

***Giardia Duodenalis* ile İnfekte Buzağlarda Doğal Kist Saçılımı**

Natural Cyst Shedding in Calves Infected with *Giardia Duodenalis*

Özet

Bu çalışma saha koşullarında Aydın yöresindeki farklı ilçelerde ishaller ve *Giardia duodenalis* ile doğal enfekte 9 buzağında gerçekleştirildi. İmmunokromotografik hızlı diagnostik test kitleri ile *G. duodenalis* antijenleri belirlenen olgular Nested PZR analizine tabi tutularak tanı kesinleştirildi. Gram dışkıda kist sayımları (Macmaster metodu) sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde kist sayımlarının geometrik ortalama sırasıyla 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 adet olduğu belirlendi. Kist açılımı ele alındığında başlangıç değerlerine (0. gün) göre 3., 7. ve 10 günlerde istatistiksel önemi bulunmayan bir azalmanın gerçekleştiği; 7. günde 3. ve 10. günlere kıyasla istatistiksel anlamı bulunmayan bir artışın gözlemlendiği dikkati çekti. Nested PZR analizinde tüm dışkı örneklerinin pozitif olduğu tespit edildi. Yazarların bilgisine göre Ege Bölgesindeki *G. duodenalis* ile doğal enfekte buzağlarda PZR eşliğinde gerçekleştirilen bu çalışmada, doğal kist saçılımının tespit edilmesiyle ileride gerçekleştirilecek parazitolojik, klinik ve moleküler çalışmalara yön verebileceği düşünüldü. İlaveten anılan çalışmanın bölge enfeksiyon haritasına değerli katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan buzağı ishalleri içerisinde *G. duodenalis*' in unutulmuş etiyolojik etkenler arasında yer aldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *G. duodenalis*, buzağı, Nested PZR

Abstract

The present study was carried out on field conditions, involving 9 diarrhetic calves naturally infected with *Giardia duodenalis* in different districts of Aydın region. Precise diagnosis has confirmed by Nested PCR analysis of cases, to these of which in immunochromatographic rapid diagnostic test kits revealed *G. duodenalis* antigens as regarding cyst excretion. Following cysts count in gram stool (Macmaster method), the geometric means on days 0., 3., 7. ve 10. were determined 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 respectively. Initial values (day 0) compared with the 3rd, 7th days revealed in significant reduction, besides on day 7, in comparison to 3rd and 10th days, insignificant increase. All fecal samples were deemed positive with Nested PZR analysis. According to present authors knowledge this study carried out in calves infected with *G. duodenalis* via PCR, determination of natural cyst shedding may provide future directions for arasitological, clinical and molecular studies. And also it was concluded that the latter study may provide valuable contribution to the regional infection map. It must also be taken into account *G. duodenalis* as a forgotten etiological agent, involved in calf diarrhea causing economical loss in our country.

Key words: *G. duodenalis*, calf, Nested PZR

Adnan AYAN^A
Kerem URAL^B
Nuran AYSUL^A
Mehmet GÜLTEKİN^B
Hasan ERDOĞAN^B
Canberk BALIKÇI^B
Songül TOPLU^{B*}
Gökтуğ TOROS^B

^aAdnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Ana Bilim Dalı,
Aydın

^bAdnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi İç
Hastalıkları, Ana Bilim Dalı,
Aydın

Sorumlu yazar

Songül TOPLU

Adnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi, İç
Hastalıkları Anabilim Dalı

PK:17 09016 Işıklı/Aydın -
TÜRKİYE

songul.toplu@adu.edu.tr

Copyright © 2016 JAVST

Giriş

Giardia duodenalis' in zoonotik özelliğinin yanında gelişme geriliği ve yemden yararlanma oranını azaltarak ve ishale sebep olarak ekonomik kayıplara neden olması, çiftlik hayvanlarındaki giardiazise ilişkin farkındalığın günümüzde daha da artmasına sebep olmaktadır (O'Handley vd., 2003). Bir gram dışkıda meydana gelen 10^6 kist saçılımı geniş ölçüde çevresel kontaminasyona tekabül etmekte ve bu durum insanlarda su ile yaygın bulaşmanın oluştuğu giardiazisi, çiftlik hayvanlarının rezervuar olması açısından bir adım daha öne çıkarmaktadır (Buret vd., 1990; O'Handley vd., 2000).

