

LABORATUVAR HAYVANLARINDA DENEYSEL CRYPTOSPORİDİTİS:
PATOLOJİK BULGULAR VE CROSS-TRANSMİSSİON ÇALIŞMALARI*

Yılmaz Aydın**

Experimental cryptosporidiosis in laboratory animals: Pathological findings and cross-transmission studies

Summary: *In this study, oocysts indistinguishable from those of Tyzzer's original description of Cryptosporidium muris were isolated firstly from naturally infected laboratory mice. These oocysts were orally given to various species of laboratory animals such as mice, rats, guinea pigs and rabbits. In experiments, 100 laboratory mice and rats, 25 rabbits and 13 guinea pigs were used throughout the study. Mice and rats were divided into 5 groups with different ages and each group contained 20 animals. It was observed that mice and rats of all ages were susceptible to the disease whereas guinea pigs and rabbits were less susceptible when orally infected by oocysts of the protozoan parasite. It was also observed that the oocysts isolated from the faeces of the experimentally infected animals were similar to the oocysts isolated from the naturally infected mice with respect to morphological characteristics. They were measured 5.3x7.9 µm on average using ocular micrometer.*

These laboratory animals used for the study showed no clinical signs of the disease in all the age groups, before, during and after the investigation. There were also no macroscopic findings at necropsy.

Histopathological investigations indicated that the developmental stages of this protozoan parasite occurred only in the stomach of the animals. Basophilic and small protozoan parasites which were either round or ellipsoid in shape were attached to the stomach epithelium and also embedded in the epithelial cells of the gastric glands. The lumens of the gastric glands were enlarged and their epithelial cells flattened, atrophied and degenerated.

* Bu çalışma, A.Ü. Araştırma Fonu'nca desteklenen aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir (Proje no: 90-30-00-01).

** Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Patoloji Agabilim Dalı, Aknara.

As a result of the study it was concluded that stomach cryptosporidiosis is not host specific and experimental infections are produced in the mouse, rat, guinea pig and rabbit as being intestinal cryptosporidiosis.

Özet: *Bu çalışmada, doğal olarak enfekte laboratuvar farelerinin dışkılarından izole edilen Cryptosporidium muris oosistleri, çeşitli laboratuvar hayvanlarına oral yolla verilerek enfeksiyon oluşturulmuştur. Bu amaçla çalışma boyunca, 100 adet laboratuvar faresi ve rat, 25 adet tavşan, 13 adet kobay kullanılmıştır. Fare ve ratlar, yaşları farklı ve herbirinde 20 hayvan bulunan 5 gruba ayrılmıştır.*

Bu parazit protozoonun oosistleriyle oral yolla inoküle edilen fare ve ratların bütün yaş gruplarının enfeksiyona duyarlı olduğu görülmüş, buna karşılık kobay ve tavşanların daha az duyarlı olduğu saptanmıştır. Deneye alınan bu hayvanların dışkılarından izole edilen oosistlerin morfolojik yönden, doğal olarak enfekte laboratuvar farelerinininkiye benzer olduğu görülmüştür.

Deneye alınan bütün yaş gruplarındaki hayvanların, deney öncesi, deney süresince ve deney bitiminde, klinik olarak, herhangi bir belirti göstermedikleri tespit edilmiştir. Bu hayvanların otopsilerinde de makroskobik bir bulguya rastlanılmamıştır.

Otopsi sonucunda alınan doku örneklerinin histopatolojik olarak incelenmesinde, bu parazit protozoonun gelişme evrelerinin sadece midede bulunduğu saptanmıştır. Anılan parazit protozoonun gelişme evrelerinin, mide yüzeyi ve mide bez epitel hücre yüzeylerine tutunmuş olarak, küçük, yuvarlak ya da oval, bazofilik cisimcikler şeklinde görüldüğü dikkati çekmiştir. Çok sayıda parazit protozoon içeren mide bez lumenlerinin oldukça genişlemiş olduğu ve epitel hücrelerinde yassılaşma, atrofi ve dejeneratif bulguların olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ülkemizde bu parazit protozoon tarafından oluşturulmuş mide cryptosporidiosis'i olgusu, ilk olarak laboratuvar farelerinde ortaya konmuş ve deneysel olarak fare, rat, kobay ve tavşanlar da enfekte edilmiş olup bu parazit protozoonun konakçıya özgü olmadığı saptanmıştır.

Giriş

Cryptosporidiosis, cryptosporidium cinsi parazit protozoonların neden olduğu zoonoz özellikle bir enfeksiyon olup, son yıllarda, insan ve ekonomik değeri olan birçok evcil hayvanlardaki gastro-

enteritislerin önemli bir nedeni olarak kabul edilmiştir (4,5,7,12,13, 22). *Coccidia* grubu protozoonlardan olan *cryptosporidium*'ların, genel olarak insan dahil, birçok memeli, kanatlı, sürüngen ve balık türlerinin sindirim kanalı epitel hücrelerinde lokalize oldukları saptanmıştır (7,13,22). Bu parazit protozoonlar, her ne kadar bu yüzyılın başlarında tanınmış ve isimlendirilmişse de (19,20,21), hastalığın identifikasyonu, klinik önemi, epidemiyolojisi, yayılışı ve kontrolü üzerindeki çoğu bilgiler ancak son yıllarda elde edilebilmiştir (4,5,7, 12,13,22).

Cryptosporidiosis, önceleri hayvanlarda nadiren görülen bir enfeksiyon olarak düşünülmüş, ancak son yıllarda, çeşitli evcil hayvan türlerinde, özellikle yeni doğanlarda ishale sebep olan bir enfeksiyon olarak dikkati çekmiştir (2,11,25). Yapılan deneysel çalışmalar da (6,16,17,23,24), *cryptosporidium*'ların enteropatojen etkenler arasında olduğunu teyit etmiştir. Bu çalışmalar aynı zamanda, bu parazit protozoonların türe özgü olmadığını göstermiş ve çeşitli hayvan türleriyle bunlarla ilişkisi olan insanlarda, çapraz enfeksiyonların her zaman olası olduğunu ortaya koymuştur (6,16,17,23,24).

Daha çok son zamanlarda, *cryptosporidium* enfeksiyonları hakkındaki bilgiler, çeşitli araştırmacılarca biraraya getirilmiş ve Veteriner-Tıp ilgi alanında çalışanlar arasında yaygın işbirliği ortaya çıkmıştır (4,5,7,12,22). Bunun sonucu olarak, özellikle 1980'den sonra, gerek Veteriner Hekimlik gerekse Tıp alanında, literatürde çok sayıda olgu raporu ortaya çıkmıştır. Netice, hastalık hakkındaki veriler çarpıcı bir şekilde artmış, ancak hastalığa karşı etkili kemoterapötiklerin henüz saptanamaması, yeryüzünde yaygın olan bu hastalığa ilginin sürmesine ne neden olmuştur.

Ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada (3), ilk olarak buzağı dışkılarında bu parazit protozoonlara rastlandığı bildirilmiş, diğer bir çalışmada (18), doğal olarak enfekte buzağılardan elde edilen etkenlerin enfektivitesi üzerinde çalışılmıştır. Ayrıca, ülkemiz oğlak (15) ve piliçlerinde de (14) doğal olarak enfeksiyonun mevcut olduğu saptanmıştır.

Bu bilgiler ışığında, ülkemizde doğal olarak saptanan *cryptosporidium*'ların, gerek Veteriner Hekimlik ve gerekse Beşeri Hekimlikte yaygın olarak kullanılan laboratuvar hayvanları arasında da bulunabileceği ve kolaylıkla taşınabileceği düşünülmüş, bu parazit protozoonların sindirim kanalında oluşturabileceği patolojik bulguların saptanması amacıyla, bu çalışmanın yapılması uygun görülmüştür.

Materyal ve Metot

Deney hayvanları: Bir günlükten 4 haftalıĝa kadar deĝişen yaşlarda 100 adet laboratuvar faresi (*Mus musculus var. albinos*) ve 100 adet rat (*Rattus norvegicus var. albinos*) denemeye alındı. Denemeye alınan bu hayvanlar, çeşitli laboratuvar hayvanı yetiştirme birimlerinden (Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Lalaĝan Atom Enerjisi Kurumu, Atatürk Orman Çiftliĝi) elde edilen ve patoloji Anabilim Dalı'nda yetiştirilen ergin hayvanların yavrularıydı. Bu ergin hayvanlar, getirildikleri günden itibaren düzenli olarak *cryptosporidium* oosistleri yönünden dışkı yoklamasına tabi tutuldu ve negatif sonuç alındı. Bunlardan elde edilen yavrular da, dışkılarını incelenip *cryptosporidium* enfeksiyonu yönünden negatif sonuç alındıktan sonra denemeye alındılar.

Denemelerde ayrıca transmisyon amacıyla, bir günlükten 3 haftalıĝa deĝişen yaşlarda 10 deney 3 kontrol olmak üzere toplam 13 adet kobay (*Cavia porcellus*) ve 20 deney 5 kontrol olmak üzere toplam 25 adet tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) kullanıldı. Kobaylar, Saĝlık Bakanlıĝı'na baĝlı Refik Saydam Hışzısıhha Enstitüsü bünyesinde faaliyet gösteren Serum Çiftliĝi'nden; tavşanlar ise, Fakültemiz Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Dalı'ndan saĝlandı.

İnokulum kaynaĝı, hazırlanması ve uygulanması: Denemelerde kullanılan inokulum kaynaĝını, n çalışma için Saĝlık Bakanlıĝı'na baĝlı Refik Saydam Hışzısıhha Enstitüsü bünyesinde faaliyet gösteren Serum Çiftliĝi'nden saĝlanan, yaklaşık 3 haftalık laboratuvar farelerinin dışkılarında izole edilen *Cryptosporidium* oosistleri oluşturdu.

İnokulum hazırlanmasında; *cryptosporidium* oosistlerini içeren dışkılar, bu hayvanların tutulduĝu tel altlıklı kafeslerin altına yerleştirilen tavalardan toplandı ve cam kavanozlara alındı. Cam kavanozlara alınan bu dışkılar, eşme suyu ilave edilerek ucu kt bir çubuk yardımıyla iyice ezildi ve karıştırılarak homojen hale getirildi. Bu homojen karışım tel gözenekli süzgeçlerden szld. Daha sonra, sznt içinde kaba döküntüden uzaklaştırılmış oosistler, Sheater'ın doymuş şekerli suda flotasyon tekniĝiyle (6) yoĝunlařtırılarak inokulum haline getirildi ve sayımları yapıldı. Sayım işleminde; 0.05 cc.lik miktar, eppendorf pipet yardımıyla bir lam üzerine alındı, eşit miktar Carbol fuchsin solusyonuyla (Merck, 9215) (8) karıştırılarak yayıldı ve tüm sahadaki oosist sayısı, binoküler mikroskobun 40'lık objektifiyle saptandı. Sayım işlemi birkaç kez tekrarlandı.

Deney hayvanlarına inokulum. ml.sine 1×10^6 oosist içerecek şekilde ayarlandı (10) ve genellikle taze olarak oral yolla verildi. İnokulumun deney hayvanlarına hemen verilmemesi durumunda ise, 2 aydan daha az süreyle % 2.5'lük $K_2Cr_2O_7$ (Potasyumdikromat) (10,16,17) solusyonu içinde $4^\circ C$ 'de saklandı. İnokulum kullanılacağı zaman, bu koruyucu solusyonun uzaklaştırılabilmesi amacıyla, PBS (Phosphate Buffer Saline)'le (pH: 7.4) 3-4 kez yıkandı.

Deney düzeni: Deneye alınan fare ve ratlardan elde edilen yavrular, bir haftalıktan küçük, bir haftalık, iki haftalık, üç haftalık ve dört haftalık olmak üzere, kontrollerıyla birlikte toplam 5 gruba ayrıldı ve deney düzeni Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Deney Düzeni.

Gruplar	Hayvan Sayısı			İnokulum			Otopsi Zamanı
	Deney	Kontrol	Toplam	Kaynağı	Miktarı	Şekli	
1	15	5	20	Fare	0.1 ml.	Oral	7-21
2	15	5	20	Fare	0.1 ml.	Oral	7-21
3	15	5	20	Fare	0.1 ml.	Oral	7-21
4	15	5	20	Fare	0.2 ml.	Oral	7-21
5	15	5	20	Fare	0.2 ml.	Oral	7-21

Çeşitli araştırmacılarca bildirildiği gibi (16, 17), bu çalışmada da ilk üç deney grubundaki hayvanlara 0.1, sonraki 2 gruba 0.2 ml. inokulum, oral olarak verildi. Deneye alınan tüm hayvanlar ve bunların kontrollerinin, inokulasyondan sonraki 7. günle 21. günler arasında otopsilcri yapıldı. Bu zaman süresince, düzenli olarak hayvanların dışkıları incelendi. Her gün bir hayvanın otopsis yapıldı, sindirim kanalı içeriklerinden ve dışkılarından froti hazırlandı ve oosistler yönünden incelendi.

