

Kuzu enteritislerinde *Cryptosporidiosis* hastalığının patolojik yöntemlerle araştırılması*

Yusuf AKPINAR¹, Ertan ORUÇ²

¹Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Konya, ²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

Özet: Çalışmanın amacı kuzu ishallerinde önemli bir patojen olan *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) etkenlerinin bağırsak smearı ve parafin kesitlerden, Modifiye Ziehl-Neelsen (MZN), histopatoloji, immunohistokimya (İHK) ve immunofloresan (İF) boyama yöntemleri ile belirlemek ve *Cryptosporidiosis* hastalığının 30 günlüğe kadar olan kuzulardaki yaygınlığını ortaya koymaktır. Bu amaçla, ishal belirtisi gösteren ve agoni halde iken nekropsi yapılmış 60 adet ve yine ishal belirtisiyle ölmüş 85 adet (toplam 145 adet) kuzudan alınan bağırsak örnekleri kullanılmıştır. MZN boyama sadece, agoni halde iken nekropsileri yapılan 60 kuzudan alınan taze incebağırsak örneklerinden hazırlanan smear örneklerine yapılmıştır. Bu 60 örnekle birlikte ölü olarak getirilen 85 kuzudan (toplam 145) elde edilen incebağırsak örneklerinden hazırlanan parafin kesitlerden ise histopatoloji, İF ve İHC boyamaları prosedürüne uygun olarak yapıldı. MZN boyamalarda (60 örnek) %13.3 oranında *Cryptosporidium spp.*, parafin blokları hazırlanan toplam 145 örnekten alınan kesitlerin IF ve İHC boyamalarda ise %13.8 oranında *C. parvum* pozitif reaksiyon gözlenmiştir. Etken tespit edilen bağırsak kesitlerinin histopatolojik incelemelerinde; değişen derecelerde olmak üzere; epitel hücrelerinde nekroz, deskuamasyon ve villuslarda kütleşme, epitel yüzeyi boyunca *Cryptosporidium spp.* etkenleri, propria mukozada hiperemi ve mononükleer hücre infiltrasyonu, kript epitelinde mitoz artışı, lenfatik kanalda genişleme, intraepitelyal lenfositler ve bazı örneklerde *Eimeria spp* gözlemlendi. Sonuç olarak çalışmada İF, İHC ve MZN boyamalarının kuzularda *Cryptosporidiosis* hastalığını ortaya koymada etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *C. parvum*, *Cryptosporidiosis*, enteritis, histopatoloji, immunofloresan, immunohistokimya.

Examination of *Cryptosporidiosis* in lamb enteritis by pathological methods

Summary: The aim of this study is to determine *C. parvum* in small intestinal samples of lambs (up to 30 days old) with enteritis. For this aim, fresh intestinal smears prepared from 60 lambs (euthanized due to diarrhea) and stained with Modified Ziehl-Neelsen (MZN). In addition to these 60 fresh samples, 85 different small intestinal samples obtained from dead lambs (total 145 small intestinal samples) were embedded in paraffin for histopathology, immunofluorescence (IF) and immunohistochemistry (IHC). Slides were stained according to protocols (MZN, hematoxylin-eosin, IHC and IF). In MZN staining, 13.3% of smear samples were found positive for *Cryptosporidium spp.* Besides, *C. parvum* positivity was detected in the rate of 13.8% in IF and IHC stains. In the histopathologic examination, desquamation and necrosis of intestinal epithelium, villus atrophy, *Cryptosporidium spp.* along the surface of villus epithelium, hyperemia, mononuclear cellular infiltration, mitosis in crypt epithelium, intraepithelial lymphocytes, dilatation in the lymphatic canal and *Eimeria spp.* in some cases were observed in varying degree. In conclusion, IF, IHC and MZN stains were found effective in revealing cryptosporidiosis in lambs.

Keywords: *C. parvum*, *Cryptosporidiosis*, enteritis, histopathology, immunofluorescence, immunohistochemistry.

Giriş

Cryptosporidiosis, birçok hayvan türü ve insanda Apicomplexa sınıfına ait koksidiyal bir protozoon olan *Cryptosporidium*'lar tarafından oluşturulan, özellikle ruminantların neonatal dönemlerinde etkisini gösteren ve aynı zamanda zoonoz karakterli bir enfeksiyondur (7, 8, 14, 31). Merogoni, gametogoni ve sporogoni dönemleri enfekte epitel hücrelerinin fırçamsı kenarlarında gelişen

etkenler, konakçının hücre membranı ile çevrili vakuoller içinde bulunurlar (5). Sporozoit membranında bulunan özel bir protein olan CP47, epitel hücreleri boyunca fırçamsı kenarda yer alan hedef hücrelerdeki bir glikoprotein olan P57 aracılığı ile hedef hücrelere bağlanır (26). *C. parvum* kuzularda alt jejunum ve ileumda yerleşirken, şiddetli olgularda sekum, kolon ve rektuma kadar yayılabilir (7).

* Birinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiş olan bu çalışma, Atatürk Üniversitesi BAP Birimi tarafından (2013/32) desteklenmiştir. Çalışma, VETİstanbul Group Congress-2015, 07-09 April 2015, St. Petersburg, Russia'da poster olarak sunulmuştur.

Cryptosporidiosis genç ruminantlarda çoğunlukla enterotoksijenik *E. coli*, rotavirus ve coronavirus ile birlikte bulunacağı gibi primer patojen olarak da etkili olabilir (5, 10). İntestinal Cryptosporidiosis tüm türlerde değişen derecede villus atrofi ile kendisini gösterir. Mukoza epiteli çoğu zaman kübik, yuvarlak ya da kısa prizmatik değişikliğe uğrar. Villus epitelinin mikrovillus yüzeyi boyunca çok sayıda *Cryptosporidium spp.* görülebilir. Böylece absorptif hücre yüzeyleri büyük oranda cryptosporidium etkenleri tarafından tutulmuştur. Mukoza yüzeyinde olgunlaşmamış epitel hücre popülasyonunda artış vardır. Başta prostoglandinler olmak üzere yangısal mediatörlerin salgılanması mukozal sekresyonu ve epitel hücrelerinin permeabilitesini arttırmıştır. Villus atrofi ile birlikte gelişen absorpsiyon bozukluğuna bağlı olarak ishal gelişir (5, 25). Günümüzde genom dizi analizleri tam olarak ortaya konulan türler *C. parvum* ve *C. hominis* olup *C. xiaovi*, *C. bovis*, *C. ubiquitum* türler de son yıllarda yaygınlığı bakımından çalışma konusu olmaktadır (14, 15).

Sunulan çalışma, Konya ve çevresinde ishal bulgusu gösteren kuzularda (30 günlüğe kadar), MZN, histopatoloji, İHK ve İF boyama yöntemleri ile *C. parvum* teşhisi yapmak ve ishalleri kuzularda Cryptosporidiosis hastalığının yaygınlığını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (31.05.2013/2) tarafından çalışmanın yürütülmesi uygun görülmüştür.

Çalışma materyali: Konya ve çevresinde 129 farklı sürüden, 2013-2014 yıllarında, işletme sahiplerinin verdiği anamnez bilgileri doğrultusunda, yaşları 30 günlüğe kadar olan 85'i ishal belirtisiyle ölmüş, 60'ı ise klinik olarak ishal bulgusu gösterip agoni halinde ötenazi ve nekropsi yapılan, toplam 145 adet kuzudan elde edilmiş ince bağırsak örnekleri, çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

MZN boyaması: MZN boyama agoni haldeyken nekropsi yapılan 60 kuzudan taze hazırlanmış ince bağırsak mukozası kazıntı örneklerine uygulanmıştır. Metil alkol ile tespit edilen kazıntı örnekleri ticari temin edilen boyama seti (ZIEHL-NEELSEN modified for Cryptosporidium, Bio-optica, 04-110803, İtalya) ile protokolüne uygun olarak boyanmıştır.

Histopatoloji İşlemleri: Agoni halde getirilmiş ishalleri (60 kuzu) ve ishal belirtisiyle ölmüş (85 kuzu) toplam 145 kuzudan alınan ince bağırsak örnekleri %10'luk tamponlu formalin solusyonunda tespit edildi. Rutin histopatoloji takip işlemleri sonrasında hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoxilen-eozin (HE) ile boyama yapıldı.

