cryptosporidium* yaygınlığı Tablo 3.1.'de olduğu gibi belirlenmiştir.

**Tablo 3.1.:** Kars yöresinde buzağılarda yaş ve klinik duruma göre *Cryptosporidium* yaygınlığı

	< 3 aylık				3 - 6 aylık			
	İshal		Normal		İshal		Normal	
	mAF	ELISA	mAF	ELISA	mAF	ELISA	mAF	ELISA
x/n	7/138 %5	10/138 %7,2	3/115 %2,6	4/115 %3,4	1/8 %12,5	1/8 %12,5	1/52 %1,9	1/52 %1,9
x/n	14/253 %5,5				2/60 %3,3			
Toplam	mAF 12/313 ; %3,8				ELISA 16/313 ; %5,1			

x/n: *Cryptosporidium* saptanan örnek sayısı/,ncelenen örnek sayısı

Çalışmada kullanılan mAF boyama yöntemi ile ELISA testinin kıyaslanmasında ilk olarak iki testte gözlenen oranlarda uyumluluk (OP) ile beklenen oranlardaki uyumluluk (EP) değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra iki test arasındaki uyumluluk değerini hesaplamak için Kappa istatistik testi uygulanmıştır. Bu istatistik değerlerinin hesaplanmasında;

$$OP = (a+d)/n$$

$$EP = [ (a+b)/n \times (a+c)/n ] + [ (c+d)/n \times (b+d)/n ]$$

$$Kappa = (OP - EP) / (1 - EP)$$

formülleri kullanılmıştır. Kappa istatistik testine göre;

$$\geq 75 \rightarrow \text{çok iyi}$$

$$40-74 \rightarrow \text{orta}$$

$$\leq 40 \rightarrow \text{zayıf uyumluluk oranlarına işaret etmektedir.}$$

**Tablo 3.2:** Modifiye asit-fast boyama ve ELISA testleri sonuçlarının karşılaştırılması

ELISA	mAF		Toplam
	pozitif	Negatif	
pozitif	12 (a)	4 (b)	16
negatif	0 (c)	297 (d)	297
Toplam	12	301	313 (n)

a: Her iki testte pozitif

b: ELISA pozitif, mAF negatif

c: ELISA negatif, mAF pozitif

d: Her iki testte negatif

$$OP = (12+297)/313 = 0,987$$

$$EP = [(12+4)/313 \times (12+0)/313] + [(0+297)/313 \times (4+297)/313] = 0,914$$

$$Kappa = (0,987 - 0,914) / (1 - 0,914) = 0,85$$

İstatiki olarak iki test arasındaki uyumluluk %85 oranında çok iyi derecede uyumluluk olduğu tespit edilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Zoonotik ve ekonomik açıdan önemli bir grubu oluşturan *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının son durumu rutin muayenede sıklıkla kullanılan mAF boyama ve dışkıda koproantijenlerin saptandığı ELISA testleri ile buzağılarda karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. *Cryptosporidium*'ların laboratuvar tanısında dışkıda koproantijenlerin belirlendiği ELISA testlerinin mAF boyama yöntemlerine göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Starling ve Arrowood 1993, Özçelik ve ark. 2012). Karşılaştırmalı olarak yapılan bu çalışmada da mAF boyama yöntemi ile %3,8 (12/313), ELISA ile %5,1 (16/313) oranında pozitiflik saptanmıştır. Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile pozitif olan örnekler ELISA ile de pozitif bulunmuştur. Ancak Kars yöresindeki daha önce yapılan araştırma sonuçları (Arslan 2005, Arslan ve ark. 2001, Çitil ve ark. 2004) ile kıyaslandığında bu çalışmada buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyon oranının oldukça düştüğü dikkati çekmiştir. *Cryptosporidium* yaygınlığının bu kadar düşmesinde meteorolojik veriler başta olmak üzere yetiştirme tarzlarındaki iyileşmelerin de etkili olabileceği düşünülmüştür.

Kars yöresinde 1999-2005 yılları doğum sezonlarında *Cryptosporidium* prevalansı mAF boyama yöntemiyle üç ayla kadar olan ishalleri buzağılarda %34,2 (171/500) olarak bulunmuştur (Arslan 2005, Arslan ve ark. 2001). Bu yörede *Cryptosporidium*'lara yine mAF boyama yöntemiyle, neonatal ishalleri buzağılarda %37,7 (40/106) ve neonatal sağlıklı buzağılarda %20,9 (9/43) oranında rastlanmıştır (Çitil ve ark. 2004). Yapılan bu çalışmada, 6 ayla kadar olan hem ishalleri hem sağlıklı buzağı dışkı örnekleri mAF boyama yöntemine göre değerlendirildiğinde oranın %3,8'e kadar düştüğü saptanmıştır. Bu büyük düşüşe neden olabilecek sebepler arasında ilk olarak iklimsel değişiklikler akla gelmiştir. İklimsel değişikliğin yanı sıra hayvan sahiplerinin yetiştiricilik adına bilinçlenmesi, bilinçli ilaç kullanımı gibi faktörler sayılabilir.

