ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVŞANLARDA *Encephalitozoon cuniculi* SEROPOZİTİFLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hakan TÜFEK

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Hakan TÜFEK tarafından hazırlanan "Tavşanlarda *Encephalitozoon cuniculi* Seropozitiflğinin Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Dr. Öğretim Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü V.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "Tavşanlarda *Encephalitozoon cuniculi* Seropozitifliğinin Araştırılması" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı" yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (21/06/2019).

Hakan TÜFEK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tavşanlarda *Encephalitozoon cuniculi* Seropozitifliğinin Araştırılması

Hakan TÜFEK

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Bu çalışmanın amacı, farklı bakım ve yetiştirme sistemine sahip tesislerdeki Yeni Zelanda ırkı laboratuvar tavşanlarında *Encephalitazoon cuniculi* seroprevalansını araştırmak; varsa toplanan verilerden seroprevalansı etkileyen faktörleri ortaya koymaktır. Çalışmada, açık, yarı açık ve kontrollü alanlarda barındırma yapılan; sağlanan çevresel imkanları, hijyen durumları, bakım ve besleme koşulları farklı 3 ayrı işletmeden temin edilen serum örnekleri (30 adet) ELISA kitleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, tüm örneklerde % 63.3 oranında seropozitiflik belirlenmiştir. Hiçbir hijyen kuralı olmayan, geleneksel kümes tipi yetiştrme yapılan hayvanlar ile tamamen kontrollü sistemde yetiştirilenlerin serolojik sonuçları birbirine yakın bulunurken; geriye kalan tesisteki seropozitiflik daha düşük bulunmuştur. Elde edilen veriler ışığında, tesise alınan hayvanların orjin olarak enfekte olabileceği, tesiste enfekte bir hayvanın sürü için enfeksiyon kaynağı olabileceği, tesislerde olası yürütülen septik/aseptik kuralların etkenle mücadele için yeterli olmadığı, zoonoz karakterdeki enfeksiyonun hayvan bakıcısı, araştırmacılar için de potansiyel risk taşıdığı, sürüye entegre edilecek hayvanların serolojik taramaların yapılması ve karantina süresi sonunda uygun olan hayvanların sürü sağlığı için oldukça önemli olduğu kanısına varılmıştır.

2019, 53 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Encephalitazoon cuniculi, Seroprevalans, Yeni Zelanda tavşanı

ABSTRACT

Master's Thesis

Investigation of Seropositivity of Encephalitozoon cuniculi in Rabbits

Hakan TÜFEK

Çankırı Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology Sciences

Supervisors: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

The aim of this study is to search the *Encephalitazoon cuniculi* seroprevalance of the New Zealand race laboratory rabbits in different treatment and breeding systems and also to set forth the elements that have an effect on the seroprevalance by taking into account tha data from this reseach. The serum samples (30 pieces) that have been maintained in open, semi open and controlled areas and which the environmental opportunities, hygiene situations with treatment and feeding conditions have been provded from 3 different enterprises, have been assessed by using ELISA kits. Consequently it has been specified 63.3 percent seropositivity in all of samples. The serologic results of the animals that have been bred in traditional pens with no hygiene rules and the ones that have been bred in fully controlled systems were close to each other whereas the seropositivity in the rest of the facilities were lower. In the context of the data obtained, it has been seen that the animals taken into facility can be infected by getting orjin and an infected animal can be the source of infection for the many other animals in the facility. It has also been concluded that the septic and aseptic rules which are potentially accepted in the facilties are not enough in fighting with the factor and that the zoonotic disease can be a risk for the animal keepers and the researchers. Other than that, it has also been determined that the selection of the animals that will be integrated with the herd at the end of the quarantine period after the serological scanning is really important for the health of the herd.

2019, 53 pages

Key Words: Encephalitazoon cuniculi, Seroprevalance, New Zealand rabbit

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"Tavşanlarda *Encephalitozoon cuniculi* Seropozitifliğinin Araştırılması" adlı bu çalışma 2017-2019 yılları arasında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne "Yüksek Lisans Tezi" olarak sunulmuştur. Bu araştırmanın amacı farklı bakım ve yetiştirme sistemine sahip tesislerdeki New Zelland ırkı laboratuvar tavşanlarında *Encephalitazoon cuniculi* seroprevalansını araştırmak; varsa toplanan verilerden seroprevalansı etkileyen faktörleri ortaya koymaktır.

Çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, çalışmanın yapılmasından gerçekleşmesine kadar yol gösteren,danışman hocam sayın Prof. Dr. Özcan ÖZKAN' a teşekkür ederim.

Çalışma esnasında materyal temininde ve arazi çalışmalarında yardımcı olan, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilm Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Sırrı KAR' a teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bu çalışmanın kaleme alındığı dönemde kaybettiğimiz, canım babama rahmet ve uçmağa varmasını diliyor; sevgili annem, kardeşlerim, eşime hayatımda olup bana her zaman destek oldukları için ve adını burada sayamadığım, katkısı olan değerli arkadaşlarıma şükranlarımı sunuyorum.

Hakan TÜFEK

Çankırı, Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET …… i

ABSTRACT …….. ….. ii

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR..... iii

SİMGELER DİZİNİ..... vi

ŞEKİLLER DİZİNİ..... viii

ÇİZELGELER DİZİNİ..... ix

1. GİRİŞ ve AMAÇ……..... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ……. 3

2.1 Tarihçe……..... 3

2.2 Etken Morfolojisi…….……... 3

2.2.1 Spor morfolojisi……..…… 4

2.3 Sistematik Sınıflandırma……... 7

2.4 Biyolojik Döngüsü……... 8

2.5 Epidemioloji……...…… 13

2.5.1 Bulaşma yolları……..…….. 14

2.5.2 Türkiye' deki dağılımı ……...……..... 15

2.5.3 Dünya' daki dağılımı……... 17

2.6 İmmunolojisi……... 20

2.7 Klinik Bulgular…….…….. 21

2.8 Teşhis Yöntemleri……..... 23

2.8.1 Işık ve floresan mikroskobu……..…….. 25

2.8.2 Elektron mikroskobu……..……. 27

2.8.3 Hücre kültürü……...……..... 27

2.8.4 Seroloji…..... 28

2.8.5 Moleküler Yöntemler……..…… 29

2.9 Ayırıcı Tanı…….……. 30

2.10 Tedavi…….…… 31

2.11 Korunma ve Mücadele……...…….. 33

3. MATERYAL VE YÖNTEM……. 35
3.1 Materyal……...…… 35
3.2 Hayvan Tesisleri…….…. 35
3.3 Yöntem……..... 36
3.3.1 Tavşanlar ve klinik değerlendirme……..... 36
3.3.2 Kan alma ve serum eldesi…….....…. 36
3.3.3. Serolojik analiz…… 38
4. BULGULAR…….……..… 39
4.1 Tesisler ve Seroloji……...…… 39
4.1.1 A Tesisi…….. 39
4.1.2 B Tesisi…….. 40
4.1.3 C Tesisi…….. 40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……. 42
KAYNAKLAR…….. 45
ÖZGEÇMİŞ..... 52

SİMGELER DİZİNİ

PDSA	People’ s Dispensary for Sick Animals
AIDS	Acquired İmmune Deficiency Syndrome
HIV	Human Immunodeficiency Virus
NIH-NIAID	National Institute of Health - National Institute of Allergy and Infectious Diseases
USA	United States of America
EPA	Environmental Protection Agency
CCL	Contaminant Candidate List
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
dot-ELISA	Dot - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FISH	Fluorescence İn Situ Hybridization
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polymerase Chain Reaction
MN-PCR	Multiplex Nested Polymerase chain reaction
IFAT	İndirekt Floresan Antikor Testi
IIF	İndirekt İmmunofloresanTesti
CIA	Carbon İmmunoassay Test
IF	İmmunofloresan Testi
EIA	Enzyme İmmunoassay
RIA	Radyoimmunoassay
IFA-MAbs	Immunofloresan Assay – Monoclonal Antibodies
Ig M – Ig G	İmmunoglobulin M – Immunoglobulin G
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
MAT	Microplate Agglutination Test
Spp	Tür
CD (4-8)	Cluster of Differentiation 4 - 8
LSU	Large Subunit
SSU	Small Subunit
OD	Optik Dansite

ABTS	2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit] -Diamonyum Tuzu
G	Gauge
NaOH	Sodyumhidroksit
IM	Intramuscular
IV	Intravenöz
SC	Subcutan
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
m-RNA	Messenger Ribo Nükleik Asit
EF	Elongation Factor
PV	Parazitofor Vakuol
ITS	Internal Transcribed Spacer
GTTT	Guanin – Timin – Timin - Timin
AML	Akut Miyeloid Lösemi
S	Svedberg
Mb	Megabase
TEM	Transmission Electron Microscope
°C	Santigrat Derece
AB	Avrupa Birliği
g	Gram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
kg	Kilogram
µl	Mikrolitre
n	Numara – Örnek Sayısı
mm	Milimetre
vb	ve bunun gibi
%	Yüzde
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Encephalitazoon cuniculi* spor morfolojisi……. 6