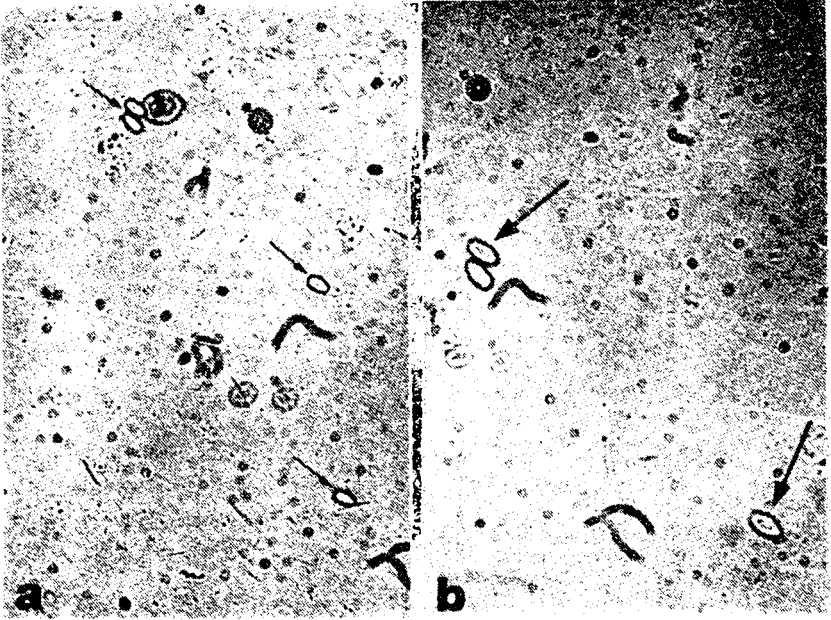
Otopsis yapılan fare ve ratların sindirim kanalı içerikleri ve dışkılarından izole edilen oosistleri içeren inokulumlar, ayrıca kobay ve tavşanlarda da cross-transmisyon denemelerinde kullanıldı. Kobayların, inokulasyondan sonraki 7. günle 25. günler arasında gün aşırı birer hayvan, tavşanların ise, ikişer hayvan olmak üzere, otopsilcri yapıldı. Bu hayvanlara da fare ve ratlardaki işlemler uygulandı.

Doku örneklerinin elde edilmesi ve histolojik olarak incelenmesi: Eter anestezi altında otopsilcri yapılan deney hayvanlarından histopatolojik incelemeler için, sindirim kanalının özofagustan rektuma kadar olan tüm bölümlerinden doku örnekleri alındı. Bu doku ör-

neklerinin lumenlerine % 10'luk nötral formalin solusyonu enjekte edildi. Daha sonra bu doku örnekleri, % 10'luk nötral formalin solusyonu içinde tespit edildi. Sindirim kanalının belirli bölümlerinden (özofagus, mide, duodenum, jejunum (ön, orta, son kısımları), ileum, sekum ve kolon bölümleri) alınan birkaç mm.lik doku örnekleri, parafinde bloklandı, 5-6 mikronluk kesitler yapılarak rutin olarak H.E. (Hematoksilen-Eozin) ve ayrıca gerekli görüldüğünde Giemsa ile boyandı. Bu şekilde elde edilen preparatlar, binoküler mikroskopta incelendi ve bu preparatların değerlendirilmesi yapıldı.

Bulgular

Doğal enfeksiyonun tanısı: Doğal enfeksiyon, dışkı örneklerinin doymuş şekerli suda flotasyonu ve dışkı frotilerinin Carbol fuchsin solusyonuyla boyanması sonucunda, dışkılarda *Cryptosporidium muris* oosistlerinin varlığıyla tanındı. Carbol fuchsin solusyonuyla boyanmış dışkı frotilerinde, kırmızı zemin üzerinde gözlenen oosistlerin kuvvetli ışık kırıcı, düzgün duvarlı ve tam anlamıyla oval yapıları görüldü (Şekil 1). Oosistlerin çoğunda sporozoitlerin belirgin olarak seçilmeleri, binoküler mikroskobun immersiyon objektifiyle in-



Şekil 1. Fare dışkısında *cryptosporidium muris* oosistlerinin görünümü (oklar). Carbol fuchsin, a) x350, b) x560. (*Cryptosporidium muris* oocysts in murine feces (arrows)).

celenmesi sonucunda mümkün oldu. Bu oosistlerin çaplarının, oküler mikrometre yardımıyla yapılan ölçümlerinde, 5.3×7.9 ($5.1-5.8 \times 7.4-8.2$) mikrometre oldukları saptandı.

Otopside elde edilen doku kesitlerinin incelenmesinde, parazit protozoonun gelişme evrelerinin yalnızca midede bulunduğu tespit edildi.

DeneySEL enfeksiyonlar:

Fare ve ratlarda enfeksiyon: Doğal olarak enfekte laboratuvar farelerinin dışkılarında izole edilen oosistleri içeren inokulumlarla oral olarak inoküle edilen fare ve ratların bütün yaş gruplarının enfeksiyona duyarlı olduğu görüldü. İnokülasyondan sonraki ilk 5 gün içinde yapılan dışkı yoklamalarının, bu parazit protozoonun oosistleri yönünden negatif sonuç verdiği saptandı. Buna karşın, inokulasyondan sonraki 6. günden itibaren hayvanların, oosistleri atmaya başladıkları tespit edildi. En yoğun oosist atılımının, inokulasyondan sonraki 12-18. günler arasında olduğu ve bu durumun, histopatolojik olarak saptanan bulgularla da belirgin bir paralellik gösterdiği dikkati çekti. Belirli zamanlarda otopsileri yapılan bu hayvanların sindirim kanalı içeriklerinin sürme frotilerinin de çok sayıda oosist içerdiği tespit edildi.

Deneye alınan bütün yaş gruplarındaki hayvanlar ve bunların kontrollerinin, klinik olarak, deney öncesi sağlıklı bir görünümde olduğu görüldü. Bu hayvanlarda, deneyler süresince ve deneyin sona erdirildiği otopsi anına kadar da hastalık yönünden herhangi bir klinik belirti gözlenmediği dikkati çekti; otopsilerinde de makroskobik bir bulgunun olmadığı saptandı.