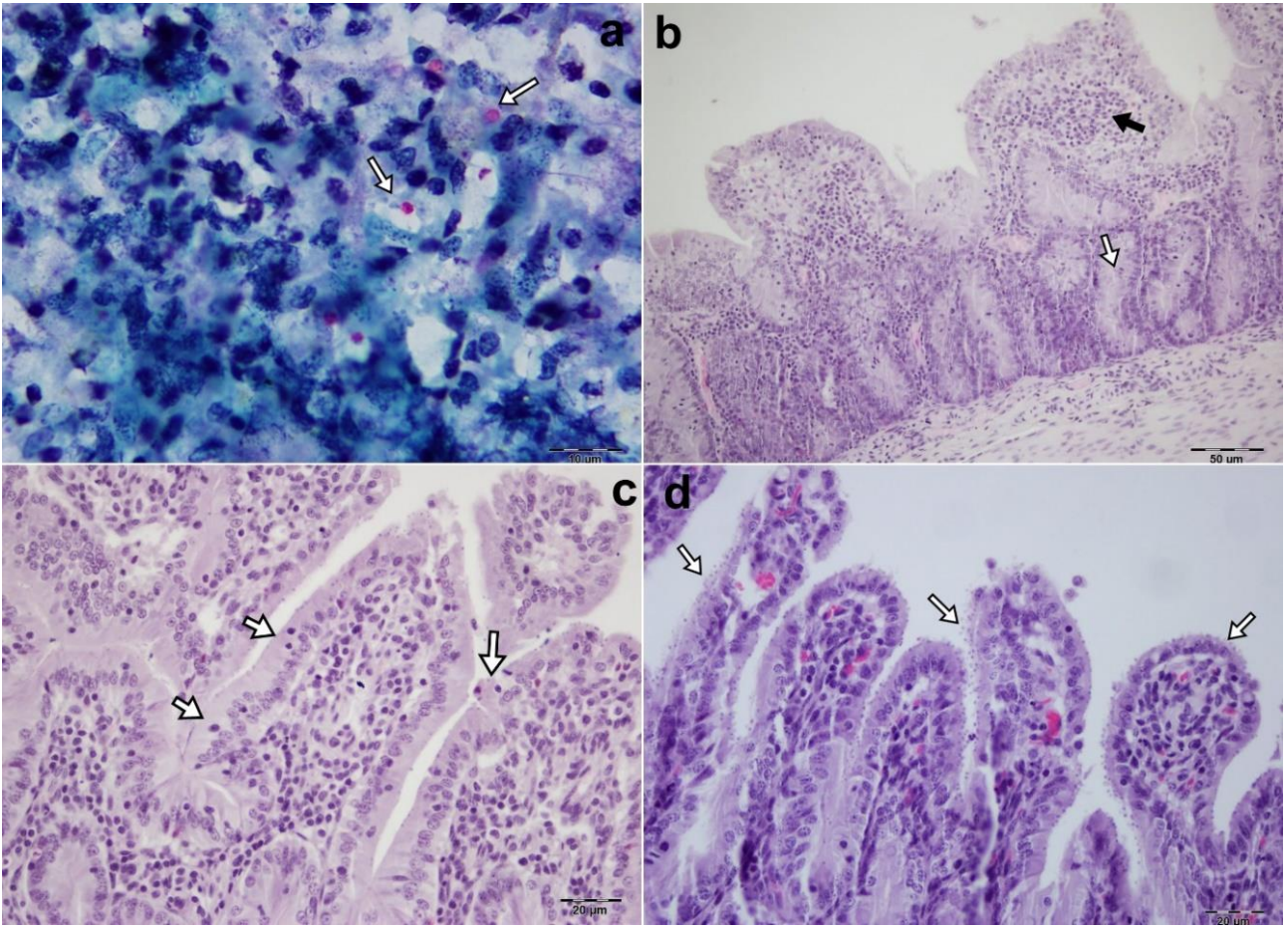
İHK boyama: parafin blokları hazırlanmış 145 örnekten mikrotomla alınan 5 mikronluk kesitler, 3x5 dk. ksilol serisinden geçirilerek deparafinize edildi. Rehidrasyon için 2x2 dk. 99°, 1dk. 96° alkol kullanıldı ve distile suda yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitlere nemli ortamda 10 dakika süre ile %3'lük H₂O₂ uygulandı. Daha sonra dokular 2 defa 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarma işlemi için 3x5 dk. 500 watt'da sitratlı tampon çözeltisi (10mM sitrik asit, %0.05 Tween 20, pH6) uygulandı. Bu aşamadan sonra kesitler sitratlı tampon çözeltisi içerisinde oda ısısına gelene kadar bekletildi. İki kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkanana örneklerin üzerini kaplayacak şekilde protein bloklama solüsyonu eklenerek oda ısısından 5 dakika bekletildi. Protein bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin üzerine antikor dilüsyon buffer (Dako S0809, Carpinteria CA, ABD) ile 1/50 (1/50, 1/100 ve 1/500 ön denemeleri yapılmıştır) oranında sulandırılmış primer antikor (*Cryptosporidium parvum* antibody, BDI370, mouse monoclonal IgG1, Santa Cruz Biotechnology, Katolog no: sc-57693) konuldu ve 37°C de 45 dakika inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonu takiben primer antikor uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı (2 kez 5 dakika). Biotinlenmiş sekonder antikor ile oda ısısında 10 dakika muamele edilen kesitler tekrar PBS ile yıkandı (2 kez 5 dakika). Sonrasında streptavidin-peroksidaz ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitler 3,3-diaminobenzidine (DAB) ile muamele edildi. Çeşme suyu ile yıkanan kesitler Mayer's hematoxylin ile 45 saniye boyandı. Alkol ve ksilol serileri sonrasında lamel ile kapatıldı.

İF boyama: İHK boyamada uygulanan prosedürün primer antikor ile inkubasyon ve PBS yıkama kısmına kadar olan bölümü İF boyamada da benzer şekilde uygulandı. Bu aşamadan sonra dokular 1/20 oranında sulandırılmış Goat anti Mouse Ig FITC (Biox, Katalog No. BIO156) ile inkubasyona bırakıldı (37°C de 45 dakika). Tekrar PBS ile yıkanan (5 dakika) kesitlerin üzerine gliserin damlatılıp, lamel ile kapatıldı.

