


Kanatlı Coccidiosisine Karşı Oocystlerin İrradiye Edilmesi Esasına Dayalı Aşı Üretimi *I-Tavuk Coccidiosisinde Altlıklardaki Dışkılarda Bulunan Oocystlerin Kantitatif Olarak Belirlenmesi ve Sporlandırılması İle İlgili Çalışmalar*^[1]

Zafer KARAER *  Zeynep PINAR * Sırrı KAR ** Esin GÜVEN * Ayşe ÇAKMAK *
Serpil NALBANTOĞLU * Asiye KOÇAK * Günay ALÇIĞIR * Zişan EMRE ***

[1] Bu çalışma TÜBİTAK TOVAG 105 O 451 No'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiş olup, aynı başlıklı bir yüksek lisans tezi esas alınarak metinleştirilmiştir.

* Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara - TÜRKİYE

** Namık Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Tekirdağ - TÜRKİYE

*** T.C. Başbakanlık, Atom Enerjisi Enstitüsü, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-302

Özet

Bu çalışmada, tavuk coccidiosisine neden olan *Eimeria* oocistlerinin, toplanan dışkı numunelerinden laboratuvar ortamında kantitatif izolasyonu ve etkili bir şekilde sporlandırılması için kullanılabilir ideal yöntem belirlenmiştir. Çok sayıda hayvanın bir arada bulunduğu broyler kümeslerinden toplanan dışkıdaki oocist varlığının sayısal olarak belirlenmesi konusunda, altlık ilişkili kontaminasyonun, sonucu önemli derecede etkileyebildiği fark edilmiştir. Söz konusu olumsuzluğun, yeni toplanan dışkılarıda uygulanacak ön bir separasyon işlemi ile ortadan kaldırılabilirliği anlaşılmış ve denenen yeni yöntem ile ilgili soruna belli derecede de olsa çözüm bulunabileceği görülmüştür. Oocistlerin sporlandırılması konusunda ideal yaklaşımı bulmak amacıyla yapılan denemelerde, oksijen, hareket ve potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) etkisi üzerinde durulmuş olup, özellikle potasyum dikromatın önemi bir kez daha anlaşılmıştır. Ayrıca elde edilen veriler, ilgili kimyasalın etki mekanizması konusunda farklı nedenlerin de, direkt veya indirekt olarak sporlanmada rol alabiliyor olabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Tavuk, Coccidiosis, Oocyst, Sporlanma, İzolasyon*

Vaccine Production Based on Oocyst Irradiation at Broiler Coccidiosis *I-Studies on the Quantitative Determination and Sporulation of Oocysts in Faeces Present in Litter of Broilers with Coccidiosis*

Summary

The objective of this study was to evaluate a standard method for quantitative isolation of *Eimeria* oocysts from feces samples and effective sporulation. It's realized that contamination related with litter can effectively impress the result about quantitative determination of oocyst existence in faeces taken from hencoops that lots of chickens live together. This negativity can be arranged by performing pre-separation process for newly collected samples and with this process related problem could be solved to a certain degree. In the experiments made for determining the ideal perspective about oocyst sporulation, oxygen, motion and potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) were emphasized and the importance of potassium dichromate understood again. Moreover the obtained data showed that different reasons about potassium dichromate's action mechanism directly or indirectly could take part in sporulation.

Keywords: *Chicken, Coccidiosis, Oocyst, Sporulation, Isolation*

GİRİŞ

Coccidiosis, *Eimeria* türlerinin neden olduğu ve başta kümes hayvanları olmak üzere birçok hayvan grubunda etkili olan protozoer bir hastalıktır. Konağa

spesifik bir özellik taşımakta olan *Eimeria* türlerinden *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. praecox* ve *E. hagani*



İletişim (Correspondence)



+90 312 3170315



zafer.karaer@veterinary.ankara.edu.tr

tavuklarda etkili olan coccidiosis etkenlerindendir ¹⁻³. Hastalık kanatlılarda yaygın ölümlere neden olabilirken, subklinik seyri sırasında da yemden yararlanma ve canlı ağırlık artışında önemli derecelerde gerilemelere yol açabilmektedir. Söz konusu bu durumdan ötürü, kümeste hastalığın tipik klinik boyuta ulaşmış formalarının tanısı kadar, dışkı ile oocyst atılımının saptanması esasına dayanan subklinik olguların da kantitatif yöntemlerle ortaya konması, coccidiosis koruma ve kontrol programlarının belirlenebilmesi açısından önem taşır ^{2,4,5}.