Giardia duodenalis dünyada yaygın olarak görülen, insan ve memeli hayvanlarda gastrointestinal enfeksiyona neden olan flagellalı paraziter bir etkindir (Feng ve Xiao, 2011). Dışkı ile dış ortama atılan kist formu +4 C⁰ 'de ve nemli ortamda 90 gün canlılığını koruyabilmektedir (Meyer ve Jarrol, 1980; Craun, 1990). Etkenin aynı türler ya da farklı konakçılar arasındaki bulaşması kist ile kontamine su, dışkı ya da gıdanın alınmasıyla gerçekleşebilmektedir (Rendtorff, 1978; Mark-Carew vd., 2010).

Genç buzağılarda giardiazisle enfeksiyon yaygın görülmekle birlikte (O'Handley vd., 2000; O'Handley ve Olson, 2006; Winkworth vd., 2008; Thoma vd., 2010), prevalansı iklim, bağışıklık durumu ve yönetim gibi etkenlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Ralston vd., 2003; O'Handley ve Olson, 2006; Tiranti vd., 2011; Gillhuber vd., 2014). Giardiaziste gözlemlenen ishalin ortaya çıkışı bahsedilen faktörlerle ilişkilendirilebildiği gibi subklinik olarak seyreden enfeksiyonlarda ortaya çıkmayabilmektedir (Ruest vd., 1997; O'Handley vd., 2001; Geurden vd., 2006).

Yapılan birkaç çalışmada *Giardia* ile doğal enfeksiyonun daha çok neonatal periyodun sonunda

şekillendiği ve sıklıkla da kronik formda ishal bulguları göstermeksizin seyrettiği belirtilmektedir (O'Handley ve Olson, 2006). Bunun yanı sıra süttten kesilen buzağılarda süt emme dönemine göre daha yaygın seyrettiğini belirten çalışmalarda mevcuttur (Trout vd., 2005). Buzağılarda 4 günlük yaşta dışkıda kist saçılımı görülebilmeye (Geurden vd., 2009) rağmen klinik bulguların 1 aylık yaştan büyüklerde ortaya çıktığı bildirilmektedir (O'Handley vd., 1999; Huetink vd., 2001; Trout vd., 2004; Geurden vd., 2006). Dışkıda en fazla kist saçılımının 4-12 haftalık yaşta (gram dışkıda 10^5 - 10^6 kist) meydana geldiği belirtilmektedir (O'Handley vd., 1999; Ralston vd., 2003). Ayrıca konaktan kist atılımı aralıklı olarak gerçekleşmektedir (Buret vd., 1990; Adam, 2001; DuBois vd., 2008; Xiao ve Fayer, 2008).

Bu çalışma ile Ege Bölgesindeki Nested PZR ile tanısı doğrulanan *G. duodenalis* ile doğal infekte buzağılarda, doğal kist saçılımının tespit edilmesiyle ileride gerçekleştirilecek parazitolojik, klinik ve moleküler çalışmalara yön verebilmesi amaçlandı. İlâveten anılan çalışmanın bölge enfeksiyon haritasına değerli katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan buzağı ishalleri içerisinde *G. duodenalis* 'in unutulmuş etiyolojik etkenler arasında yer aldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Materyal-Metot

Araştırmanın materyalini Aydın ili çeşitli yerleşim alanlarında yer alan sütçü sığır işletmelerine bağlı ishal ve benzeri gastrointestinal şikayetleri bulunan 5'i erkek ve 4'ü dişi olmak üzere yaşları 20 gün ila 2,5 ay arasında değişiklik gösteren ve biri Simental geri kalanı Holstein ırkı olan 9 buzağıdan oluşturuldu.

Diğer enfeksiyöz ishal ajanlarının eliminasyonu amacıyla hasta başında hızlı test kitlerinden (Anigen