Mikroskopik incelemeler: MZN, HE ve İHK boyanmış tüm kesitler ışık mikroskopunda (DP72 kameralı Olympus BX51, Tokyo, JAPONYA), İF boyamalar ise floresan mikroskopta (Carl Zeiss axioskop A1, Colibri 2 led fluorescence) incelendi.

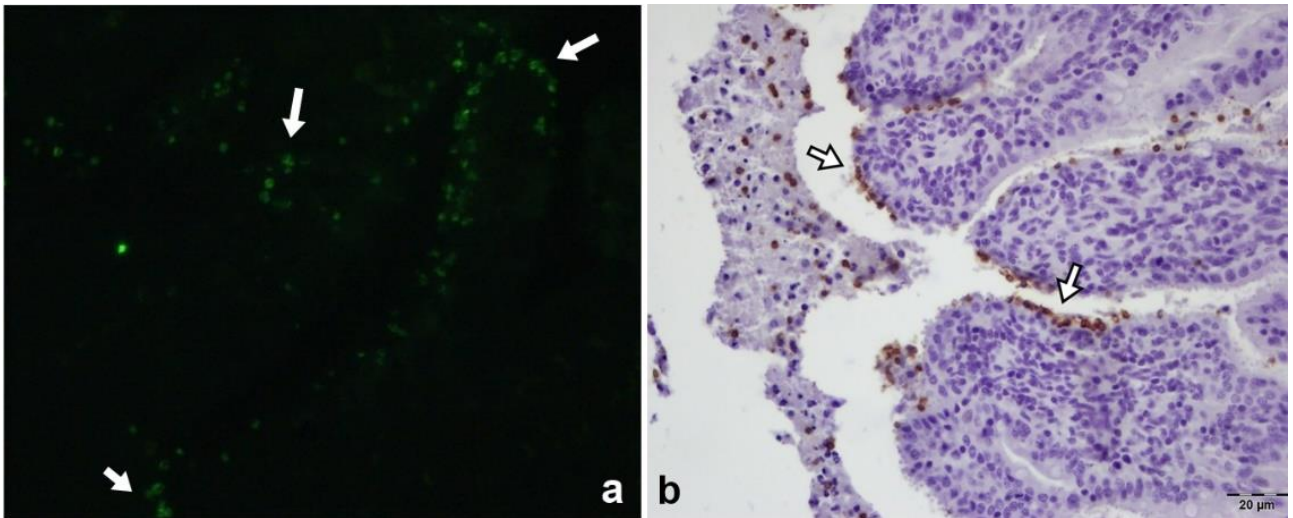
Bulgular

MZN boyama sonuçları: Taze elde edilmiş 60 adet ince bağırsak smearlarının MZN boyamalarında, 8 örnekte (%13.3) *Cryptosporidium spp.* pozitiflik tespit edildi. Koyu pembe ile açık kırmızı tonlarda boyanma özelliği gösteren etkenler yuvarlak yapılı, 3-4 mikron çapında ve kümelenme özelliği göstermeden, dağınık olarak yayıldıkları görülmüştür (Şekil 1a).



Şekil 1. a) *Cryptosporidium spp.* (oklar), İnce bağısak smeari. MZN boyama, Bar=10µ. b) villuslarda kütleşme, propriyada yangısal hücre infiltrasyonu (siyah ok) ve kript epitelinde mitoz (beyaz ok), HE, Bar=50µ. c) İntraepitelyal lenfositler (oklar), HE, Bar=20µ. d) villus epitel yüzeyi boyunca *Cryptosporidium spp.* gelişim evreleri (oklar), HE, Bar=20µ.

Figure 1. a) *Cryptosporidium spp.* distributed with intestinal epithelium and inflammatory cells (arrows), small intestine smear. MZN, Bar=10µ. b) Atrophic villi, inflammatory cell infiltration within the propria mucosae (black arrow) and mitosis in crypt epithelium (white arrow), HE, Bar=50µ. c) Intraepithelial lymphocytes (arrows), HE, Bar = 20µ. d) Developmental stages of *Cryptosporidium spp.* along the villi's epithelial surfaces (arrows), HE, Bar = 20µ.



Şekil 2. a) Parafin kesitlerde pozitif reaksiyon. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, Goat anti Mouse Ig FITC. b) Parafin kesitlerde villus epitel yüzeyi boyunca ve eksudatta *C. parvum* pozitif reaksiyon. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, streptavidin- peroksidaz, DAB kromojen ve Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama. Bar = 20µ.

Figure 2. a) Positive reaction in paraffin sections. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, Goat anti Mouse Ig FITC. b) Positive reaction along surface of villus epithelium and exudate in paraffin sections. *C. parvum* antibody-mouse monoclonal IgG1, streptavidin-peroxidase, DAB chromogen and counterstaining with Mayer's hematoxylin. Bar = 20µ.