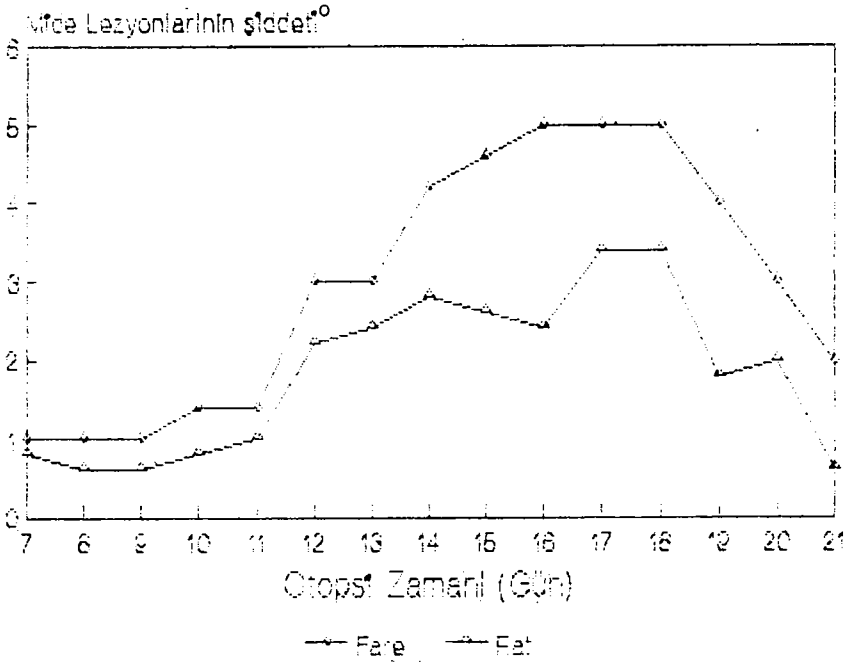
Patolojik yönden incelemeler için otopsi sonucunda alınan doku örneklerinin incelenmesinde, bu parazit protozoonun gelişme evrelerinin sadece midede bulunduğu görüldü. Sindirim kanalının diğer bölümlerinin incelenmesinde ise, enfeksiyona ait histopatolojik bir bulguya rastlanmadığı saptandı. Histopatolojik olarak ortaya çıkan mide lezyonlarının şiddeti derecelendirildi ve Tablo 2, Grafik 1 ve 2'de gösterildi.

Enfeksiyonun erken dönemlerinde histolojik olarak bu parazit protozoonun gelişme evrelerinin, tek tek ya da kümeler halinde, özellikle mide yüzey epitellerine ve kısmen de mide bez epitel hücrelerine tutunmuş olarak, küçük, yuvarlak veya oval, bazofilik cisimcikler şeklinde görülebildiği dikkati çekti (Şekil 2a).

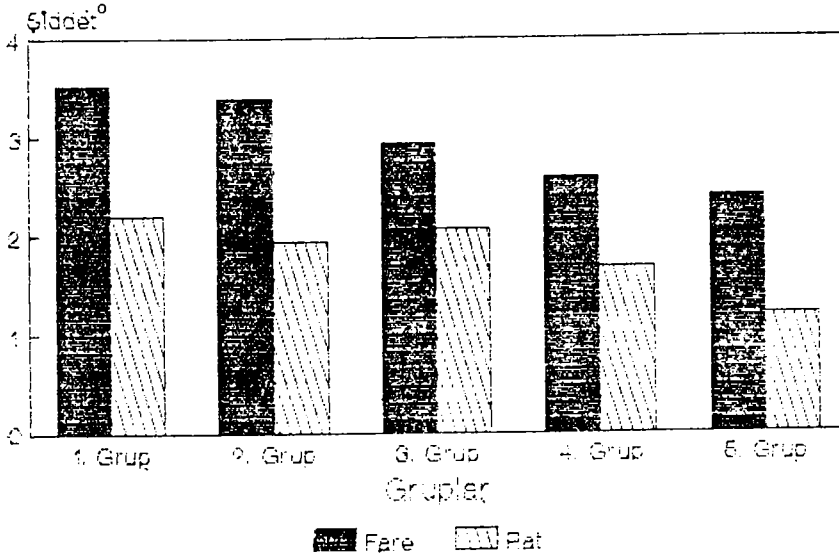
Tablo 2. *Cryptosporidium muris* ile enfekte edilmiş olan Fare (F) ve Ratlarda (R) Histolojik Mide Lezyonlarının Şiddeti.

Hayvan No.	I. Gr.		II. Gr.		III. Gr.		IV. Gr.		V. Gr.		Otopsi- (gun)
	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	7
2	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	8
3	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	9
4	xx	x	x	x	x	x	x	x	x	-	10
5	xx	x	x	x	x	x	x	x	x	x	11
6	xx	xx	xx	x	xx	x	xx	xx	xx	xx	12
7	xx	xxx	xx	-	xx	x	xx	xx	xx	xx	13
8	xxx	x	xxx	-	xx	xx	xx	xxx	xxx	xxx	14
9	xx	x	xxx	xxx	xxx	x	xxx	xxx	xxx	x	15
10	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	-	xxx	x	xxx	x	16
11	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	x	xxx	x	17
12	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	x	xxx	x	18
13	xxx	x	xxx	x	xxx	xxx	xxx	x	-	x	19
14	xxx	x	xxx	x	xxx	xxx	-	x	-	x	20
15	xxx	x	xxx	x	-	-	-	x	-	-	21

- : Histolojik lezyon yok,
 x : Hastalığa ait bulgular az gelişmiş,
 xx : Hastalığa ait bulgular orta derecede,
 xxx : Hastalığa ait bulgular belirgin.

Grafik 1. *Cryptosporidium muris* oosistleriyle oral olarak enfekte edilmiş ve inokulasyondan sonraki 7-21. günler arasında otopsileri yapılmış fare ve ratlarda histolojik mide lezyonlarının şiddeti.

— Tablo 2'de işaretlerle gösterilmiş olan mide lezyonlarının şiddeti, rakamlarla ("—": 0; "x": 1; "xx": 3; "xxx": 5) gösterilmiştir. Derecelendirme, histopatolojik olarak saptanabilen bulgularla birlikte, parazit protozoonların sayısına göre yapılmıştır.