Rapid Bovid-5 Ag Test Kiti, Bionote Lab) yararlanıldı. Giardia pozitif bulunan buzağıkların dışkıları toplanarak çinko sülfat flotasyon ya da Giemsa boyama yöntemi ile mikroskop altında etkene yönelik inceleme yapıldı. Çalışmanın başlangıcında kullanılan hızlı tanı test kitleriyle *G. duodenalis*' in vejetatif evreleri ve kistlerine yönelik antijenik tespit immunokromatografik olarak belirlendi. Mikroskopik muayeneler ve hızlı tanı test kitleriyle giardiazis belirlenen 9 örnekte QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) ile protokole uygun olarak DNA ekstraksiyon metodu uygulandı. Daha sonra Cacciò ve ark (2002) tarafından tanımlanan G7 F5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3 forward ve G759R 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3 reverse primerleri kullanılarak 753 bp büyüklüğündeki β -giardin gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu yapıldı. Aynı PZR ürünleri BG1F 5'-GAACGAGATCGAGGTCCG-3' forward ve BG2R 5'-CTCGACGAGTTCGTGTT-3 reverse²⁷ primerleri ile tekrar PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Şekil 1.). Bu işlemlerin ardından PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde 90 volt doğrusal akımda 1 saat koşuruldu. Bu işlemin ardından jel görüntüleme cihazında *G. duodenalis*' in 511 bp büyüklüğündeki bant görüntüleri elde edilerek tanı kesinleştirildi.

Giardiazis ile enfekte buzağıklardaki kist saçılımları 0., 3., 7. ve 10. günlerde toplanan dışkı örneklerin uygun metod ile mikroskop altında kist sayımının yapılmasıyla gerçekleştirildi.

Kist sayımları sonucunda elde edilen sayısal değerler geometrik ortalamalar baz alınarak tanımlayıcı istatistikleri gerçekleştirildi. Ookist sayılarının günler arası farklılıklarının karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı ile gerçekleştirilerek $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Tanı konulan olgulara çalışma süresince herhangi bir sağıltım uygulamasında bulunulmadı. Ancak çalışma tamamlanır tamamlanmaz tüm buzağıklara anti-giardial amaçla 30 mg/kg seknidazol (Flagentyl tablet, Eczacıbaşı) tek dozda oral yolla uygulandı.

Bulgular

Yapılan klinik muayene ile çalışmaya dahil edilen buzağıkların tümünde ishal bulguları gözlemlenirken bir tanesinde emme refleksinin zayıf olduğu belirlendi. Üç olguda 3. günde ishal bulguları ortadan kalkmasına rağmen dışkıyla kist saçılımının devam ettiği yapılan mikroskopik incelemelerle ortaya çıkarıldı.

Trofozoit ve kistlerin belirlenmesi amacıyla 0., 3., 7., ve 10. günlerde gerçekleştirilen natif muayene ile bütün buzağıklarda dışkıda kist saptandı. Yapılan örneklemelerin hiçbirinde trofozoit formu belirlenemedi. Natif dışkı bakışının yanı sıra yapılan çinko sülfat flotasyon (1.18 dansite) yönteminde de tüm buzağıklardaki kist varlığı doğrulandı. Tanıyı desteklemek ve kuvvetlendirmek amacıyla 0. günde hızlı tanı test kitleriyle etkene yönelik antijen varlığı belirlendi. Gram dışkıda kist sayımları (Macmaster metodu) sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde kist sayımlarının geometrik ortalama sırasıyla 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 adet olduğu belirlendi. Kist açılımı ele alındığında başlangıç değerlerine (0. gün) göre 3., 7. ve 10. günlerde istatistiksel önemi bulunmayan bir azalmanın gerçekleştiği; 7. günde 3. ve 10. günlere kıyasla istatistiksel anlamı bulunmayan bir artışın gözlemlendiği dikkati çekti. İlgili bulgular tablo 1'de gösterildi. Çalışma süresince kist saçılımının devam ettiği, 3 buzağıda 0. güne kıyasla kist atılım sayısında artış şekillenmesine rağmen 6 buzağıda azalma belirlendi. Kist atılım sayısının arttığı gözlemlenen 3 buzağıda 7. ve 10. günde de kist atılımının başlangıç gününe göre fazla olduğu tespit

edildi. Çalışmanın son gününde 5 olguda diğerlerine göre yüksek kist atılımı belirlendi. Diğer taraftan Nested PZR analizinde tüm dışkı örneklerinin pozitif olduğu tespit edildi. İlgili bulgular şekil 1’de sunuldu.