Şekil 2.2. *Encephalitazoon cuniculi* şematik gelişim evreleri…… 10

Şekil 2.3. Spor germinasyonu sırasında polar filamentin ters dönmesi…….. 12

Şekil 2.4. *Encephalitazoon cuniculi* enfeksiyonunda gözde ritmik vertikal hareketler olur (nistagmus)……. 22

Şekil 3.1. Tavşanların zapturapt altına alınma işlemi……. 37

Şekil 3.2. Tavşan kulağından kan alma işlemi……... 37

Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan ELISA kiti…… 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. *E. cuniculi'* nin prevalansına ilişkin uluslar arası veriler …… 17
Çizelge 2.2. İnsanlarda Encephalitozoon cuniculi serolojik pozitiflik oranları (Halánová ve ark., 2003)…… 19
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan gereçler…….. 35
Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında tesislerin özellikleri ve örnek sayısı……... 36
Çizelge 4.1. Çalışmaya alınan A tesisi seroloji test sonuçları……. 39
Çizelge 4.2. Çalışmaya alınan B tesisi seroloji test sonuçları…….. 40
Çizelge 4.3. Çalışmaya alınan C tesisi seroloji test sonuçları…….. 41
Çizelge 4.4. Çalışmaya alınan tesislerde *Encephalitazoon cuniculi* seroprevalansı… 41

1.GİRİŞ

Tavşanlar geçmişte etleri ve kürkleri için yetiştirilmiştir. Günümüzde ise kedi ve köpeklerden sonra en çok tercih edilen pet hayvanı olarak popüleritesi oldukça artmıştır. 2018 yılı verilerine göre Birleşik Krallık ülkelerinde 1 milyon tavşan, pet hayvanı olarak beslenmektedir. Bununla birlikte endüstriyel alanda ve laboratuvar hayvan bilimi alanında önemli bir yere sahiptirler (PDSA 2018).

Encephalitozoon cuniculi, başta tavşanlar olmak üzere kemirgenler, kuşlar, lagomorflar, etoburlar, çiftlik hayvanları, insan dışı primatlar ve insanlar da dahil olmak üzere bir çok memelinin ökaryotik, tek hücreli, zorunlu hücre içi yaşayan, sporlanan, monoksen, zoonotik, mikrosporidyan, bir parazitidir (Didier and Weiss 2006, Baldotto et al. 2015, Otto et al. 2015, Rodriguez-Tovar et al. 2017).

Son yıllarda, edinsel bağışıklık yetersizliği sendromu (Acquired İmmune Deficiency Syndrome-AIDS) hastalarında yüksek morbidite, zaman zaman mortaliteye sebep olan fırsatçı parazitler olarak Mikrosporidialara klinik ilgi artmıştır. Ayrıca teşhis tekniklerinin gelişmesi sayesinde, insan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus-HIV) negatif hastalarda da Mikrosporidia enfeksiyonarının bildirilme sayısı artmıştır. Organ nakli alıcıları, kemoterapi ve immunsupresif ilaç uygulanan hastalar (AIDS hastaları), evcil kemirgen ve tavşan besleyen kişiler, deneysel hayvan laboratuvarı çalışanları, turistler, çocuklar ve yaşlı insanlar Mikrosporidia enfeksiyonları açısından risk altındadır (Aguila et al. 2006, Hofmannova et al. 2014, Rodriguez-Tovar et al. 2016, Han and Weiss 2017).

Mikrosporidian enfeksiyonların kaynağı henüz tam olarak belirlenememiştir. Kosta Rika' da kontamine su ile sulama sonucu marul, maydanoz, kişniş ve çilekde Mikrosporidia etkeni tespit edilmiştir. Su kaynaklarında da tespit edilen Mikrosporidialar, Amerika Birleşik Devletleri'nde (USA) Ulusal Sağlık Enstitüsü - Ulusal Alerji ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü (National Institute of Health - National Institute of Allergy and Infectious Diseases- NIH-NIAID) kurumu tarafından insidansı hızla artma potansiyeli olan öncelikli patojenler olarak kategori B listesine dahil edilmiştir.