Tablo 1. İHK ve İF sonuçlarına göre *C. parvum* pozitif ve negatif olgularda histopatolojik bulguların oranları
Table 1. The rate of histopathological changes in *C. parvum* positive and negative cases according to IHC and IF.

Histopatolojik değişiklik	<i>C. parvum</i> (+) örneklerde (n=20)		<i>C. parvum</i> (-) örneklerde (n=125)	
	Görülme sayısı	%	Görülme sayısı	%
Propriyada hiperemi	14	70	106	84.8
Propriada nötrofil granülosit	3	15	21	16.8
Propriada eozinofil granülosit	10	50	27	21.6
Propriyada mononükleer hücre	18	90	88	70.4
Epitel hücre deskvamasyonu	15	75	84	67.2
Villus epitelinde nekroz	17	85	39	31.2
Villuslarda kütleleşme	12	60	56	44.8
Lenfoid dokuda azalma	2	10	29	23.2
İntraepitelyal lenfosit	14	70	67	53.6
Kript epitelinde mitoz	13	65	71	56.8
Lenfatik kanallarda genişleme	6	30	11	8.8
Eimeria sp.	3	15	11	8.8

Histopatoloji sonuçları: Villuslarda kütleleşme ve kript epitelinde mitoz artışı (Şekil 1b), villus epitelinde nekroz ve deskvamasyon, propriada hiperemi, nötrofil, eozinofil ve mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 1b), lenfatik kanallarda genişleme, intraepitelyal lenfositler (Şekil 1c), peyer plakları lenfoid dokusunda azalma dikkati çekti. Villus epitel hücre yüzeyleri ve yer yer kript çevrelerinde ise *Cryptosporidium spp.* lokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 1d). Histopatolojik incelemelerde bazı kesitlerde *Eimeria spp.* saptandı.

İHK ve İF boyama sonrası *C. parvum* pozitif olarak tespit edilen 20 ve diğer negatif bulunan 125 ince bağırsak örneğinde tespit edilen histopatolojik değişiklikler Tablo 1'de sunulmuştur.

İF ve İHK bulguları: Kesitlerin İF incelemelerinde 20 örnekte (%13.8) pozitif reaksiyon elde edildi (Şekil 2a). Pozitif boyanmalar tipik olarak zincir şeklinde sıralanma göstermekteydi. İHK boyamalarda da İF boyamalarda olduğu gibi 20 örnekte (%13.8) pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 2b). Pozitif reaksiyon veren antijenik lokalizasyonların bağırsak villuslarının epitel yüzeyi boyunca dizildiği dikkati çekti. Benzer boyanmalar eksudat içerisinde ve daha sınırlı düzeyde kript epitel çevresinde de gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de neonatal kuzu problemleri üzerine yapılan bir çalışmada morbidite oranı % 48.6 olarak belirlenmiş, bunların içerisinde ishal olgularının ise % 15.4 ile en başta yer aldığı bildirilmiştir (12). Cryptosporidiosis erken dönem kuzu ishallerinin en önemli sebeplerinden birisi olarak görülmektedir (4, 12). Neonatal dönem olarak kabul edilen 0-28. günler arasında ishalleri kuzuların dışkı örneklerinde yapılan bir çalışmada; *E. coli* F5 % 10.5, *E. Coli* O157 % 10.9, *C. parvum* % 21.05,

rotavirus %5.3, coronavirus %21.4 oranında belirlenmiştir (12). Munoz ve ark (20) tarafından yapılan başka bir çalışmada da *C. parvum* %45, *E. coli* %48, rotavirus %8.1, *Cl. perfringens* %10.8 olarak belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına bakıldığında Cryptosporidiosis'in erken dönem kuzu sağlığı açısından önemli bir hastalık olduğu dikkati çekmektedir.

Türkiye'de kuzularda Cryptosporidiosis üzerine yapılan araştırmalar incelendiğinde; ilk olarak Özer ve ark (23) ishalleri kuzuların dışkı muayenesinde %12 oranında *Cryptosporidium* oökisti tespit etmişlerdir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise; İzmir yöresinde %23.3 (9), Aydın yöresinde %46.5 (34) oranlarında rapor edilmiştir. Konya merkez ve köylerinde yapılan diğer bir çalışmada MZN yöntemiyle %2.97, ELISA ile %9,13 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (30). Bu verilere ilave olarak, hastalık Van yöresinde %13.63 (22), Kars yöresinde ise iki farklı çalışmada %21.05 (13) ve % 38.8 (29) oranlarında rapor edilmiştir. Dışkı örnekleri veya seroloji ağırlıklı olarak yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre, Türkiye'de ishalleri kuzularda Cryptosporidiosis oranının, %2.97 ile %46.5 arasında oldukça değişkenlik gösterdiği dikkati çekmektedir. Araştırma sonuçlarının farklılık göstermesinde örnekleme şekilleri, alındığı dönem ve metod farklılıkları gibi faktörlerin sonuçlar üzerine etkili olduğu söylenebilir. Sunulan çalışmamızda şüpheli bağırsak kesitlerinin İF ve İHK boyamalarında % 13.8 oranında *C. parvum* antijen varlığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda örnek toplama işleminin belirli bir periyoda yayılması, farklı sürülerden toplanması ve doku düzeyinde teşhisinin yapılması sebebiyle araştırma sonuçlarımızın da hastalığın durumunu ortaya koyması bakımından değerli olduğu düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda, enfeksiyon görülme sıklığının, hastalanma yaşı ile yakın ilişkili olduğu ortaya konulmuş,