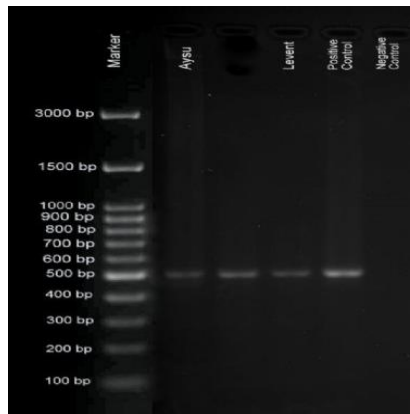
Tartışma

Kronik formda ve neonatal dönemin sonunda karşılaşıldığı belirtilen giardiazis olgularının (O’Handley ve Olson, 2006) süttten kesilen buzağılarda da yaygın seyrettiği (Trout vd., 2005) ve kist saçılımının 4 günlük yaşta başlamasına (Geurden vd., 2009) rağmen en fazla şekillendiği dönemin 4-12 haftalık yaş aralığı olduğu ifade edilmektedir. (O’Handley vd., 1999; Huetink vd., 2001; Trout vd., 2004; Geurden vd., 2006). Bu araştırmada yukarıda bahsi geçen çalışmalar ile örtüşür şekilde 20 günlük bir buzağıda çalışma süresince kist atılımı gözlemlenmekle beraber süttten kesilen buzağılarda da enfeksiyon varlığına rastlanmış ancak yaşlara göre prevalansının değerlendirilmesi yapılacak kadar örnek çalışmaya dahil edilememiştir. Ayrıca günlere göre kist saçılımı farklılık göstermektedir.

Dışkı ile dış ortama atılan kist formu +4 C⁰ ‘de ve nemli ortamda 90 gün canlılığını koruyabilmektedir

(Meyer 1980; Craun, 1990). Aydın ili ve civarı etkenin dış ortamda korunmasına yönelik çevresel şartları sağlayan bir ilimizdir. Bununla birlikte Aydın ilinde insanlarda zoonotik assemblajlara yönelik çalışmalarda mevcuttur (Yazıcı vd., 2007; Karadam vd., 2008; Ertuğ vd., 2016). Bu sebeple çiftlik hayvanlarında belirlenen suşların (assemblajların) moleküler karakterizasyonu farklı çiftliklerde zoonotik potansiyelin ortaya konulmasını, böylelikle bölge enfeksiyon haritasının netleştirilerek gerekli önlemlerin alınmasını sağlayacaktır.

Bu çalışma *G. duodenalis* ile doğal infekte 9 buzağıda gerçekleştirildi. İmmünokromotografik hızlı diagnostik test kitleri ile Giardia duodenalis antijenleri belirlenen olgularda, gram dışkıda kist sayımları gerçekleştirildi. Gram dışkıda kist sayımları sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde kist sayımlarının geometrik ortalama sırasıyla 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 adet olduğu belirlendi (Tablo 1A, Tablo 1B). Elde edilen bu verilerin, özellikle sonradan gerçekleştirilecek deneysel ya da sağaltım çalışmalarına baz oluşturacağı, muhtemelen kist atılımındaki farklılaşmanın sağaltım protokollerinin de değişimine sebep olabileceği söylenebilir.



ŞEKİL 1: *Giardia duodenalis* ile doğal infekte buzağılarda Nested PZR analiz sonuçlarına ait agaroz jel görüntüsü.
FIGURE 1: Related to results of Nested PCR analysis in natural infected calves with *Giardia Duodenalis*.

TABLO 1A: Gram dışkıda kist sayılarının günlere göre dağılımı

TABLE 1A: Daily distribution of cysts count in gram stool

Kontrol grubu	0. gün	3. gün	7. gün	10. gün
G1 (2 aylık erkek)	20000	8000	4000	8000
G2 (2,5 aylık erkek)	8000	20000	32000	16000
G3 (2 aylık dişi)	12000	28000	10000	24000
G4 (2 aylık dişi)	16000	12000	8000	12000
G5 (20 günlük erkek)	8000	256000	80000	56000
G6 (2 aylık erkek)	48000	12000	16000	96000
G7 (2,5 aylık dişi)	8000	4000	48000	4000
G8 (2 aylık erkek)	36000	8000	4000	6000
G9 (1,5 aylık dişi)	20000	4000	4000	140000

TABLO 1B: 0., 3., 7. ve 10. günlerde *G. duodenalis* kist saçılımıTABLE 1B: *G. duodenalis* cysts excretion in 0., 3., 7. and 10. days

Kist saçılımı	
0. gün (X _G)	15979,93
(min-maks)	8000-48000
3. gün (X _G)	14035,64
(min-maks)	4000-256000
7. gün (X _G)	12924,98
(min-maks)	4000-80000
10. gün (X _G)	20592,60
(min-maks)	140000-4000

Kaynaklar

Adam RD (2001): Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. J Virol 14(3): 447-475.