Monoksen bir biyolojiye sahip olan *Eimeria* türlerinde bulaşma, bağırsak mukozasında üredikten sonra dışkı ile atılan oocystlerin sporlanmayı takiben oral olarak alınması ile gerçekleşir ^{2,6,7}. Yalnızca bir sporlanmış oocystin alınması bile bir hafta gibi kısa bir süre içerisinde, dışkı ile milyonlarca oocyst atılımına neden olabilmektedir ^{8,9}. İşte coccidiosisin rutin tanısı da, dışkıdaki söz konusu bu oocyst varlığının ortaya konması ile gerçekleşir. Ancak, bu noktada kantitatif tanı ve saptanan oocystlerin tür ayrımı da önem taşır. Çünkü, *Eimeria* türlerinin patojenitesi türden türe değişiklik göstermektedir. Bu yüzden, tür ayrımının yapılması, hastalığın boyutlarının belirlenmesinden koruma kontrol programlarının oluşturulmasına kadar her aşamada özel önem arz eder. En azından bazı türlerin ayrımında sıklıkla kullanılan mikroskop altında morfolojik tiplendirmenin gerçekleştirilebilmesi için oocystlerin mutlak suretle sporlanmış olması gerekmektedir. Çünkü sporlanmadan önce monomorf basit bir iç yapıya sahip olan oocystlerin tür bazında ayrımı çoğunlukla imkansızdır. Sporlanmayı takiben her oocyst iki sporozoit içeren 4 adet sporosiste kavuşmakta olup ilgili yapıların her biri tür ayrımında kullanılabilen önemli morfolojik parametreleri barındırır ^{1,3,10,11}.

Bu çalışma ile broyler kümeslerindeki coccidiosisin saptanması konusunda, ideal bir örnekleme ile dışkı arındırma protokolünün oluşturulması ve etkili bir oocyst sporlandırma yönteminin ortaya konması amaçlanmıştır. İlgili konulardaki idealin yakalanması noktasında, rutinde kullanılan tekniklerden, hem bunların bazı modifikasyonlarından ve hem de yeni bazı yaklaşımlardan yararlanılmış, böylelikle karşılaştırmalı sonuçlara dayanan standart yöntemler belirlenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Sahadan Dışkı Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma için gerekli olan dışkı örnekleri, Ankara

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında yürütülmekte olan 105 O 451 nolu proje kapsamında, Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki etlik piliç yetiştiriciliği yapılan 100 kümeden toplanmıştır. Hijyen, koruma ve kontrol programlarına uygun olarak giyilen kıyafet ve diğer aksesuarlar eşliğinde girilen kümeslerden, bütün kümesi temsil edecek şekilde örnekleme yapılmıştır. Dışkılar çoğunlukla eldivenli el ile gerektiğinde de pens veya spatül ile (genellikle erken yaştaki civcivlerde) 100 ml hacmindeki plastik dışkı kaplarına, kabın tamamı doldurulacak şekilde alınmışlardır. İleri yaştaki broylerlerde dışkı büyüklüğü fazla olduğundan, en az 15-20 farklı örnek alınımı sağlayabilmek amacı ile, temiz durumda, mümkün olduğunca yeni olan dışkılardan avuç içine toplanıp kısmen homojenize edildikten sonra bir kısmı kaba aktarılmıştır. Örneklemede, küme içerisinde homojen bir seyre dikkat edilmiştir; ancak, dışkı birikiminin fazla ve temiz örnek alma şansının da daha yüksek olmasından ötürü suluk civarına, yemlik dolaylarına ve duvar diplerine öncelik verilmiştir. Örneklerin toplanması sırasında, dışkının elden geldiği kadar temiz olmasına, altlık veya yem ile bulaşık olmamasına dikkat edilmiştir; ancak, her koşulda tüm sürüyü temsil edecek yeterli miktarda numune alınımını gerçekleştirmek asıl hedef olmuştur. Her küme içerisinde ortalama 15-20 dak. süreyle numune toplanmış, bu süre özellikle örneklemenin zor olduğu küçük civcivlerde uzun tutulmuş ve hayvanlarda strese neden olacak ani hareketlerden, hızlı yürüyüş ataklarından kaçınılmıştır. Sürü stresine dikkat etmek amacıyla, özellikle ileri yaştaki broylerlerin bulunduğu kümeslerde ses ve hareket disiplinine özel önem verilmiştir.

Numune alınan kapların kapakları sıkıca kapatılmış ve üzerlerine protokol numaraları, piliçlerin kaç günlük oldukları, toplandıkları tarih ve dışkıyla ilgili alınması gereken bilgiler kaydedilmiştir. Bu işlemlerin ardından kaplar, içerisinde buz kalıpları bulunan plastik kutulara konarak laboratuara getirilmiş ve incelemeye alınana kadar buzdolabında (+4°C) saklanmışlardır.