Dünya geneliyle Kars yöresinde tespit edilen sonuçlar kıyaslandığında pozitiflik oranının hem mAF boyama yöntemine göre hem de ELISA metoduna göre daha düşük olduğu görülmektedir. Cryptosporidiosisin saptanan bu düşük prevalansına daha önce yapılan çalışmaların genelinde hem semptomlu hayvanlar üzerine hem de risk faktörü daha yüksek olan neonatal hayvanlar üzerine araştırma yapılmış olmasının etkili olabileceği düşünülmüştür.

Araştırmadan amaçlanan rutin muayene tekniği olan mAF boyama yönteminin ELISA testi ile enfeksiyonun yaygınlığının belirlenmesidir. Bu amacı sonuca ulaştırmak için yapılan bu çalışmada enfeksiyon oranının çok düşük çıkması nedeniyle istatistiki karşılaştırmalar da yapılamamıştır. Bu nedenle ileriki dönemlerde bu tip araştırmaların belirli çiftliklerde moleküler tanı metotlarının da eklenerek yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılacak bu araştırmalar ile cryptosporidiosisin yöredeki risk durumu daha ayrıntılı olarak ortaya konulabilecektir.

Sonuç olarak Kars yöresindeki sütçü işletmelerde bulunan ishalleri ve sağlıklı buzağılarda Cryptosporidium cinsi protozoonların görülme oranı rutin teşhis metodu olan asit-fast boyama tekniği ve ELISA ile saptanmıştır. Sütçü buzağılarda Cryptosporidium prevalansı mAF ile %3.8, ELISA ile %5.1 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bölgede buzağılarda Cryptosporidium enfeksiyonları görülme oranının düştüğünü göstermiştir. Çalışma da ayrıca dışkıda koproantijenlerin arandığı ELISA yöntemi ile de cins düzeyinde ve tür düzeyinde Cryptosporidium görülme durumu belirlenmiştir. Her iki ELISA kiti sonuçları da birbirine yakın bulunmuştur. Ayrıca asit fast boyama ile pozitiflik saptanan örneklerin ELISA ile de pozitif bulunması önemli bir bulgu olmuştur. Çünkü dışkı muayenelerinde mAF ile mikroskopik inceleme de yanlış ookist değerlendirmeleri yapılabilmektedir. Ayrıca boyama tekniklerinin yapılmasında laboratuvarda uzun zaman harcanmaktadır. Bu nedenle hazırlanacak yerli üretim koproantijen arama kiti ile bu protozoonun ve diğer intestinal protozoonların laboratuvar teşhisleri kolaylıkla yapılabilecektir. Ayrıca kliniklerde kesin tanı için pratik olarak bu testler kullanılabilir.



## **Kars Yöresindeki Buzağlarda *Cryptosporidium* Enfeksiyonlarının Prevalansının Asit Fast Boyama (mAF) ve ELISA Yöntemleriyle Belirlenmesi**

### **ÖZET**

Çalışmada, Kars yöresinde sütçü işletmelerdeki buzağlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının prevalansı modifiye Asit Fast (mAF) boyama ve Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Araştırma Mart-Haziran 2011 doğum sezonunda 22 işletmede yürütülmüştür. Dışkı örnekleri bu işletmelerdeki buzağların rektumlarından alınmıştır. Çalışma materyali 313 dışkı örneğinden (146'sı ishalleri, 167'si sağlıklı) oluşmuştur. Her dışkı örneği önce mAF boyama yöntemi ile incelenmiş olup, bu örneklerden 222'si *Cryptosporidium parvum* ELISA kiti (Bio-X Diagnostics, Veterinary, cattle ), 91'i ise *Cryptosporidium* ELISA kiti (Diagnostic Automation, Inc., USA, Veterinary cattle ) ile *Cryptosporidium* koproantijenleri yönünden incelenmiştir.