Ayrıca Birleşik Devletler'de Çevreyi Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency-EPA) kurumu tarafından 1998 ve 2005 yıllarında yayınlanan Kirletici Aday Listesi (Contaminant Candidate List-CCL-1/2) içerisinde, su kaynaklı bulaşma ihtimali olan mikrobiyal kirletici ajanlar listelerine dahil edilmiştir (Dider and Weiss 2006, Moretto et al. 2012). Antartika hariç tüm kıtalarda Microsporidiosis vakası tanımlanmıştır. Mikrosporidia sporlarının yaygın ve dayanıklı olması, insanlar için devamlı risk oluşturmaktadır (Moretto et al. 2012).

Bu çalışmada; tavşanlarda enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme-linked Immunosorbent Assay - ELISA) yöntemiyle serolojik olarak *Encephalitozoon cuniculi* seropozitifliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Tarihçe

Encephalitozoon cuniculi, memelilerde patojen olarak ilk tanımlanan Mikrosporidia' dır (Lange et al. 2009).

Wright and Craighead (1922), motor paraliz bulguları olan tavşanların merkezi sinir sisteminde, böbreklerinde ve idrarında "muhtemelen ilkel" porotozoon benzeri mikroorganizmalara rastlamışlardır; bu çalışma, etkene ve oluşturduğu hastalığa ilişkin yayınlanmış en eski kaynaktır. Yine Twort and Archer (1922), tavşanlarda ilk kez spontan ensefalomiyelit ve spontan nefrit tablosunun birlikte görüldüğünü ve etkenin bir virüs olabileceğini bildirmişlerdir. Levaditi, Nicolau ve Schoen, 1923 yılında etkeni *E. cuniculi* olarak isimlendirmiştir (Berkin ve Kahraman 1983).

İnsanlarda ilk Encephalitozoon enfeksiyonu 1959 yılında, Japonya' da çiftlikte yaşayan 9 yaşında; 3 haftadan uzun süren, tekrarlayan yüksek ateş, nöbet sonrası bilinç kaybı, kusma ve baş ağrısı olan bir hastada bildirilmiştir (Matsubayashi et al. 1959). O dönemde, tanı sadece spor morfolojisine bakılarak yapılıp kesin tür tayini yapılamadığından kesin olarak *E. cuniculi'* ye atfedilmemelidir (Mathis et al. 2005).

Türkiye' de tavşanlarda ilk *E. cuniculi* enfeksiyonu bildirimi, 3' ü aniden ölen ve aynı laboratuvara ait, diğeri paraliz teşhisi konan toplamda 4 hayvanın, merkezi sinir sisteminde fokal granülom bulguları ile Berkin ve Kahraman (1983) tarafından yapılmıştır.

2.2 Etken Morfolojisi

Mikrosporidialar, ökaryotik hücre olarak tanımlanmasına rağmen bazı tipik ökaryotik özelliklerden yoksundur. Ribozom (70S), ribozomal alt ünite (30S ve 50S) ve rRNA

bölge (16S ve 23S) özellikleri ve mitokondri, peroksizom, sentriol ve tipik bir golgi aygıtına sahip olmaması ile prokaryotik organizmalara benzerken, zarla çevrili bir çekirdek, intrasitoplazmik membran sistemi ve mitotik iğciklerle gerçekleşen kromozomal bölünme özellikleriyle de ökaryotik organizma olarak değerlendirilmektedir (Jordan et al. 2006, Yazar vd. 2013).

Mikrosporidialar, reseptör kullanmadan hedef hücreye sporoplasmlarını aktarabildikleri ekstrüzyon aparatına (polar tüp) sahiptirler (Aguila et al. 2006).

Işık mikroskobunda, merontlar çoğu zaman yuvarlak ya da oval şekilli hücrelerdir. Merontu, protozoonunun diğer hayat safhaları olan sporont ya da sporoblasttan ayırmak zordur. Ancak giemsa boyası gibi basit boyama teknikleri kullanıldığında merontlar sade plazma zarından dolayı daha fazla boyanın hücre içine nüfuz etmesi sonucu daha koyu boyanırlar ve daha büyük çekirdekle kolayca ayırt edilirler. Ancak sporont ve sporoblast plazma zarının etrafındaki ilave tabakalar bulunur. Bu nedenle de sitoplazmaya fazla boya geçişi olmadığından daha açık renkte görünürler. Bir çekirdekli veya bitişik iki çekirdekli basit hücre olan meront; sitoplazması granüllü olup çok az gelişmiş veya hiç bulunmayan endoplazmik retikulum, çok sayıda serbest ribozom ve bir ilkel tipik olmayan golgi cisimciği içerir, mitokondri yoktur. Çekirdeğin, geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope - TEM) incelenmesinde çift zar bulundurmasıyla da sitoplazmadan ayırt edilebilmektedir (Yaman vd. 2015).