Oocyst İzolasyonu

Toplanan dışkılardan oocystlerin izolasyonu ve gram dışkıdaki oocyst sayısını belirlemek amacıyla, bilinen ve tarafımızdan modifiye edilen olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır:

a) *Bilinen (klasik) yöntem*: Laboratuvara getirilen dışkı örneği bir baget yardımı ile iyice homojenize edilmiş ve bundan direkt 4 g alınarak modifiye McMaster yöntemi ^{12,13} ile oocyst sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için, numuneden alınan 4 g dışkı

bir beher içerisinde 56 ml flotasyon sıvısı (doymuş tuzlu su) ile iyice karıştırılmıştır. Daha sonra sık gözenekli bir süzgeçten (çay süzgeci benzeri) geçirilmiş ve süzüntü manyetik karıştırıcıda 2 dak. karıştırılmıştır. Bunu takiben, karışmakta olan süspansiyondan pastör pipeti yardımıyla McMaster lamının her iki gözüne, ayrı ayrı örnek alınmıştır. Düz bir zeminde 3-5 dak. bekletilen lamlar mikroskop altına alınmış ve x10 büyütmede oocyst sayımları gerçekleştirilmiştir. Her iki sahada sayılan toplam oocyst miktarı 50 ile çarpılarak gram dışkıdaki oocyst sayısı belirlenmiştir.

b) Yeni yöntem: Dışkı örneklerinin her biri, içinde 1000 ml distile su bulunan darası belirlenmiş bir behere yerleştirilmiş, 1 mm büyüklüğünde (dışkı partikülleri haricindeki, altlık vs kaynaklı kontaminasyonları ortadan kaldırmak amacıyla ilgili büyüklük seçilmiştir) gözeneklere sahip, alt kısmı suya rahatlıkla daldırılabilir şekilde hafif dairesel konik sonlanacak şekilde hazırlanmış olduğumuz bir süzgece aktarılmıştır. Takibinde klasik, manuel mutfak çırpıcısı ile, partiküller iyice dağılıncaya kadar (ortalama 2-4 dak) hızlı bir şekilde karıştırılmıştır. Arkasından süzgeç beherden kaldırılmış ve içerisinde bulunan partiküllerdeki sıvının alta mümkün olduğunca inmesini sağlamak amacıyla iyice sallanmış ve uzaklaştırılmıştır. Daha sonra beher, içerisindeki süzüntü ile birlikte tartılmıştır. Sonuçta elde edilen değerden beherin darası ve distile su (1000 ml) ağırlığı çıkarılarak suda bulunan dışkı miktarı tespit edilmiştir. Takibinde iyice karıştırılan süzüntü, sırasıyla 100 ve 85 µm'lik süzgeçlerden geçirilmiş ve büyük godelere bölünerek 2500 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Sonrasında, süpernatant dökülmüş, çökeltiler ise belli bir miktar distile su ile karıştırılarak ölçekli (100 ml) bir beherde toplanmışlardır. Beher içindeki hacmi ve numune içerik miktarı belli olan sıvı iyice karıştırıldıktan sonra, 4 gr dışkıya tekabül eden hacim pipet yardımı ile alınmış, santrifüj tüplerine aktarılmış ve 2000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatant kısım dökülmüş ve sediment daha önce hazırlanmış olan temiz bir dışkı kabındaki 56 ml flotasyon sıvısı (doymuş tuzlu su solüsyonu) içerisine aktarılmış, iyice pipete edilerek homojen olana kadar karıştırılmış ve karışımdan yine pipet yardımı ile McMaster lamının her iki gözüne alınmış, bir önceki yöntemde olduğu gibi oocyst sayımı gerçekleştirilmiştir.

Oocystlerin Sporlandırılması

Geliştirilen yeni yöntem ile süzülen ve santrifüj edilerek yıkanan 100 dışkı süspansiyonundan *Eimeria* oocystleri bakımından pozitif olan 15 dışkı örneği se-

çilmiştir. Bunlardan her biri, modifiye McMaster yöntemi için bir miktar (4 gr dışkıya tekabül eden kısım) alındıktan sonra, 4 eşit parçaya (her birinin arındırma öncesi temel numune miktarı 20±5 g dışkıya tekabül edecek şekilde) bölünerek, her biri ayrı ayrı 100 ml'lik plastik dışkı kaplarına konmuş ve kapların üzeri, içerik yaklaşık 80 ml'ye ulaşıncaya kadar distile su ile doldurulmuştur. Oluşturulan grupların her biri, birbirinden farklı 4 değişik yöntem ile sporlanmaya alınmıştır. Dört hafta süren sporlanma takip işlemleri sırasında, bütün numuneler aynı laboratuvar ortamında ve 24-33°C arasında değişen sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.