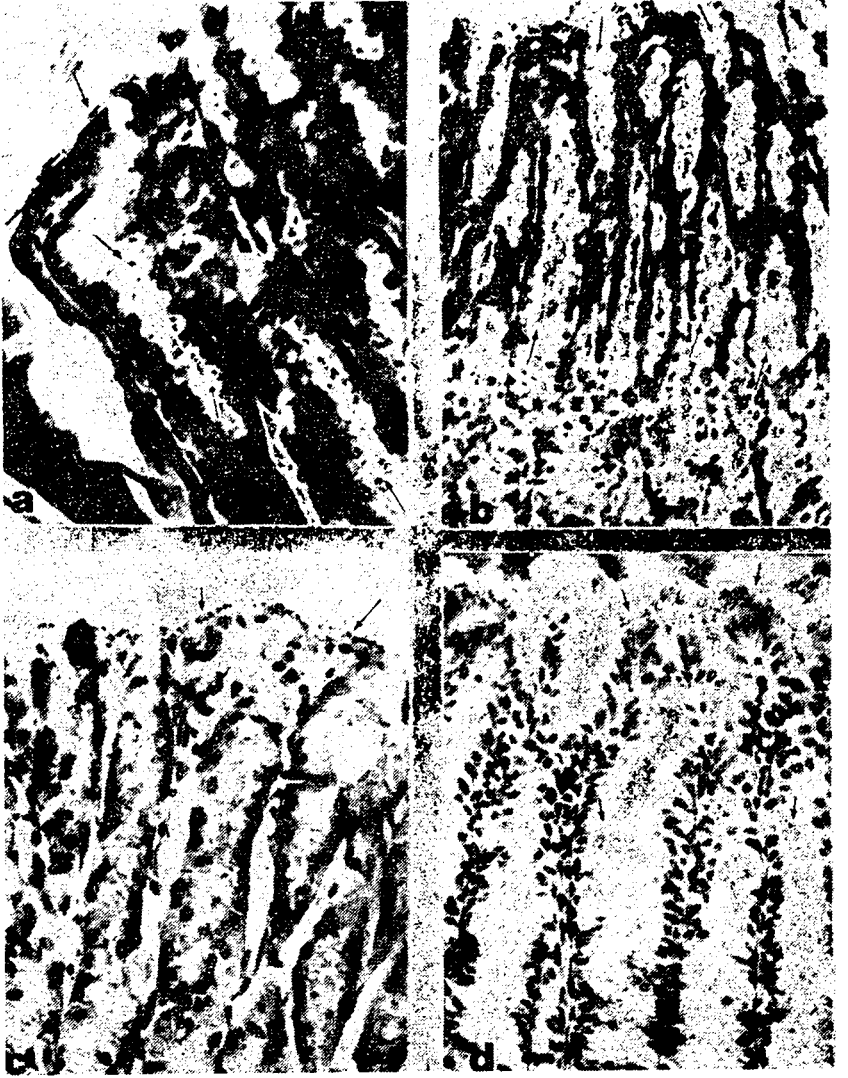


Grafik 2. *Cryptosporidium muris* oosistleriyle oral olarak enfekte edilmiş fare ve ratlardaki histolojik mide lezyonlarının şiddet ortalamalarının karşılaştırılması.

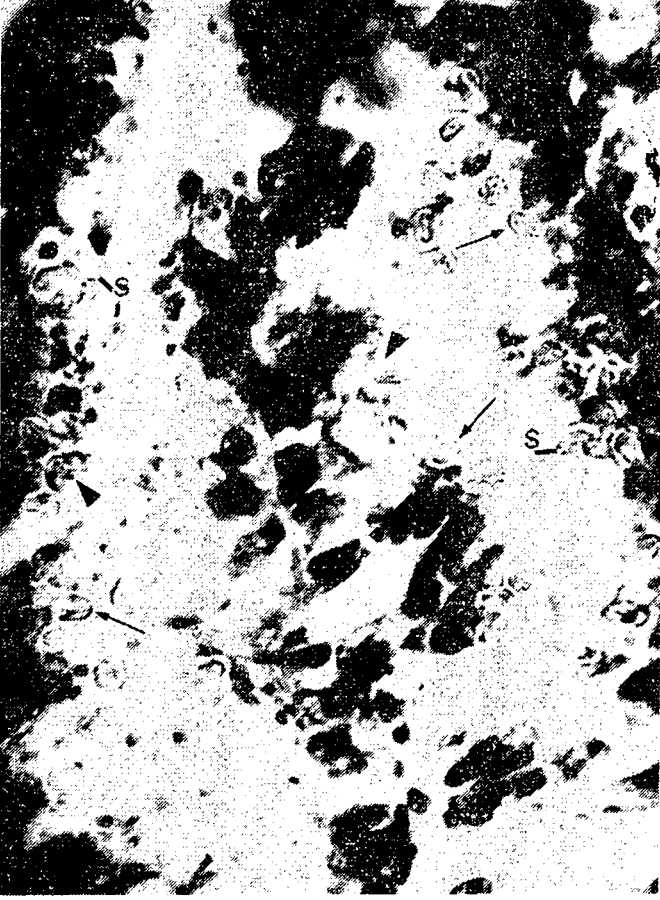
— Tablo 2'de işaretlerle gösterilmiş olan mide lezyonlarının şiddeti, rakamlarla ("—": 0; "x": 1; "xx": 3; "xxx": 5) gösterilmiştir. Derecelendirme, histopatolojik olarak saptanabilen bulgularla birlikte, parazit protozoonların sayısına göre yapılmıştır.

Enfeksiyonun ilerlemesiyle, yukarıda anılan bu parazit protozoona ait gelişme evrelerinin çoğalarak mide bez epitel hücre yüzeylerine yerleştiği ve zamanla çok sayıda etkenin bez epitel hücre yüzeyleriyle bez lumenlerini tamamen kapladığı görüldü (Şekil 2b-d). Bez epitel hücrelerinde ve bu bezlerin lumenlerinde, parazit protozoonun gelişme evrelerine karşılık gelen küçük formlar yanında, kesitlerin bazısında, hem parazitofor vakuoller içinde hem de lumende serbest olarak bulunan daha büyük oval formların da çok sayıda bulunduğu dikkati çekti (Şekil 3, 4). Kesitlerde belirgin ışık kırıcı, parlak iç yapılar sergileyen oval formların, dışkıdaki oosistlerle aynı yapıda olduğu gözlemlendi. Bez epitel hücre yüzeylerine tutunmuş ya da bez lumenlerinde serbest olarak bulunan büyük oval formlar (oosistler) dan bazısı normal yapısını korurken, bazısının duvarının uzun ekseninin orta kısmından kısmen içe doğru bükülme gösterdiği saptandı (Şekil 3).