Sporont sitoplazmasında çekirdeğin etrafında yoğun endoplazmik retikulum kesecikleri bulunur. Golgi aparatı meronta kıyasla daha belirgindir (Yaman vd. 2015).

2.2.1 Spor Morfolojisi

Encephalitozoon cuniculi sporları elipsoid yapıda olup boyutu ortalama 1.5×2.5 μm dir. Sporlar, **spor duvarı, sporoplasma ve ekstrüzyon aygıtı** olmak üzer 3 temel yapıya sahiptir (Sancak ve Akyön 2005). Sporun iki boyutlu görünümü Şekil 2.1'deki gibidir.

Spor duvarı, çevresel direnç sağlar; elektron mikroskobisi ile gözlenebilen üç tabakadan oluşur. Bunlar; ekzospor, endospor ve plazma membranıdır.

- Ekzospor: En dışta yer alan, elektronca yoğun, glikoprotein yapısındaki tabakadır.

- Endospor: Elektronca fakir ve temel bileşeni kitin olan, ekzospora bir köprü ile bağlanan.tabakadır Anterior ucu sporun en ince kısmıdır ve polar tüpün dışarı çıkması esnasında parçalanmaktadır (Xu and Weiss 2005).

- Plazma membranı: En içte, sporoplazmayı kuşatan yaklaşık 7 nm kalınlığındaki tabakadır.

Sporoplazmada çekirdek (enfektif materyal, ökaryotik, monokaryon), anchoring disk (tutunma diski), mitozom, atipik golgi aygıtı (golgi aygıtı benzeri organel) ve endoplazmik retikulum organelleri yer alır (Yaman vd. 2015). Mitokondri, peroksizom ve tipik bir golgi aygıtına sahip değillerdir.

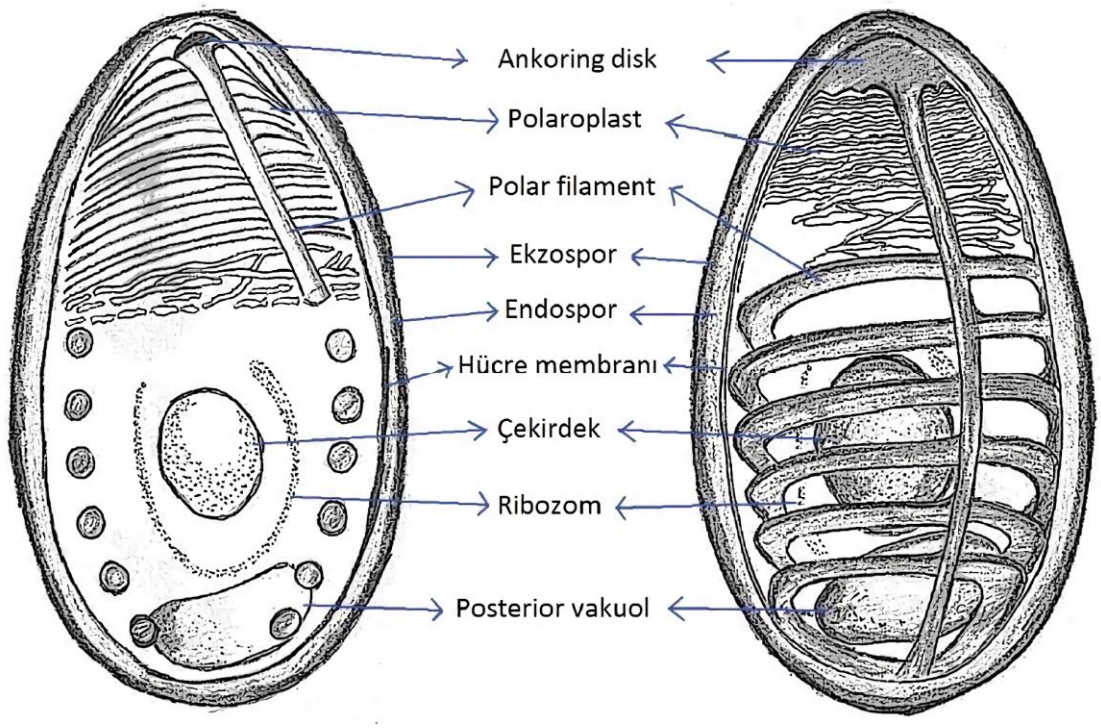
Ekstrüzyon aygıtı: Polar filament (polar tüp), polaroplast (spor içinde gelişen en son organeldir), ve posterior vakuol olmak üzere 3 yapıdan oluşur (Franzen 2005).