hastalıktan etkilenme yaşının kuzularda en çok 1-21. günler olduğu 30. günden sonra ise azaldığı bildirilmiştir (6, 10). Sevinç ve ark (30) tarafından yaş gruplarına göre ayırdıkları 300 buzağı üzerinde yapılan bir çalışmada, hastalığın görülme oranı, 1-10 günlüklerde %50.75; 10-20 günlüklerde %35.71; 20-30 günlüklerde %25.45; 30-45 günlüklerde %14.71 ve 45 günden büyüklerde ise %13.24 oranında bildirilmiştir. Giadinis ve ark (11) da Kuzey Yunanistan'da 54 ayrı sürüden 4-15 günlük 292 oğlaktan topladıkları dışkı örneklerinde örneklerde *Cryptosporidium spp.* ookist oranını %76.4 olarak bildirmişlerdir. Arslan ve ark (2) ise 6 aydan küçük kuzu ve oğlaklarda *Cryptosporidium spp* oranını %9.6 olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmamızda 30 günlüğe kadar olan ishallerde kuzularda *Cryptosporidium parvum* oranı %13.8 olarak belirlenmiştir.

*Cryptosporidium*ların merogoni, gametogoni ve sporogoni dönemleri enfekte epitel hücrelerinin fırçası kenarlarında yerleştiği, villus atrofsisi ile birlikte gelişen absorpsiyon bozukluğunun ishalin temel sebebi olduğu belirtilmiştir. Bu durumda absorptif hücre yüzeylerinin büyük oranda *Cryptosporidium* etkenleri tarafından işgal edildiği, mukoza yüzeyinde olgunlaşmamış epitel hücre popülasyonunda artış olduğu ve başta prostoglandinler olmak üzere yangısal mediatörlerin salgılanmasını, mukozal sekresyonu ve epitel hücrelerinin permeabilitesini artırdığı bildirilmiştir (5). Araştırmamızda histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde, bağırsak değişikliklerin özellikle epitel hücrelerinde nekroz, deskuamasyon ve villuslarda kütleleşme, propria hiperemi, nötrofil, eozinofil ve mononükleer hücre infiltrasyonları, intraepitelyal lenfosit, kript epitelinde mitoz artışı, lenf kanallarında genişleme ve bazı olgularda lenfoid doku kayıpları olduğu gözlenmiştir. *Cryptosporidium* etkenlerinin ise, tipik olarak enfekte hücrelerin mikrovillus kenarlarında yerleştiği dikkati çekmiştir. Araştırmada gözlemlenen mikroskopik bulgular önceki araştırma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (3, 5, 19). Histopatolojik değişikliklerin daha çok epitel bölgesinde olmasının sebebi etkenin biyolojisi ile ilişkilendirilebilir. Enfeksiyonun durumunu, bireysel direnç yanında birlikte seyredebileceği *E. coli*, rotavirus ve coronavirus ile oluşabilecek mikroskobik enfeksiyonlar da etkileyebileceğinden dolayı (2, 4, 13, 20) araştırmamızda gözlemlenen histopatolojik bulguların ne düzeyde *C. parvum* enfeksiyonu ile ilişkili olduğu hakkında bir fikir yürütmek zor olacaktır. Tüm bunların yanında ana amacı ishallerde kuzuların bağırsak kesitlerinde *C. parvum* antijenlerini belirlemek olan araştırmamızda, etken tespit edilen bağırsak kesitlerinin histopatolojik değerlendirmesinde, villuslarda kütleleşme, epitel kaybı, eozinofil ve mononükleer hücre artışı, intraepitelyal lenfositler, kript epitelinde mitoz artışı ve lenfatiklerde genişleme öne çıkan bulgular olarak dikkati çekmiştir.