Buzağlarda *Cryptosporidium* yaygınlığı; mAF boyama yöntemi ile %3.8 (12/313), ELISA ile %5.1 (16/313) oranında bulunmuştur. mAF boyama ile *Cryptosporidium* oocisti görülen tüm örnekler ELISA ile de pozitif saptanmıştır. *Cryptosporidium* görülme oranı mAF boyama ile ishalleri buzağlarda %5.5 (8/146), sağlıklılarda %2.4 (4/167), üç aylığa kadar olanlarda %4.0 (10/253), 3-6 aylıklarda ise %3.3 (2/60) olarak belirlenmiştir. *Cryptosporidium* görülme oranı ELISA yöntemlerine göre ise ishalleri buzağlarda %7.5 (11/146); sağlıklılarda %3.0 (5/167); üç aylığa kadar olanlarda %5.5 (14/253); 3-6 aylıklarda %3.3 (2/60) olarak bulunmuştur. *Cryptosporidium parvum* yaygınlığı %5.9 (13/222) bulunmuş olup, bu oran üç aylıktan küçük buzağlarda (%6.2; 12/194) 3-6 aylık gruba göre (%3.6; 1/28) daha yüksek saptanmıştır. *Cryptosporidium parvum* saptanan 13 pozitif olgunun 9'nun ishalleri, 4'nün sağlıklı olduğu gözlenmiştir. *Cryptosporidium parvum* koproantijenleri en yüksek oranda (%7.4; 8/108) üç aylıktan küçük ishalleri buzağlarda saptanmıştır. Cins düzeyinde *Cryptosporidium* etkenlerinin belirlendiği ELISA testi ile ise buzağlarda *Cryptosporidium* koproantijenlerinin görülme oranı %3.3 (3/91) bulunmuştur.

Sonuç olarak hem mAF boyama hem de ELISA testleri ile buzağlarda *Cryptosporidium* prevalansının son yıllarda oldukça düştüğü gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Cryptosporidium, *Cryptosporidium parvum*, Buzağı, Asit Fast Boyama, ELISA, Prevalans, Kars

## **Determining the Prevalence of Cryptosporidium Infections with Acid Fast Staining (mAF) and ELISA Methods of in Calves in Kars Province of Turkey**

### **SUMMARY**

In this study, the prevalence of *Cryptosporidium* infections with modified acid fast (mAF) staining and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) methods was determined in calves in dairy farms in Kars region of Turkey

This research was carried out between March-June 2011 in 22 dairy farms. Fecal samples were taken from rectum of calves in this farms. Total study material of 313 fecal samples (146 diarrheic, 167 healthy) were collected. Samples were examined by mAF. Then, 222 of these samples were analyzed by using *Cryptosporidium parvum* ELISA kit (Bio-X Diagnostics, Veterinary, cattle), 91 of these samples by *Cryptosporidium* ELISA kit (Diagnostic Automation, Inc., USA, Veterinary cattle) for coproantigens.

Prevalance of *Cryptosporidium spp.* were observed in 3.8% (12/313) of calves by mAF staining and 5.1% (16/313) by ELISA. All the samples which were positive by mAF staining were found to be positive by ELISA. The rate of *Cryptosporidium* by mAF staining was found to be 5.5% (8/146) in diarrhoeic calves, and 2.4% (4/167) in healthy calves, The rate was 4.0% (10/253) in those up to three months olds and it was 3.3% (2/60) the group of 3-6 months.

The rate of *Cryptosporidium* infections by ELISA was found to be 7.5% (11/146) in diarrhoeic calves, 3.0% (5/167) in healthy calves, The rate was 5.5% (14/253) in calves which were up to three months old and it was 3.3% (2/60) in the 3-6 month group. Prevalance of *C. parvum* in calves was found to be 5.9% (13/222). This ratio was higher calves which were older than three months old (6.2%, 12/194) comparing to to groups of 3-6 months (3.6%, 1/28). Calves infected with *C.parvum* were observed in 9 out of 13 cases in which animals were diarrhoeic and in 4 out of 13 cases in which the animals were healthy. The highest rate (7.4%, 8/108) in coproantigen testing of *C.parvum* were determined in the group of diarrhoeic calves

which were older than three months old. Prevalance of Cryptosporidium by ELISA was found to be 3.3% (3/91) in calves.

As a result, prevalance of Cryptosporidium was observed as quite low in recent years comparing prevous studies by using both the mAF staining and ELISA tests.