- Polar filament: *E.cuniculi* sporlarının polar filamentleri, 4-7 sarmallı (genellikle 5-6 sarmallı) yapıdadır. Uzunluğu, 50–100 μm, çapı 0.1–0.15 μm boyutları arasındadır. Esnek bir yapıya sahiptir, ekstrüyon sırasında çapı 0.1-0.25 μm arasında değişir hatta 0.4 μm' e kadar artabilir; sporoplasma geçişinden sonra, uzunlukta %5-10 kısalma olur (Xu and Weiss 2005). Sporun anterior ucundaki ankoring diske mantar şeklinde bağlanmaktadır. Polar filament, anchoring diske bağlandığı düz kısım ve türüne bağlı olarak sporoplasma etrafında 4-30 sarmal oluşturan posterior kısım olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Düz kısım ve anterior uca en yakın olan sarmalın çapı, distaldeki sarmallardan daha geniştir.

- Polaroplast: Atipik bir golgi cisimciğidir. Lamellar ve veziküler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Lamellar polaroplast membranları genellikle anteriorda, veziküler polaroplast ise sporun merkezine doğru lokalize olmuştur ve tubuler şekildedir.

- Posterior vakuol: Büyüklük ve şekli olarak farklılık gösterir, sporun arka kısmında lokalize olmuştur. Polar filamentin bu yapı tarafından meydana getirildiği düşünülmektedir.

Encephalitozoon cuniculi, 11 kromozomlu, 1997 potansiyel protein kodlama geni olan, yaklaşık 2.9 megabase (Mb) DNA dizilimine sahiptir. Zorunlu hücre içi parazit olarak güçlü konak bağımlılığı vardır ki trikarboksilik asit döngüsü ve bazı enzimatik reaksiyonlar için gerekli bazı genlerin eksikliği bunu doğrular niteliktedir (Katinka et al. 2001). Zira hücre içi biyosentetik olaylar minimuma indirilmiştir, etken konak hücre metabolit kaynaklarına bağımlıdır (Bohne et al. 2011).



Şekil 2.1 *Encephalitazoon cuniculi* spor morfolojisi (Çetinkaya 2014)

2.3 Sistematik Sınıflandırma

Ortak bir atadan gelen, atipik (ilkel) ve tipik (gelişmiş) iki grup Mikrosporidia vardır. İlkel Mikrosporidiaların yaklaşık 13 cins, 42 türü bulunmaktadır. Bu şubede tespit edilerek sınıflandırılmış organizmların çoğu, yaklaşık 190 cins 1500 türü kapsayan gelişmiş Mikrosporidialardır (Stentiford et al. 2016). İnsanları enfekte eden en az 10 cins ve 16 türün tespit edildiği bildirilmiştir; Anncaliia (eski ismi - Barachiola) *(Anncaliia algerae, A. connori, A. vesicularum*), Tubulinosema (*Tubulinosema acridophagus),* Encephalitozoon (*Encephalitozoon cuniculi, E. hellem, E. intestinalis),* Enterocytozoon (*Enterocytozoon biuneusi),* Microsporidium (*Mircosporidium ceylonensis, M. africanum*), Nosema (*Nosema ocularum*), Pleistophora (*Pleistophora ronneafiei*), Trachipleistophora (*Trachipleistophora hominis, T anthropophthera*), Endoreticulatus (*Endoreticulatus spp.),* Vittaforma (*Vittaforma corneae)* (Meissner et al. 2012, Stentiford et al. 2016).