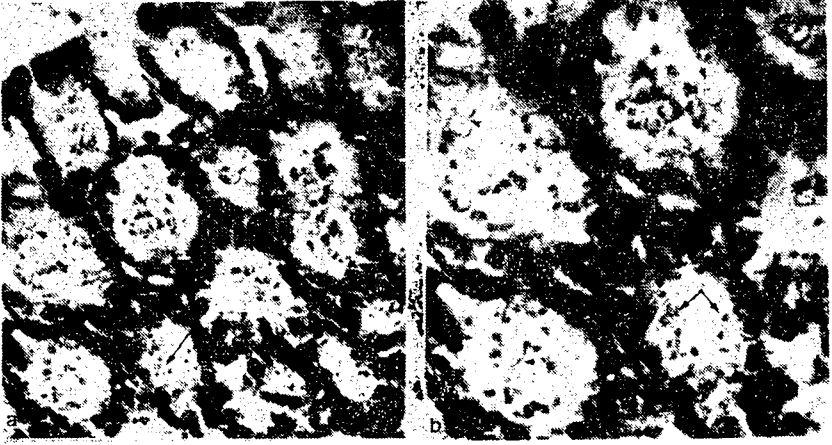
Histopatolojik olarak, bazı olgularda, mide yüzey epitel hücrelerinin (lamina epitelyalis) yer yer yassılaştığı ve kimi olguların prop-



Şekil 2. Mide yüzey epitelleriyle mide bez epitellerine tutunmuş ve lumende serbest olarak bulunan *cryptosporidium muris*'in gelişme evrelerinin görünümü (oklar). Fare. H.E., a) x420, c) x350, d) x270, Giemsa. b) x220.
(Endogenous developmental stages of *cryptosporidium muris* on the epithelial cells of the gastric glands and gastric epithelium (arrows)).



Şekil 3. Mide bez epitellerine tutunmuş ve lumende serbest olarak bulunan cryptosporidium muris'in gelişme evrelerinin görünümü. Fare. H. E., x1050. Gelişme evrelerinin içinde bulunduğu parazitofor vakuoller (oklar), sporlanmış oosistlerin içindeki sporozoitler (s), kısmen içe doğru bükülme gösteren oosistler (okbaşları). (The appearance of numerous free and embedded parasites to the epithelial cells of the dilated and fully filled gastric glands. Endogenous developmental stages of protozoan parasite within the parasitophorus vacuoles (arrows), sporozoites within the sporulated oocysts (s), sporulated oocysts partly collapsed (arrowheads)).



Şekil 4. Mide bez epitellerine tutunmuş ve bez lumenlerinde serbest olarak bulunan cryptosporidium muris'in gelişme evrelerinin görünümü. Rat. H. E., a) x350, b) x640.

Sporlanmış oosistler (okbaşları), diğer gelişme evreleri (oklar).

(The appearance of numerous free and embedded parasites to the epithelial cells of the gastric glands. Sporulated oocysts (arrowheads), the other developmental stages (arrows)).

ria mukozasında da, az sayıda mononükleer hücrelerin (lenfosit, histiyosit) bulunduğu dikkati çekti. Çok sayıda parazit protozoonu içeren bazı olguların bez lumenlerinin oldukça genişlediği, epitel hücrelerinin bir kısmında atrofinin şekillendiği ve dejeneratif bulguların geliştiği saptandı (Şekil 2,3,4). Böyle olgularda, bez epitel hücrelerinin değişen derecelerde küçüldüğü, yassılaştığı ve bazısının ise, gözden silindiği dikkati çekti. Bu alanlarda, mide bez lumenlerinin bu parazit protozoonun gelişme evreleriyle tamamen dolu olduğu görüldü (Şekil 2,3,4).

Sindirim kanalının incelenen diğer tüm bölümlerinde ise (özofagus, duodenum, jejunum, ileum, sekum veya kolonlar), enfeksiyona ait bulgulara rastlanmadığı saptandı.

Kobay ve tavşanlarda enfeksiyon: Oosistleri içeren inokulumlarla oral olarak enfekte edilen kobay ve tavşanlarda, inokulumun verilmesinden sonra günlük olarak gerçekleştirilen dışkı yoklamalarında, ilk 9 gün boyunca dışkılarda oosistlere rastlanılmadı. İzleyen günlerde ise, bu hayvanların otopsileri yapıncaya kadarki dışkı yoklamalarında, bu parazit protozoonun oosistlerine oldukça düşük düzeyde rastlanıldı.

Deneyler boyunca, deneye alınan ya da kontrol olarak tutulan kobay ve tavşanlarda klinik belirti gözlenmedi. Otopsi sırasında da makroskopik bir bulguya rastlanmadı.

Otopsileri yapılan kobayların elde edilen doku kesitlerinden yalnızca 4'ünün midesinde, oldukça sınırlı sayıda parazit protozoonlara rastlanıldı. Buna karşın tavşanlarda ise, dışkılarında oosistlere rastlanılmasına karşın, histopatolojik olarak, bu parazit protozoonlara ilgili herhangi bir bulguya rastlanılmadı. Parazit protozoonun gelişme evrelerinin gözleendiği 4 kobayın 3'ünde etkenler, mide yüzey epitellerinde tek tek ya da birkaçı bir arada sıralanmış olarak gözlenirken, geriye kalan bir kobayda ise, bu parazit protozoonun gelişme evrelerinin mide yüzeyiyle mide bez epitel hücre yüzeylerine tutunmuş olduğu görüldü (Şekil 5). Ancak, etkenler dışında, mide mukozasında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmadı.

Sonuç olarak, fare ve ratlarda bu enfeksiyona karşı, tipik histopatolojik bulgular gözlenirken, kobay ve tavşanlarda ise, bu parazit protozoona karşı duyarlılığın düşük düzeyde olduğu görüldü.



Şekil 5. *Cryptosporidium muris* oosistleriyle deneysel olarak enfekte edilmiş bir kobay midesinde parazit protozoonların görünümü (oklar). Giemsa, x310.
(The appearance of protozoan parasites in the guineapig stomach infected with cryptosporidium muris (arrows)).