**Keywords:** Cryptosporidium, *Cryptosporidium parvum*, Calves, Acid Fast Staining, ELISA, Prevalence, Kars, Turkey

## 7. KAYNAKLAR

- Ak M.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). İçinde: Özcel MA, Altıntaş N (Eds): Parazit Hastalıklarında Tanı. s. 241–259, Türkiye Parazitolojisi Derneği Yay, No: 15, İzmir, 1997
- Arslan MÖ.: Kars yöresindeki buzağılarda cryptosporidiosis sorunu. VI. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, 4-7 Temmuz 2005, Kars, 2005.
- Arslan MÖ, Gıcık Y, Erdoğan HM, Sarı B.: Prevalence of *Cryptosporidium spp.* oocysts in diarrhoeic calves in Kars Province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci., 25: 161-164, 2001.
- Björkman C, Svensson C, Christensson B, Verdier K.: *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. Acta Vet Scand., 44:145-152,2003.
- Broglia A, Reckinger S, Caccio SM, Nöckler K.: Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. Vet Parasitol, 154(1-2):8-13, 2008.
- Burgu A.: Türkiye’de buzağılarda *Cryptosporidium*’ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 31(3):573-585,1984.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT.: Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res, 38: 818-862, 2004.
- Castro-Hermida JA, Gonzalez-Losada YA, Ares-Mazas E.: Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet Parasitol, 106: 1-10, 2002.
- Çitil M, Arslan MÖ, Güneş V, Erdoğan HM.: Neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria* enfeksiyonlarının rolü. Kafkas Üniv. Vet Fak Derg, 10(1): 59-64, 2004.
- Değerli S, Çeliksöz A, Kalkan K, Özçelik S.: Prevalence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* in cows and calves in Sivas. Turk J Vet Anim Sci, 29:995-999, 2005.

- de la Fuente R, Luzon M, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Garcia A, Cid D, Orden JA, Garcia S, Sanz R, Gomez-Bautista M.: Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet Parasitol, 80:179-185, 1999.
- Doğruman-Al F.: Türkiye'deki Klinik Önemi Olan Paraziter Enfeksiyonlarda Tanısal Yaklaşım in Korkmaz M, Ok ÜZ (Eds.): Parazitolojide Laboratuvar, s 359, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:23, 2011.
- Emre Z.: Fidancı H.: Prevalence of mix infections of *Cryptosporidium spp.*, *Escherichia coli* K 99 and Rotavirus in the faeces of diarrhoeic and healthy cattle in Ankara, Turkey and in vitro resistance of *Escherichia coli* K 99 to antimicrobial agents. Turk J Vet Anim Sci, 22, 175-178, 1998.
- Fahey TMD.: Cryptosporidiosis. Infectious Disease Update, 10(2): 75-80, 2003.
- Fayer R.: Morgan U, Upton SJ.: Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. Int J Parasitol, 2000, 30:1305-1322, 2000.
- Fayer R.: General Biology. In: Fayer R, Xiao L (Eds.): Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-41, 2008.
- Fayer R, Santin M, Trout JM.: *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Vet Parasitol, 156: 191-198, 2008.
- Fayer R.: Taxonomy and species delimitation in Cryptosporidium. Exp Parasitol, 124(1):90-7. 2010
- Fayer R, Santin M, Macarasin D.: *Cryptosporidium ubiquitum* n.sp. in animals and humans. Vet Parasitol, 172: 23-32, 2010.
- Geurden T, Claerebout E, Vercruyse J, Berkvens D.: A Bayesian evaluation of four immunological assays for the diagnosis of clinical cryptosporidiosis in calves. Vet J, 176:400–402, 2008.
- Geurden T, Goma FY, Siwila J, Phiri IGK, Mwanza AM, Gabriel S, Claerebout E, Vercruyse J.: Prevalans and genotyping of Cryptosporidium in three cattle husbandry systems in Zambia. Vet Parasitol, 138:217-222, 2006.
- Gül A, Çiçek M, Kılınç Ö.: Prevalence of Eimeria spp., *Cryptosporidium spp.* and Giardia spp. in calves in the Van Province. Türkiye Parazitolojisi Derg, 32(3): 202-204, 2008.

<http://bestpractice.bmj.com/bestpractice/monograph/1149/resources/image/bp/2.html>

<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/ArticleStandard/Article/detail/509560>.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307000123>

<http://www.tparazitolderg.org/text.php3?id=358>

Karaer Z, Dumanlı N.: Genel Protozooloji. İçinde: Dumanlı N, Karaer Z (Eds): Veteriner Protozooloji. P. 1-21. Medisan Yay, Ankara, 2010.

Kehl KS, Cicirello H, Havens PL.: Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. J Clin Microbiol, 33(2): 416-418, 1995.

Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ.: DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 45:688-94, 1991.

Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R.: Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. Vet Parasitol, 89:1-9, 2000.

Mamak N, Özçelik S, Değerli S, Oğuztürk H, Akın Z.: Zara (Sivas) yöresi sığırlarında *Cryptosporidium* enfeksiyonunun prevalansı. Türkiye Parazitol Derg, 24, 401-404, 2000.