Buret A, Wallis PM, Befus D, Olson ME (1990): Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J Infect 162(1): 231-237.

Craun GF (1990): Waterborne giardiasis. In: Meyer EA. (ed), Giardiasis. 1st ed. New York, Elsevier Science Publishing, 358-362.

DuBois KN, Abodeely M, Sakanari J, Lee M, McKerrow JH, Sajid M (2008): Identification of the major cysteine protease of giardia and its role in encystation. J Biol Chem 283(26): 18024-18031.

Ertuğ S, Ertabaklar H, Özlem ÇS, Malatyali E, Bozdoğan B (2016): Genotyping of *Giardia intestinalis* strains isolated from humans in Aydın, Turkey. Mikrobiyol Bul 50(1): 152.

Feng Y, Xiao L (2011): Zoonotic potential and molecular epidemiology of giardia species and giardiasis. Clin Microbiol Rev 24(1): 110-140.

Geurden T, Levecke B, Caccio SM, Visser A, De Groot G, Casaert S, Claerebout E (2009): Multilocus genotyping of Cryptosporidium and Giardia in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. Parasitol 136(10): 1161-1168.

Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E (2006): Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural giardia infection in calves. Vet Parasitol 142(3): 367-371.

Gillhuber J, Rügamer D, Pfister K, Scheuerle MC (2014): Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany. BMC Res Notes 7(1): 112.

Huetink REC, Van der Giessen JWB, Noordhuizen JPTM, Ploeger HW (2001): Epidemiology of

- Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol* 102(1): 53-67.
- Karadam SY, Ertabaklar H, Ertuğ S (2008):** Aydın'da üç farklı kreş ve anasımındaki çocuklarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 32: 257-60.
- Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E (2005):** Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a β -giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 91(1): 203-205.
- Mark-Carew MP, Khan Y, Wade SE, Schaaf S, Mohammed HO (2010):** Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Vet Scand* 52: 44.
- Meyer EA, Jarrol EL (1980):** *Giardia* and giardiasis. *Am J Epidemiol* 111: 1-12.
- O'Handley R, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Moreck DW, Olson ME (1999):** Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc* 214: 391-396.
- O'Handley RM, Buret AG, McAllister TA, Jelinski M, Olson ME (2001):** Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *Int J Parasitol* 31(1): 73-79.
- O'Handley RM, Ceri H, Anette C, Olson ME (2003):** Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet Parasitol* 113(2): 89-98.
- O'Handley RM, Olson ME (2006):** Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Clin North Am Small Anim Pract* 22: 623-643.
- O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RC (2000):** Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol* 90: 193-200.
- Ralston BJ, McAllister TA, Olson ME (2003):** Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet Parasitol* 114: 113-122.
- Rendtorff RC (1978):** The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. In: *Jacobowski W, Hoff JC. (ed's), Waterborne transmission of giardiasis. Washington, Environmental Protection Agency, 64-81.*
- Ruest N, Couture Y, Faubert G, Girard C (1997):** Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* *Vet Parasitol* 69(3): 177-186.
- Thomas G, Vercruyse J, Claerebout E (2010):** Is giardia a significant pathogen in production animals?. *Exp Parasitol* 124(1): 98-106.
- Tiranti K, Larriestra A, Vissio C, Picco N, Alustiza F, Degioanni A, Vivas A (2011):** Prevalence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Rev Bras Parasitol Vet* 20(2), 140-147.
- Trout JM, Santín M, Greiner E, Fayer R (2004):** Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 124(3): 179-186.
- Trout JM, Santín M, Greiner E, Fayer R (2005):** Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 130(3): 177-183.
- Winkworth CL, Matthaei CD, Townsend CR (2008):** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* in calves from a region in New Zealand experiencing intensification of dairying. *New Zeal Vet J* 56: 15-20.
- Xiao L, Fayer R (2008):** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 38(11): 1239-1255.
- Yazıcı V, Sırken F, Ertabaklar H, Ertuğ S (2007):** Aydın il merkezindeki hastanelerde çalışan mutfak personelinde bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 31(2): 136-138.