Sporlanma denemeleri için oluşturulan gruplar ve bu gruplara uygulanan işlemler şu şekildedir:

1. Grup: Bu grupta bulunan dışkılara başlangıçta %2.5'lük potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ilave edilmiştir. Takip eden dönemde haftada bir kere, kabın üst kısmındaki sıvı (partiküller dibe çöktüğünden dışkı veya oocyst içermiyor) kabın yarısına kadar dökülmüş ve başka kapta karıştırılmış olan yeni potasyum dikromatlı solüsyon eklenmiştir. Yine, takip süresince haftada iki kere, buharlaşmayla kaybedilen su miktarı kadar distile su, oocystlerin iyice havalanmasını da sağlayabilmek amacıyla, enjektörle püskürtülerek eklenmiş ve ayrıca örnekler günde 3 kere, farklı zamanlarda karıştırılmıştır. Sporlanma 3 gün ara ile 4 hafta boyunca kontrol edilmiştir.

2. Grup: Bu grupta hiç bir aşamada numuneye potasyum dikromat eklenmemiştir. Diğer uygulamalar 1. grupta olduğu gibi yürütülmüştür.

3. Grup: Bütün işlemler 1. grupta olduğu gibi yapılmıştır; ancak, haftada bir kere yapılan potasyum dikromatlı sıvı değişikliği gerçekleştirilmemiştir.

4. Grup: Bu grupta başlangıçta %2.5'lük potasyum dikromat ilavesi yapılmış ve ek olarak da buharlaşmayla kaybolan su miktarı, kabın kenarından sızdırılarak, dışkı partiküllerinin ve dolayısıyla da oocystlerin hareketlenmesi engellenerek kompanze edilmiştir. Takip eden süreçte diğer işlemler gerçekleştirilmemiş, ancak süspansiyon kesinlikle karıştırılmamıştır.

Sporlanması Takip Edilen Dışkıların Mikroskopta İncelenmesi

Her grupta sporlanmaya alınan dışkılar, 3 günde bir, 4 hafta boyunca mikroskop altında incelenmiş ve sporlanma yüzdeleri tespit edilmiştir. İnceleme sırasında sporlanan, sporlanmayan ve dejenerasyona uğrayan oocystlerin sayısal verileri kaydedilmiştir. Oocystlerde meydana gelen dejenerasyon, morfolojik

deformasyon bazında ele alınmış ve normal dışı (kolaps, iç bozulma gibi) görünüm morfolojik bozulma olarak değerlendirilmiştir. Dejenere olan oocystlerin belirlenmesi ayrıntılı taramaları gerektirdiğinden ötürü, bu işlemler için Sheather'in şeker solusyonu (550 g şeker + 6.5 g eritilmiş fenol + 355 ml distile su) kullanılmıştır^{9,13-15}. Doymuş tuzlu su çözeltisinin kısa sürede kuruduğu ve içerisinde uzun süre kalan oocistlerde plazmolize bağlı olarak oocist iç duvarında çökme gözlemlendiği, doymuş çinko sülfat çözeltisi kullanıldığında ise, açığa çıkan kristallerin görüşü bozabildiği, dolayısıyla da, oocistlerin biçimsel özelliklerinin kayıt edildiği ve tür ayırımında yararlanılan ölçümlerin yapıldığı uzun süreli mikroskopik incelemelerde, Sheather'ın doymuş şekerli su çözeltisi ile yüzdürme yöntemine başvurulması gerektiği¹⁶⁻¹⁸ ile ilgili bildirimler, adı geçen tercihin oluşmasında temel teşkil etmiştir. Numunelerden alınan örnekler santrifüj tüpüne alınmış, üzerlerine doymuş şekerli su ilave edildikten ve lamel kapatıldıktan sonra 2000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Takibinde lamel yavaşça lam üzerine alınmış ve numune mikroskop altında x10-x40'lık objektifler kullanılarak ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

İstatistiksel Değerlendirmeler

Değişik yöntemler uygulanarak 4 farklı grupta sporlandırılan numunelerde, oocystlerin sporlanma ve dejenerasyon oranlarının istatistiksel karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD test istatistiği kullanılmıştır.