Cryptosporidiosis tanısı için en güvenilir yöntem olarak, dışkı örneğinde ookistlerin görülmesi veya

antijenlerinin belirlenmesi olarak bildirilmiştir (21). Ookist tespiti için dışkı örneklerinin Ziehl-Neelsen yanında Auramine boyamalarının da oldukça etkili hatta daha pratik olduğu Kuhurana ve ark (16) tarafından rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Sevinç ve ark (32) tarafından yapılan bir araştırmada, aynı dışkı örneklerinde MZN yöntemiyle %2.97, ELISA tekniği ile %9.13 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Bu sonuç doğrultusunda dışkı örneklerinden MZN yöntemi ile hastalık teşhisinin yetersiz kaldığı düşünülebilir. Bu hipotezi destekleyici olarak, klinik gözlemlerde asemptomatik olan bazı hayvanlarda, ookist saçılımının yetersiz olduğu durumlarda ookist tespitinin de zor olduğu belirtilmektedir (21). Çalışmamızda dışkı örneğinden farklı olarak, smearlar doğrudan bağırsak mukoza kazıntılarından hazırlanmıştır. Bu yolla taze hazırlanan 60 smear örneğinin MZN boyamalarında %13.3 oranında etken tespit edilmiştir. Bu sonuç doku kesitlerinden yapılan İHK ve İF boyama sonuçlarına da (%13.8) oldukça yakın bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, özellikle nekropsi sırasında taze hazırlanacak ince bağırsak smearları üzerine yapılacak MZN boyamalarının, hastalığın teşhisinde etkili olacağı öngörülmektedir. Bağırsak smearlarının MZN boyamalarının ışık mikroskopik incelemelerinde, dışkı boyamalarına benzer şekilde (8,17) etkenlerin pembe-kırmızı renkte, morfolojik olarak oval-yuvarlak şekilli olup, kümelenme göstermeden dağınık yayıldıkları görülmüştür.

Önceki yapılan çalışmalarda *C. parvum* antijenlerinin İF ile teşhisine yönelik çalışmaların genelde dışkı örneklerinden (1, 27, 28, 33) daha az olarak da parafin kesitlerden (3) yapıldığı görülmektedir. Çalışmamızda da parafin kesitlerinden yapılan İF boyamaları %13.8 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. *C. parvum* lokalizasyonlarına enfekte hücre yüzeyleri boyunca tespit edilmiş ve bu bulgular Bejan ve ark (3) ile uyumlu bulunmuştur. Araştırmamızda doku kesitlerinin İHK boyamalarında da İF boyamalarla uyumlu olarak %13.8 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Pozitif reaksiyon veren antijen lokalizasyonlarının villus epitel hücreleri boyunca dizildiği dikkati çekmiş ve önceki çalışmalarla (18, 24) uyumlu bulunmuştur. Çalışmada kullanılan primer antikörün İHK ve İF boyamalar için 1/50 sulandırmasında daha etkili sonuçlar alınmıştır.

Sonuç olarak, Konya ve çevresinde ishal sebebiyle ölmüş 30 günlüğe kadarki kuzularda *C. parvum* oranı %13.8 olarak belirlenmiştir. Bağırsak smearlarının MZN boyamaları ile birlikte İHK ve İF boyamaların benzer sonuçlar verdiği ve histopatolojik tanıyı kesinleştirmek için her üç testin de etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Arrowood MJ, Sterling CR (1989): *Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for Cryptosporidium oocyst detection.* J Clinical Microbiol, **27**, 1490-5.