Mıstık R, Helvacı S, Akdiş C, Töre O: Bursa yöresinde sağlıklı ve diareli kişilerde *Cryptosporidium* araştırması. Türkiye Parazitol Derg, 16(2): 1-5, 1992.

Nichols G.: Epidemiology. In: Fayer R, Xiao L (Eds.): *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 79-118, 2008.

O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME.: Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. JAVMA, 214 (3): 391-396, 1999.

O'Handley RM, Olson ME.: Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. Vet Clin Food Anim, 22(3): 623-643, 2006.

Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E.: Dışkı İnceleme Yöntemleri. Özcel MA ve Altıntaş N. (Edit.), Parazit Hastalıklarında Tanı, T Parazitol Dern., Yay. No. 15, s. 1-61, 1997.

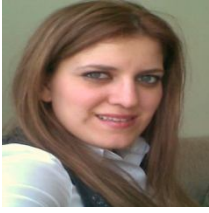
Olson Me, Ralston BJ, O'Handley R, Guselle and Appelbee AJ.: What is the Clinical and Zoonotic Significance of *Cryptosporidiosis* in Domestic Animals and Wildlife in Thompson RCA, Armson A, Ryan UM, (Eds.). *Cryptosporidium: from molecules to Disease*. Elsevier B.V., p:62., 2003.

- Özcel MA, Üner A, Ertuğ S.: Immunofloresans Yöntemi. In: Özcel MA, Altıntaş N (Ed): Parazit Hastalıklarında Tanı. s. 215–240. Türkiye Parazitol Dern Yay, No: 15, 1997.
- Özçelik S, Poyraz Ö, Kalkan K, Malatyalı E, Değerli S.: Hayvancılıkla Uğraşanlarda ve Sığırlarda *Cryptosporidium spp.* Yaygınlığının ELISA ile Araştırılması. Kafkas Univ Vet Derg, 18 (Suppl-A):A61-A64, 2012.
- Özlem MB, Eren H, Kaya O.: Aydın yöresi buzağılarda *Cryptosporidium*' ların varlığının araştırılması. Bornova Vet Kontr. Araş Enst. Derg, 22: 15-22, 1997.
- Santin M, Trout JM.: Livestock. In: Fayer R , Xiao L (Eds.): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 451-483, 2008.
- Sarı B, Aktaş MS, Arslan MÖ.: Erzurum Yöresinde Buzağılarda *Cryptosporidium* Türlerinin Prevalansı. Türkiye Parazitol Derg, 32, 116 – 119, 2008.
- Sears CL, Kirkpatrick BD.: *Cryptosporidiosis and Isosporiasis*. In: Gillespie S and Pearson RD (Edit.): *Principles and Praticce of Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons Ltd., Toronto, s.139-164, 2001.
- Sevinc F, Irmak K, Sevinc M.: The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoiec and non-diarrhoeic calves. Revue Med Vet, 154:357-361, 2003.
- Smith H.: Diagnostics. In: Fayer R , Xiao L (Eds.): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 173-207, 2008.
- Starkey S.R., Wade S.E., Schaaf S., Mohammed H.O.: Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy cattle population in a New York City Watershed. Vet Parasitol, 131 (2005) 197–205, 2005.
- Starling CR, Arrowood MJ.: *Cryptosporidia*. In parasitic protozoa. Academic Prees, 65(6): 159-224, 1993.
- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS.: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Adv Parasitol, 59:77-158, 2005.
- Truong Q, Ferrari BC.: Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. International Journal for Parasitol, 36 (2006) 811–819,2006.



- Tzipori, S., Ward, H.: Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microb Infection*, 4 (2002) 1047–1058, 2002.
- Uyar Y, Taylan Özkan A.: Amebiyazis, giardiyazis ve kriptosporidiyazis tanısında antijen tarama yöntemlerinin yeri. *Türkiye Parazitol Derg*, 33 (2):140-150, 2009.
- Zeyrek Yıldız F, Dirim Erdoğan D.: Serolojik Tanı Yöntemleri in Korkmaz M, Ok ÜZ (Eds.): *Parazitolojide Laboratuvar*, s 219, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:23, 2011.
- Xiao L.: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol*, 124: 80–89, 2010.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ.: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rew*. 17(1): 72-97, 2004.

## 8. ÖZGEÇMİŞ



<b>Adı</b>	Neslihan
<b>Soyadı</b>	Gündüz
<b>Ünvanı</b>	Biyolog
<b>Doğum Yeri ve Tarihi</b>	1984, Malatya
<b>Mezuniyet Yeri ve Tarihi</b>	Kafkas Üniversitesi, 2008