BULGULAR

Oocyst izolasyonu: Sahadan toplanan 100 dışkıdan 15'inde hem klasik hem de yeni yöntem ile oocyst izole edilebilmiştir. Yeni yöntem ile bakılan 15 numunenin 11'inde (%74), klasik yöntem ile bakılan bu 15 numunenin ise sadece 4'ünde (%26), gram dışkıdaki oocyst sayısı daha fazla çıkmıştır. Klasik yöntemin daha etkili olduğu 4 numunede gram dışkıdaki oocyst sayıları %10.5-20.9 oranında yeni yöntemden daha fazla çıkarken, yeni yöntemin daha etkili olduğu 11 numunede ise elde edilen oocyst miktarlarının %1.6-100 oranında klasik yöntemden daha etkili olduğu görülmüştür. İncelenen bütün numuneler dikkate alındığında ise yeni yöntemin klasik yöntemle göre %15.4 daha başarılı olduğu anlaşılmıştır (Tablo 1).

Oocystlerinin sporlandırılması ile ilgili veriler: Oocystlerin sporlandırılması üzerine etkili olabilecek bazı faktörlerle ilişkili oluşturulan 4 gruptan;

Tablo 1. Eimeria pozitif numunelerden, gram dışkıda görülen oocyst sayıları bakımından yöntemlere göre elde edilen sonuçlar

Table 1. Results of number of OPG (oocysts per gram) of feces in Eimeria positive samples that was obtained from processes

| Pozitif Numuneler | Bilinen (Klasik) Yöntem (g/oocyst) | Geliştirilen Yeni Yöntem (g/oocyst) | Yöntemler Arasındaki Sayısal Fark | Yöntemler Arasındaki Oransal Fark |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1* | 350000 | 304000 | 46000 | %13.1 |
| 2* | 70000 | 55350 | 14650 | %20.9 |
| 3* | 30200 | 26150 | 4050 | %13.4 |
| 4* | 19000 | 17000 | 2000 | %10.5 |
| 5 | 222000 | 370000 | 148000 | %66.6 |
| 6 | 16500 | 18800 | 2300 | %14.0 |
| 7 | 188000 | 223000 | 35000 | %18.6 |
| 8 | 11400 | 17600 | 6200 | %54.0 |
| 9 | 7800 | 15600 | 7800 | %100 |
| 10 | 68000 | 72000 | 4000 | %5.8 |
| 11 | 60000 | 61000 | 1000 | %1.6 |
| 12 | 29800 | 32000 | 2200 | %7.3 |
| 13 | 7500 | 7800 | 300 | %4.6 |
| 14 | 6500 | 6800 | 300 | %4.6 |
| 15 | 1200 | 20000 | 18800 | %15.6 |
| Toplam | 1080400 | 1247100 | 166700 | %15.4 |

* Klasik yöntem ile daha çok oocyst sayısına ulaşılan numuneler

Tablo 2. Takip edilen dört gruptan 0. günde, 1, 2, 3, ve 4. haftalarda elde edilen sporlanma ve dejenerasyon oranları

Table 2. Ratios of sporulation and degeneration from 4 followed groups in day 0 and 1st, 2nd, 3th and 4th weeks

| Grupların kontrol zamanları | n | Ortalama sporlanma oranları (%) | P | Ortalama dejenerasyon oranları (%) | P |
|-----------------------------|----|---------------------------------|---------|------------------------------------|--------|
| 0. gün | | | | | |
| 1. grup | 15 | 8.2 (1.8) ^a | P<0.001 | 4.81 (0.68) ^a | P>0.05 |
| 2. grup | 15 | 1.7 (0.6) ^b | | 7.14 (1.08) ^a | |
| 3. grup | 15 | 10.3 (1.5) ^a | | 5.61 (1.09) ^a | |
| 4. grup | 15 | 8.2 (1.3) ^a | | 6.27 (0.86) ^a | |
| 1. hafta | | | | | |
| 1. grup | 15 | 16.4 (3.1) ^a | P<0.001 | 6.8 (1.3) ^a | P>0.05 |
| 2. grup | 15 | 1.5 (0.5) ^b | | 9.4 (1.8) ^a | |
| 3. grup | 15 | 17.0 (3.03) ^a | | 10.3 (2.3) ^a | |
| 4. grup | 15 | 11.6 (2.4) ^a | | 8.3 (1.3) ^a | |
| 2. hafta | | | | | |
| 1. grup | 15 | 18.7 (3.5) ^a | P<0.001 | 9.7 (1.7) ^{ab} | P<0.05 |
| 2. grup | 15 | 1.5 (0.7) ^b | | 6.1 (1.5) ^a | |
| 3. grup | 15 | 21.1 (3.9) ^a | | 15.7 (3.0) ^b | |
| 4. grup | 15 | 15.6 (3.0) ^a | | 11.8 (1.7) ^{ab} | |
| 3. hafta | | | | | |
| 1. grup | 15 | 18.7 (4.7) ^a | P<0.001 | 15.9 (2.7) ^a | P>0.05 |
| 2. grup | 15 | 1.5 (0.5) ^b | | 8.0 (1.2) ^a | |
| 3. grup | 15 | 21.1 (4.9) ^a | | 17.3 (3.8) ^a | |
| 4. grup | 15 | 15.6 (2.5) ^a | | 17.0 (3.4) ^a | |
| 4. hafta | | | | | |
| 1. grup | 15 | 31.2 (4.9) ^a | P<0.001 | 15.9 (2.7) ^a | P>0.05 |
| 2. grup | 15 | 2.8 (0.9) ^a | | 8.0 (1.2) ^a | |
| 3. grup | 15 | 32.4 (5.4) ^a | | 17.3 (3.8) ^a | |
| 4. grup | 15 | 24.6 (4.1) ^a | | 17.0 (3.4) ^a | |