Tartışma ve Sonuç

Cryptosporidium cinsi parazit protozoonlar ilk olarak, bu yılın başlarında Amerikalı Parazitolog E.E. Tyzzer tarafından (19,20, 21) tanımlanmıştır. Tyzzer 1907 yılında, laboratuvar farelerinin mide bez epitel hücrelerine yerleşen bu cinsin örnek türü, *Cryptosporidium muris*'i ilk olarak saptamış (19) ve 3 yıl sonra bu parazit protozoona ilgili çalışmasının ayrıntılarını bildirmiştir (20). Aynı araştırmacı 1912 yılında, laboratuvar farelerinin ince bağırsaklarında yerleşen ikinci bir türü tanımlamış ve *Cryptosporidium parvum* olarak isimlendirmiştir (21). Tyzzer (21), her iki türle transmisyon denemeleri gerçekleştirmiş ve *C. muris*'in daima mide bez epitel hücrelerine, *C. parvum*'un ise, sadece ince bağırsaklara yerleştiğini gözlemiştir; fareler için ve yerleşim yeri bakımından spesifik olarak belirttiği etkenlerden *C. muris*'in olgun evresi olan oosistlerin oval ve büyüklüklerinin 7x5 mikrometre, buna karşın *C. parvum* oosistlerinin ise, yuvarlak ve 4.5 mikrometre boyutunda olduğunu saptamış ve bu iki tür arasında belirgin bir farklılığın bulunduğunu bildirmiştir. Yaşam siklusundaki gelişme evrelerinin ve cinsine ait özelliklerin ayrıntılı açıklamalarını da kaydeden Tyzzer'in orijinal tanımlamaları (19,20,21), günümüze kadar fazla bir değişikliğe uğramayarak olduğu gibi kalmıştır. Bu tanımlamalar, laboratuvar hayvanlarında *cryptosporidium* enfeksiyonlarına ait ilk veriler olup, günümüze değin süregelen çalışmaların da esas başvuru kaynağını oluşturmuştur.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu çalışmada doğal olarak enfekte laboratuvar farelerinin dışkılarından izole edilerek transmisyon ve cross-transmisyon denemelerinde kullanılan oosistler, gerek konakçı türü ve gerekse oosist büyüklüğü ve yerleşim yeri bakımından, Tyzzer'in *Cryptosporidium muris* ile ilgili orijinal tanımlamalarına (19, 20) benzer bir görünüm sergilemiştir. Bu çalışmada kullanılan fare ve ratların bağırsak kesitlerinde, parazit protozoonun gelişme evrelerinin gözlenmemesine karşılık, bağırsak içerikleri ve dışkılarda çok sayıda parazit protozoonun olgun şekli olan oosistlerine rastlanılmıştır. Bağırsak içerikleri ve dışkılarda gözlenen bu oosistlerin hemen tamamının olgunlaşmasını tamamladığı görülmüştür. Böyle oosistlerin aynı zamanda mide bez epitel hücrelerindeki parazitofor vakuoller içinde de gözlenmesi, oosistlerin olgunlaşmalarını henüz mide bez epitel hücrelerindeyken tamamladığını kesin olarak ortaya koymuştur. Bu oosistlerin, oküler mikrometre yardımıyla gerçekleştirilen ölçümlerinde, ortalama 5.3x7.9 mikrometre çaplarda oldukları sap-

tanmıştır. Bu oosist büyüklüğünün, Tyzzer (20)'in laboratuvar farelerindeki 5x7 mikrometrelik, Upton-Current (26)'in sığırlardaki 5.6x7.4 mikrometrelik ölçüleriyle hemen hemen aynı, buna karşılık Iseki (9)'nin ratlardaki 8.4x6.3 mikrometrelik ölçümünden daha küçük olduğu görülmüştür.

Tyzzer (20)'in enfeksiyonu ratlara taşıyamaması ve fareler için spesifik olduğunu bildirmesine karşılık, bu çalışmada oosistler yoluyla enfeksiyon, fareler, arasında olduğu kadar farelerden ratlara taşınmış ve ratlar arasında da kolaylıkla taşınabildiği saptanmıştır. Ayrıca, kobay ve tavşanlara yapılan taşıma çalışmalarında, bu hayvanların bu parazit protozoona karşı düşük duyarlılık göstermiş olmalarına karşın, enfekte edilebildikleri tespit edilmiştir. Bu bakımdan Tyzzer (20)'in tek bir deneme dahilinde yürüttüğü transmisyon çalışmasıyla, bu parazit protozoonun konakçı spesifik olduğu kanıtlanamaz. Bununla birlikte, Tyzzer (19,20,21)'in *C. muris* ve *C. parvum*'u orijinal tanımlamaları ışığında, gerek konakçı türü, oosist büyüklüğü ve gerekse bu parazit protozoonun gelişme yerine dayanarak, laboratuvar farelerinin dışkılarından izole edilen ve bu çalışmada kullanılan *cryptosporidium*'un büyük tipini "*Cryptosporidium muris*" olarak dikkate almanın mantıklı olacağı kanısı ortaya çıkmaktadır. Ancak bu isimlendirme, Tyzzer'in belirttiği gibi (20) farelere özgü olduğu anlamını taşımamaktadır.

Tyzzer'in belirttiği (19,20) ve çeşitli araştırmacılarca (1,10) desteklediği gibi, bu çalışmada da, parazit protozoonların konakçı organizmasındaki yerleşim yeri, sıkı bir spesifiklik göstermiş ve parazit protozoonun gelişme evreleri, daima mide yüzey epitelleriyle mide bez epitellerinde saptanmıştır; sindirim kanalının incelenen diğer tüm bölümlerinde ise, parazit protozoonlara ait bir bulguya rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada; Tyzzer (19,20)'in bu yüzyılın başlarında laboratuvar farelerinin mide bez epitel hücrelerinde gözlediği parazit protozoonlar, yıllar sonra orijinal konakçısında, konakçıdaki aynı yerleşim yerinde ve benzer oosist bulgularıyla yeniden ortaya konmuş ve transmisyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Çeşitli hayvan türlerinde bildirilen ve *C. parvum*'un oluşturduğu bağırsak cryptosporidiosis'i bulgularını tanımlayan çok sayıdaki çalışmaya karşılık (2,6,11,16,17,24,25), bu çalışmada, *C. muris* tarafından oluşturulmuş mide cryptosporidiosis'i bulguları tanımlanmıştır. Bu bulgular, Tyzzer (21)'in *cryptosporidium* cinsi içinde 2 farklı tür ayrımını desteklemek-

te ve bu çalışmada tanımlanan cryptosporidium türünün "Cryptosporidium muris" olarak isimlendirilmesinin güvenliğini sağlamaktadır.

Doğal olarak enfekte laboratuvar farelerinin dışkılarından izole edilerek denemelerde kullandığımız *C. muris* oosistleriyle yapılan cross-transmisyon çalışmalarıyla elde edilen bulgular ışığında;

Bu parazit protozoonun, ülkemiz koşullarında yetiştirilen laboratuvar farelerinde doğal olarak bulunduğu ve gelişme evrelerinin, bu konakçı hayvanların daima midesine yerleştiği saptanmıştır. Bu parazit protozoonun oosistlerinin, midede olgunlaşarak dışkıya geçtiği ve fare, rat, kobay ve tavşanlara oral yolla verilmesinin, duyarlılıkları farklı olsa da, enfeksiyon oluşturma özelliğinde olduğu belirlenmiştir. Dışkılarda bu parazit protozoonun oosistlerinin, kuvvetli ışık kırıcı, düzgün duvarlı ve tam anlamıyla oval yapılı ve ortalama 5.3x7.9 mikrometre çaplarda olduğu gözlenmiş ve oosist büyüklüğüyle yerleşim yerine dayanarak, çoğunlukla konakçıların ince bağırsaklarına yerleşen ve oldukça fazla sayıda bildirilmiş olan *C. parvum*'dan ayrı olduğu teyit edilmiştir. *C. parvum*'da olduğu gibi bu türün de (*C. muris*) konakçıya özgü olmadığı ve benzer şekilde, bu türle oluşturulan enfeksiyonda da yaşla azalan bir duyarlılığın bulunduğu (Grafik 2) tespit edilmiştir.