2. **Arslan S, Öncel T, Malal ME et al.** (2016). *Bacteriological, virological and parasitological etiology in diarrhea cases in determined in post-mortem lambs and kids in Marmara region.* Van Vet J, **27**, 147-152.
 3. **Bejan A, Bolfa P, Magdas C** (2011): *Morphological, histopathological and immunofluorescence characterization of Cryptosporidium parvum natural infection in goat kids from Romania.* Acta Vet, **61**, 609-619.
 4. **Bilal T, Bilal T** (2005): *Koyun-Keçilerin İç Hastalıkları ve Beslenmesi.* İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul, 17-21.
 5. **Brown CC, Baker DC, Barker IK** (2007): *Alimentary system.* 274-277. In: MG Maxie (ed) *Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* Saunders/Elsevier, Philadelphia.
 6. **Casuape AC, Quilez J, Acedo CS** (2002): *Prevalence and analysis of potential risk factors for Cryptosporidium parvum infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain).* Vet Parasitol, **104**, 287-98.
 7. **Coop RL, Wright SE** (2003): *Cryptosporidiosis and Coccidiosis.* 153-155 In: WB Martin, ID Aitken (ed) *Diseases of Sheep.* 3th ed, Blackwell Science, Philadelphia, USA, 2003.
 8. **Elmadawy RS, Mohamed S, Yasser FE** (2017): *Prevalence, electron microscopy and molecular characterization of Cryptosporidium species infecting sheep in Egypt.* J Adv Vet Res, **7**, 47-52.
 9. **Erman N, Beyazit A, Oz I** (2000): *Prevalence of Cryptosporidiosis in lambs and goat kids in İzmir province.* Bornova Vet Kont Araş Enst Derg, **25**, 33-38.
 10. **Fayer L, Xiao L** (2008): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis,* Taylor and Francis Group, Florida.
 11. **Giadinis D, Papadopoulos E, Lafi SQ et al.** (2015): *Epidemiological observations on cryptosporidiosis in diarrheic goat kids in Greece.* Vet Med Int, <https://doi.org/10.1155/2015/764193>
 12. **Gökçe E, Erdoğan HM** (2009): *An epidemiological study on neonatal lamb health.* Kafkas Üniv Vet Fak Derg, **15**, 225-236.
 13. **Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM** (2010): *İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi.* Kafkas Üniv Vet Fak Derg, **16**, 717-722.
 14. **İnci A** (2013): *Siğirlarda Cryptosporidiosis.* 135-142 In: MA Özcel (ed). *Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri,* İzmir.
 15. **Kaupke A, Michalski MM, Rzezutka A** (2017). *Diversity of Cryptosporidium species occurring in sheep and goat breeds reared in Poland.* Parasitol Research, **116**, 871-879.
 16. **Khurana S, Sharma P, Sharma A et al.** (2012): *Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis.* Trop Parasitol, **2**, 20-23.
 17. **Laatamna A, Belkessa S Khalil A et al.** (2018): *Prevalence of Cryptosporidium spp. in farmed animals from steppe and high plateau regions in Algeria.* Trop Biomed, **35**, 724-735.
 18. **Loose JH, Sedergran DJ, Cooper HS** (1989): *Identification of cryptosporidium in paraffin-embedded tissue sections with the use of a monoclonal antibody.* American J Clinical Pathology, **91**, 206-209.
 19. **Milli ÜH** (1997): *Sindirim sistemi.* 132-134, In: ÜH Milli, R Hazroğlu (ed) *Veteriner Patoloji, Tamer Matbaacılık,* Ankara.
 20. **Munoz M, Alvarez M, Lanza I et al.** (1996): *Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain.* Epidemiol & Infect, **117**, 203-211.
 21. **OIE Terrestrial Manual** (2015): *Cryptosporidiosis.* Erişim adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPTO.pdf Erişim tarihi: 02.05.2015.
 22. **Ozdal N, Tanrıtanır P, Göz Y et al.** (2009): *Parasitic protozoans (Eimeria, Giardia, and Cryptosporidium) in lambs with diarrhoea in the Van province.* Bull Vet Inst Pulawy, **53**, 47-51.
 23. **Ozer E, Erdogmus SZ, Koroglu E** (1990): *Investigation on the incidence of Cryptosporidia of calves and lambs in Elazığ vicinity.* Turk J Vet Anim Sci, **14**, 439-445.
 24. **Özmen Ö, Serpin N, Jamshidi K** (2016): *Kuzu ve oğlaklarda kriptosporidioziste patolojik ve immunohistokimyasal bulgular.* MAE Vet Fak Derg, **1**, 7-13.
 25. **Paul S, Sharma DK, Boral R et al.** (2014) *Cryptosporidiosis in goats: a review.* Adv Anim Vet Sci, **2**, 49-54.
 26. **Perkins ME, Riojas YA, Wu TW et al.** (1999): *CpABC, a Cryptosporidium parvum ATP-binding cassette protein at the host-parasite boundary in intracellular stages.* Proc Natl Acad Sci USA, **96**, 5734-5739.
 27. **Quilez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A et al.** (1996): *Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of Cryptosporidium oocysts in faecal specimens from cattle and pigs.* Vet Parasitol, **67**, 75-81.
 28. **Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM et al.** (1989): *Detection of Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies.* J Clinical Microbiol, **27**, 1135-6.
 29. **Sarı B, Arslan MO, Gıcık Y et al.** (2009): *The prevalence of Cryptosporidium species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors.* Trop Anim Health Prod, **41**, 819-826.
 30. **Sevinc F, Irmak K, Sevinç M** (2003): *The prevalence of Cryptosporidium parvum infection in the diarrhoeic and non-diarrhoeic calve.* Rev Med Vet, **5**, 357-361.
 31. **Sevinç F, Dik B** (2010): *Cryptosporidiae.* 155-161, In: N Dumanlı, Z Karaer (ed) *Veteriner Protozooloji,* 1. Baskı, Medisan, Ankara.
 32. **Sevinç F, Uslu U, Derinbay Ö** (2005): *The prevalence of Cryptosporidium parvum in lambs around Konya.* Turk J Vet Animal Sci, **29**, 1191-1194.
 33. **Stibbs HH, Ongerth JE** (1986): *Immunofluorescence detection of Cryptosporidium oocysts in fecal smears.* J Clinical Microbiol, **24**, 517-21.
 34. **Ulutaş B, Voyvoda H** (2004): *Cryptosporidiosis in diarrhoeic lambs on a sheep farm.* Türkiye Parazitol Derg, **28**, 15-17
- Geliş tarihi: 12.06.2018 / Kabul tarihi: 01.03.2019
- Yazışma Adresi:**
 Prof. Dr. Ertan ORUÇ
 Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
 Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı,
 Alaeddin Keykubat Kampüsü,
 42103, Selçuklu, Konya, Türkiye
 Telefon: +90 332 2232734
 e-mail: ertanoruc@selcuk.edu.tr