a,b: Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur

n: Toplam numune sayısı

1, 3 ve 4. gruplarda, takip sürecinin 1. gününden 4. haftasına kadar hem sporlanmış oocyst sayısı hem de dejenere oocyst sayısı artmıştır; ancak, 2. grupta 4 haftalık dönem boyunca sporlanmış veya dejenere oocyst sayısında istatistiki açıdan önem taşıyan önemli bir değişim kaydedilememiştir. Sporlanma oranı bakımından, diğer gruplardan elde edilen sonuçlar benzer çıkarken, 2. grubun istatistiki açıdan anlamlı düzeyde ($P<0.001$) düşük sporlanma oranına sahip olduğu görülmüştür (*Tablo 2*).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada da, kümeslerdeki oocyst atılım şiddetini belirlemek için adı geçen yöntemden yararlanılmıştır. Ancak, saha taramaları sırasında kümeslerden toplanan dışkıların direkt olarak bu yöntemle taranması konusunda bazı sorunlarla karşılaşmış olup ilgili sorunların başında ise altlık ile dışkının kontamine olması durumu gelmiştir. Her ne kadar taze dışkılar alınmaya çalışılırsa çalışılırsa, dışkı zemin ile temasa geçtiği andan itibaren, hafif yapıda veya toz haline gelmiş altlık ile (çeltik, talaş vs) bulaşık hale gelmiştir. Bu durum, incelenen numunenin gram dışkıdaki oocyst sayısının belirlenmesi konusunda sorunlara neden olmuştur. İlgili sorunun önüne geçebilmek amacıyla, laboratuara getirilen numuneler, dışkı harici partiküllerin separasyonunu sağlayan ön bir süzme işleminden geçirilmiştir. Adı geçen alternatif yaklaşımdan elde edilen sonuçlar (15'te 11 üstün), klasik yöntemle (15'te 4 üstün) göre önemli derecelerde (%15.4) daha başarılı bulunmuştur. Bu durum, altlığa bağlı kontaminasyonun kantitatif değerlendirmelerde sorun yaratacağını göstermiştir. Ancak, altlık kontaminasyonunun yeni yöntem ile önüne geçiliyor olması durumu, teorik olarak, incelenen bütün numunelerden %100 klasik yöntem aleyhine bir sonuç beklentisini doğurmuştur; ancak, incelenen 15 numunenin 4'ünde beklenenin aksi yönde bir sonuç çıkmıştır. Yapmış olduğumuz irdelemelerde, özellikle küçük dışkı, çok altlık ile kontamine olan genç civciv kümeslerinden elde edilen numunelerin soruna neden olabileceği anlaşılmıştır. Bu tip kümeslerden alınan numunelerde, kontamine altlığın genellikle işlemler sırasında fazlaca su tutabileceği ve ilk süzme-uzaklaştırılma döneminde bir miktar suyu da beraberinde götürdüğü, dolayısıyla da sonuç dışkı miktarı hesaplamalarını etkilediği görülmüştür. Genel olarak yöntemin, uzun bir protokole sahip olması ve dolayısıyla da manuplasyon kaynaklı hata riskinin daha yüksek olması gibi olumsuzlukları da bulunmaktadır. Ancak

diğer taraftan, elde edilen sonuçlar, yeni yöntemin, belli bir ön deneme ile standardize edildiği takdirde güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini de ortaya koymuştur. Yine, yeni yöntemde işlemlerin uzaması süzme ve santrifüj işlemlerini tekrarlanmasından kaynaklanmakta olup, ilgili işlemlerin yapılması coccidiosiste güvenilir tanı adına zaten zaman kaybı olarak görülmemesi gereken bir durumdur. Kaldı ki, mikroskop incelemeleri sırasında temiz bir saha görüntüsünü mümkün kılan bu tip prosedürler, hızlı ve güvenilir bir sayım işlemine de olanak sağlamaktadır.