Mikrosporidia ilk bulunuşundan itibaren farklı şekillerde sınıflandırılmıştır. Mikrosporidian parazitlerin sınıflandırılmasında temelde, parazitin doğal konak ile olan ilişkisi, spor veya diğer gelişme dönemlerinin yapısal özellikleri, nükleus yapıları (monokaryon – diplokaryon), polar filament helezon sayısı, gelişme dönemlerinde konak hücre ile ilişkileri (konak hücre sitoplazmasıyla direkt kontakt, parazitoforus vakuol (Parasitophorous Vacuole-PV) içinde replikasyon, endoplamik retikulum içinde replikasyon, sporophorous vezikül içinde sporogoni), hücre ve çekirdek bölünme tarzı dikkate alınmaktadır (Joseph et al. 2005). Son yıllarda moleküler teknikler de sınıflandırma ve filogenetik çalışmalarda belirleyici rol oynamaktadır. Organizma hakkında hücrealtı yapılar ve moleküler veriler netleştikçe insanları da enfekte eden bazı tür adları değişmiştir (*Nosema algerae - Brachiola algerae – Anncaliia algerae; Septata intestinalis – Encephalitozoon intestinalis; vb*.) (Ramanan and Pritt 2014).

Edlind et al. (1996) tarafından yapılan alfa ve beta tubulin genlerinin dizi analiz verilerine göre Mikrosporidia'nın protozoolardan çok mantarlara daha yakın olduklarını bildirmişlerdir. Translasyonda görev alan elongasyon faktör (Elongation Factor-EF) EF-1 ve EF-2 ve Ribo Nükleik Asit (RNA) polimeraz II gen dizisinin karşılaştırılması ile

Mikrosporidia ve mantarlar arasındaki yakın ilişkiyi destekler sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca *Varimorpha necatrix* ve *Nosema locustae*'nın mitokondrial ısı şok proteinleri (Heat Shock Protein- HSP) HSP-70 geninin dizi analizi sonucunun protozoadan çok mantar HSP-70 gen dizisiyle daha yakın ilişkili olmasından dolayı günümüzde mantarlar aleminde yer almaktadır. (Hirt et al. 1999, Joseph et al. 2005).

Encephalitozoon cuniculi'nin, rRNA (ribozomal) genlerinin internal transcribed spacer (ITC) alanındaki GTTT diziliminin tekrarına göre, *E. cuniculi* I (tavşan- 3 GTTT tekrarlı), *E. cuniculi* II (fare- 2 GTTT tekrarlı), *E. cuniculi* III (köpek- 4 GTTT tekrarlı), *E. cuniculi* IV (insan- 5 GTTT tekrarlı) dört ana genotipi vardır (Didier et al. 1995, Talabani et al. 2010, Latney et al. 2014, Hinney et al. 2016).

Encephalitozoon cuniculi' nin sınıflandırılması;

Kingdom: Fungi

Phylum: Microsporidia

Clasis: Microsporea

Ordo: Microsporida

Familia: Unikaryonidae

Genus: Encephalitozoon

Species: *Encephalitozoon cuniculi* şeklindedir

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6035, 2019).

2.4 Biyolojik Döngüsü

*Encephalitozoon cuniculi'*nin enfektif formu, çevresel etkenlere dirençli spor formdur, ortamda uzun süre hayatta kalabilir. Gelişimlerini, konak hücreden köken aldığı düşünülen bir vakuol içinde gerçekleştirirler (parazitoforus vakuol) (Joseph et al. 2005).

*Encephalitozoon cuniculi'*nin yaşam döngüsünün tamamlanması 3 ila 5 hafta sürer (Jordan et al. 2006). Pakes et al. (1975) tavşan choroid plexus hücre kültüründe *E. cuniculi* yapısı ve gelişim dönemlerini gözlemlemek üzerine yaptıkları çalışmalarda,

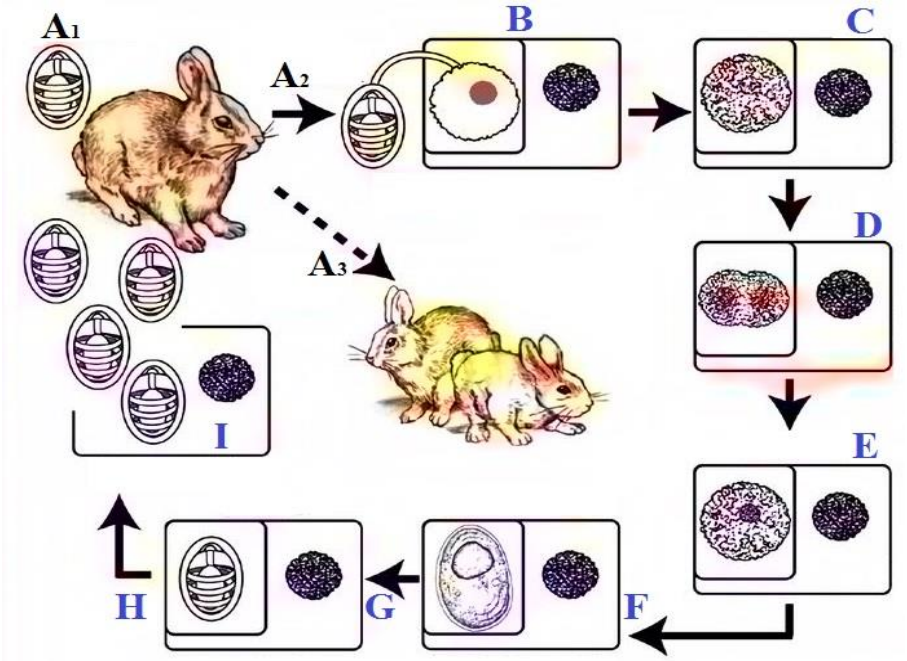
inokulasyonu takiben 24. saatte konak hücrede etkenin merontlarının, 2. günde olgun sporlararın varlığını ve yaşam döngüsünün chroid plexus hücre kültüründe yaklaşık 48 saat olduğunu bildirmişlerdir.