Ayrıca bu parazit protozoonun, fare ve ratların midelerinde tipik histopatolojik bulgular oluşturmaya karşılık, klinik veya makroskopik olarak herhangi bir bulguya neden olmadığı görülmüştür. Bu bakımdan bu türün, subklinik enfeksiyonlara neden olduğu ve patojenitesinin, *C. parvum*'a oranla çok daha hafif olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte otoenfeksiyon nedeniyle, immun sistemi baskılanmış (ya da normal) bireylerde deneysel olarak uzun süreli enfeksiyonların oluşturulabilmesi, patojenitesinin aydınlatılabilmesi bakımından faydalı olacaktır. Ayrıca diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de bu enfeksiyonun insidensi saptanmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışma süresince Patoloji Anabilim Dalı'nda mevcut laboratuvar araç ve gereçleriyle makina ve teçhizat olanaklarından faydalanabilmememi sağlayan Anabilim Dalımız başkanı Sayın Prof. Dr. Cemalettin Köküuslu'ya, Patoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üye ve yardımcılarına, çalışmaya maddi destek sağlayan A.Ü. Araştırma Fonu Müdürlüğü'ne, deney hayvanlarını temin ettiğim Gülha-

ne Askeri Tıp Akademisi, Lalahan Atom Enerjisi Kurumu, Atatürk Orman Çiftliği ve Serum Çiftliği Müdürlüğü'yle Fakültemiz Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Dalı'na, parazitolojik yoklamaların teyitinde faydalandığım Protozooloji ve Entomoloji Bilim Dalı'na, tablo ve grafiklerin düzenlenmesinde emeği geçen Zootekni Anabilim Dalı'na ve ayrıca, Patoloji Anabilim Dalı'nın laborant ve yardımcı personeline teşekkürü borç bilirim.

Kaynaklar

1. Anderson, B.C. (1987). *Abomasal cryptosporidiosis in cattle*. Vet. Pathol., 24: 235-238.
2. Angus, K.W., Appleyard, W.T., Menzies, J.D., Campbell, I. and Sherwood, D. (1982). *An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs*. Vet. Rec., 110: 129-130.
3. Burgu, A. (1984). *Türkiye'de buzağlarda cryptosporidium'ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 31: 573-585.
4. Casemore, D.P., Sands, R/L. and Curry, A. (1985). *Cryptosporidium species a "new" human pathogen*. J. Clin. Pathol., 38: 1321-1336.
5. Current, W.L. (1985). *Cryptosporidiosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 187: 1334-1338.
6. Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B. and Weinstein, W.M. (1983). *Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons*. N. Eng. J. Med., 308: 1252-1257.
7. Fayer, R. and Ungar, B.L.P. (1986). *Cryptosporidium spp. and cryptosporidiosis*. Microbiol. Rev., 50: 458-483.
8. Heine, J. (1982). *Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot*. Zbl. Vet. Med. B., 29: 324-327.
9. Iseki, M. (1986). *Two species of cryptosporidium naturally infecting house rats, Rattus norvegicus*. Jpn. J. Parasitol., 35: 521-526.
10. Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. and Takada, S. (1989). *Infectivity of cryptosporidium muris (strain RN 66) in various laboratory animals*. Parasitol. Res., 75: 218-222.
11. Mason, R.W., Hartley, W.J. and Tilt, L. (1981). *Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat*. Aust. Vet. J., 57: 386-388.
12. Navin, T.R. and Juranek, D.D. (1984). *Cryptosporidiosis: Clinical, epidemiologic, and parasitologic review*. Rev. Infect. Dis., 6: 313-327.
13. O'donoghue, P.J. (1985). *Cryptosporidium infections in man, animals, birds and fish*. Aust. Vet. J., 62: 253-258.
14. Özkul, İ.A., Alçıgır, G., Karaer, Z. ve Kutsal, O. (1989). *Piliçlerde cryptosporidiosis*. VI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 26-29 Eylül, İstanbul-Türkiye.

15. Özkul, İ.A., Alçıgır, G. ve Karaer, Z. (1989). *Oğlaklarda cryptosporidiosis*. VI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 26-29 Eylül, İstanbul-Türkiye.
16. Reese, N.C., Current, W.L., Ernst, J.V. and Bailey, W.S. (1982). *Cryptosporidiosis of man and calf: A case report and results of experimental infections in mice and rats*. Am J. Trop. Med. Hyg., 31: 226-229.
17. Sherwood, D., Angus, K.W., Snodgrass, D.R. and Tzipori, S. (1982). *Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice*. Infect. Immun., 38: 471-475.
18. Tınar, R., Coşkun, Ş.Z., Doğan, H., Demir, S., Akyol, V.Ç., Aydın, L. and Sönmez, G. (1990). *Infectivity of cryptosporidium sp. isolated from calves for some mammals and chickens*. T. Parazitol. Derg., 14: 35-45.
19. Tyzzer, E.E. (1907). *A sporozeugon found in the peptic glands of the common mouse*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 5: 12-13.
20. Tyzzer, E.E. (1910). *An extracellular coccidium Cryptosporidium muris (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse*. J. Med. Res., 23: 487-509.
21. Tyzzer, E.E. (1912). *Cryptosporidium parvum (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse*. Arch. Protistenkd., 26: 394-412.
22. Tzipori, S. (1983). *Cryptosporidiosis in animals and humans*. Microbiol. Rev., 47: 84-96.
23. Tzipori, S., Angus, K.W., Campbell, I. and Gray, E.W. (1980). *Cryptosporidium: evidence for a single-species genus*. Infect. Immun., 30: 884-886.
24. Tzipori, S., Angus, K.W., Gray, E.W., Campbell, I. and Allan, F. (1981). *Diarrhea in lambs experimentally infected with cryptosporidium isolated from calves*. Am. J. Vet. Res., 42: 1400-1404.
25. Tzipori, S., Larsen, J., Smith, M. and Lugfl, R. (1982). *Diarrhoea in goat kids attributed to cryptosporidium infection*. Vet. Rec., 111: 35-36.
26. Upton, S.J. and Current, W.L. (1985). *The species of cryptosporidium (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals*. J. Parasitol., 71: 625-629.