Eimeria oocystlerinin sporlanmaları üzerine sıcaklık, nem ve oksijenin etkili olduğu, oksijensiz bir ortam veya oksijenin yok olmasına sebep olan her etkinin oocystlerde sporulasyonu engellediği belirtilmiştir^{3,19,20}. Sporulasyon medyumuna sıklıkla katılan potasyum dikromatın, ortamdaki oksijeni tüketebilen diğer mikroorganizmaların üremelerine engel olduğu ve dolayısıyla da oocystlerin sporlanmasını önemli düzeyde etkilediği bilinmektedir¹⁶. Yapmış olduğumuz bu çalışmada da, potasyum dikromat katılmayan grubun diğer gruplara kıyasla, sporlanma konusunda istatistik açıdan önem taşıyan derecelerde geri kaldığı görülmüştür. Ancak, klasik bilgilerde sıklıkla yer verilen karıştırma ve diğer ortam oksijenasyonunu ve sporulasyonu uyarıcı ortam dinamiklerinin ilgili konuda pek etkili olmadığı, en azından sonucu önemli derecede etkilemedikleri görülmüştür. Yine, daha önce yapılmış olan çalışmalarda, bakteri ve mantarların oocystler üzerine yadsınamaz zararlı etkilerinin olduğu, ancak ortamdaki oksijen varlığının ve nem oranının çok daha önemli dış etmenlerden oldukları ve sporlanmada çevre sıcaklığının primer etmen rolü üstlendiği bildirilmiştir¹¹. Diğer taraftan, yapmış olduğumuz eski medyumun düzenli olarak değiştirilmesi işlemi, teorik olarak ortama düzenli oksijen girişinin sağlanması anlamına gelmektedir. Ancak, elde edilen veriler ortamda potasyum dikromat olmadığı takdirde medyum yenilemesinin sporlanma oranı üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Elde edilen bu sonuç, ya ilgili değişikliğin yeterli oksijen varlığını sağlayamadığı veya potasyum dikromatın bilinen klasik etkisinden öte bazı özellikleri ortama kazandırıyor olabileceği anlamını taşımaktadır. Bu durum ise, ortamda gelişen mikroorganizma kolonizasyonu, sporlanma üzerine, oksijen tüketiminden öte bazı olumsuz etkilere neden olabiliyor mu sorusunu akla getirmektedir. Kaldı ki, *E. maxima* oocystlerinin değişik ortamlardaki sporlanma yetileri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, farklı derecelerde nem içeren altlık simülasyonlarında tutulan oocystlerin, düşük nemde (%16), yüksek neme

(%62) göre daha iyi sporlandıkları, bu durumun da söz konusu prametre ile direkt ilişkili olmaktan öte, yüksek nem içeren ortamdaki oksijen düzeyinin az, ancak mikrobial üremenin fazla olması durumundan kaynaklanıyor olabileceği ifade edilmiştir ²¹.

Klasik bilgiler, oocystlerin uygun ısı, oksijen ve neme sahip olan ortamlarda uzun süre canlılıklarını muhafaza edebildikleri, türe göre değişmekle birlikte, normal şartlar altında oocystlerin bir yıl kadar enfeksiyon kabiliyetlerini korudukları ve sporlanmış oocystlerin farklı çevresel etkilere karşı sporlanmamış olanlara göre daha dirençli oldukları yönündedir ^{1,19,20}. Fakat sporlanma sürecindeki oocystlerde görülen morfolojik deformasyon ile ilgili yapmış olduğumuz takiplerde, ilgili bozuklukların gruplardaki sporlanma oranı ile birlikte arttığı görülmüştür. Aynı zamanda değişik şartlar altında tutulan ve sporlanma oranları birbirine yakın çıkan gruplardaki morfolojik bozulma oranları arasında, istatistik açıdan önem taşıyan belli bir farklılık da gözlemlenmemiştir. Bütün bu veriler ortamdaki oksijenasyonun, hareketin veya potasyum dikromat varlığının oocystlerdeki morfolojik dejenerasyon üzerine pek etkili olmadığını, ilgili bozulmaların, en azından normal sporlanma koşulları altında, sporulizasyon sürecinde gelişebilen, belki de henüz oocystin konak sürecindeki üretim dönemi ile ilgili bazı durumlarla ilgili olabileceğini göstermektedir. Kaldı ki yapılan araştırmalar ^{22,23}, *Eimeria* oocystlerinin türe göre küre, oval, yuvarlak veya tavuk yumurtası şeklinde olabildiğini, aynı türe ait oocystler arasında da şekil farklılıklarının görülebildiğini, bu durum ise makrogametlerin gelişimi esnasında etki eden değişik faktörlerden kaynaklandığını ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen çalışma sahadan örneklerin toplanması ve coccidiosis varlığının kantitatif olarak belirlenebilmesi konusunda uygulanan yeni protokolün daha başarılı olduğunu, ancak böylesi ayrıntılı bir protokolün, kullanılan laboratuvar şartlarına göre uygulama öncesi standardize edilmesinin daha uygun olduğunu göstermiştir. Ayrıca, oocystlerin sporlandırılması konusunda elde edilen veriler, sporulizasyon üzerinde oksijenlenmeyi sağladığından dolayı önemli bulunan karıştırma veya çalkalama etkisinin tartışılmalı olduğu, önemi bir kez daha ispatlanan potasyum dikromatın ise bu noktada bilinenden öte bazı etki veya etkileme yollarının olabileceği anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Hiepe T, Jungman R: Lehrbuch der Parasitologie, Band 2, Veterinärmedizinische Protozoologie, Gustav Fischer Verlag

Stuttgart, New York, 1983.

2. Kaufmann J: Parasitic Infections of Domestic Animals. Birkhauser Verlag, Basel, 1996.

3. Levine ND: Veterinary Protozoology. 1st ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 130-188, 1985.

4. Euzeby J: Protozoologie Medicale Comparee Vol II. Myxozoa-Microspora-Ascetospora-Apicomplexa, 1: Coccidiosis (Sensu Lato). Coll. Fond. Marcel Merieux, 1987.

5. Pellerdy LP: *Coccidia* and Coccidiosis. 2nd ed. Verlag Paul Parey, Berlin, 1974.

6. Davies SFM, Joyner LP, Kendal SB: Coccidiosis. Oliver and Boyd Ltd. Edinburgh, Great Britain, 1963.

7. Jordan FTW, Pattison M: Poultry Diseases, 4th ed, W. B. Saunders Company Ltd. London, UK, 261-289, 1996.

8. Suls L: How to reduce the damage caused by coccidiosis. In, Positive Action Conferences: *Seventh International Poultry Health Conference, Coccidiosis Conference*, Hannover, Germany, 2000.

9. Todd KS, Ernst JV: *Coccidia* of Mammals Except Man. In, Kreier JP (Ed): Parasitic Protozoa. Vol III. Academic Press, New York, 1977.

10. Catchpole J: The diagnosis and misdiagnosis of coccidiosis. In, Positive Action Conferences: *Seventh International Poultry Health Conference, Coccidiosis Conference*, Hannover, Germany, 2000.

11. Long PL: Patology and pathogenicity of coccidiosis infections. In, Hammond DM, Long PL (Eds): *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera*. 254-294, University Park Press, Baltimore and Butterworth and Co (Publishers) Ltd., London, 1973.

12. Anon: Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Technical Bulletin, No. 18. London, 1977.

13. Anon: Epidemiology, Diagnosis and Control of Poultry Parasites. FAO Animal Health Manual 4, Rome, 1998.

14. Conway DP, McKenzie ME: Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures. 3rd ed. Wiley-Blackwell, 41-47, 2007.

15. Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schneider T: Veterinärmedizinische Parasitologie, 5. Auflage Blackwell Wissenschafts, Verlag-Berlin, 2000.

16. Kardeş-Duman G: Etlik piliçlerde canlı aşı uygulamalarının koksidiyoza korunmadaki etkisinin araştırılması. *Doktora tezi*. Ankara Üniv Sağlık Bil Enst Ankara, 2004.

17. Çakmak A, Vatanserver Z: Coccidiosis'de tanı. In, Dinçer Ş (Ed): Coccidiosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No: 17, 127-132, İzmir, 2001.

18. Sarı B: Etlik piliçlerde coccidiosis'den korunmada anticoccidial katkılı yem uygulamalarının etkisi. *Doktora tezi*. Ankara Üniv Sağlık Bil Enst Ankara, 2004.

19. Dinçer Ş, Eren H: Çevre faktörlerinin *Eimeria* oocystlerinin sporlanması ve yaşam süreleri üzerine etkisi. In, Dinçer Ş (Ed): Coccidiosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No: 17, 39-49, İzmir, 2001.

20. Kheysin YM: Life Cycles of *Coccidia* of Domesticated Animals. University Park Press, Baltimore, 1972.

21. Waldenstedt L, Elwinger K, Lunde'n A, Thebo P, Uggla A: Sporulation of *Eimeria maxima* in litter with different moisture contents. Poultry Sci, 80, 1412-1415, 2001.

22. Sayın F: The species of *Eimeria* occurring in cattle in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 8. 3, 311-326, 1970.

23. Sayın F, Kahyaoğlu T, Çakmak A: Ege Bölgesinde (İzmir, Aydın, Manisa) koyun ve keçilerde *Eimeria* türlerinin tespiti. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 33 (1): 90-96, 1986.