*Encephalitozoon cuniculi'*nin epitelyal ve endotelyal hücreleri, böbrek tübül hücreleri, kalp kası hücreleri, fibroblast ve makrofajları enfekte edebildiği bildirilmiştir (Weber et al. 1997, Couzinet et al. 2000, Franzen et al. 2005).

Sporlar enterositleri enfekte edip, muhtemelen Peyer plakları, interepitelyal lenfositler, interepitelyal fagositler veya peritoneal makrofajlar aracılığıyla kan dolaşımı, lenfatik sistem ile önce kalp, akciğer, karaciğer ve dalağa ulaşır ki bu aşamada tavşanlar genellikle asemptomatiktir, bu organlarda sınırlı hasar meydana gelir (Jordan et al. 2006, Rodriguez – Tovar et al. 2016). *E. cuniculi* sporlarının son hedef noktası, konakçının immun yanıtıyla dengeye ulaştığı böbrekler, göz ve beyindir. Etken bu organlarda kinik bulgulara neden olmadan süreden bağımsız kalabildiği gibi, bazı tavşanlarda organlar etkenin invazyonundan daha fazla etkilenir ve klinik bulgular şekillenebilir (Jordan et al. 2006).

Mikrosporidian yaşam döngüsü, olgun spor veya enfektif dönem, proliferatif dönem (merogoni) ve spor oluşum dönemi (sporogoni) olmak üzere üç dönemi kapsar (Han and Weiss, 2017). Şekil 2.2'de *Encephalitazoon cuniculi'* nin tavşanda gelişim evreleri resmedilmiştir (Carly et al. 2006).

Mikrosporidian parazitler hücre içerisine deneysel olarak gösterilmiş iki yol ile giriş yapmaktadır. Bunlar; aktif invazyon ve endositozis'dir. Franzen et al. (2005), *Encephalitozoon cuniculi'*nin konak hücreye girişi ve davranışlarını incelemek üzere yaptıkları çalışmada fagositoz yoluyla endostozun aktif invazyona göre 10 kez daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir



Şekil 2.2 *Encephalitozoon cuniculi*'nin hücre içi yaşam döngüsü. İdrar ya da dışkı ile atılan *E.cuniculi* sporları (**A1**) ağız yolu ile yutulur (ya da solunur) (**A2**). Sindirim sisteminde bağırsak duvarına nüfuz ederek sistemik dolaşıma girer. Spor, böbrek gibi birçok organa yayılabilir. (**B**) Olgun spor, sporoplazmasını ve çekirdeğini konak hücreye iletmek için polar tübül kullanır. (**C**) Meront: Sporoplazma bölünerek merontlar (şizontlar) oluşur. (**D**) Proliferatif parazit formları (şizonts) parazitofor vakuol içinde çoğalır. İkili fisyon, hücre içi vakuolün zarı ile temasla meydana gelir. (**E**) Merontlar sporonta dönüşür. (**F**) Olgunlaşma ilerledikçe, sporontlardan da sporoblastlar oluşur. (**G**) Olgunlaşma devam ettikçe, sporoblastlardan parazitofor vakuol içerisinde olgun sporlar oluşur. (**H**) Vakuole patlar, (**I**) sporlar renal tübül lümeninde serbest bırakır ve idrarla dışarı atılır. Transplesantal bulaşma (**A3**) (Carly, 2006).

Aktif invazyon

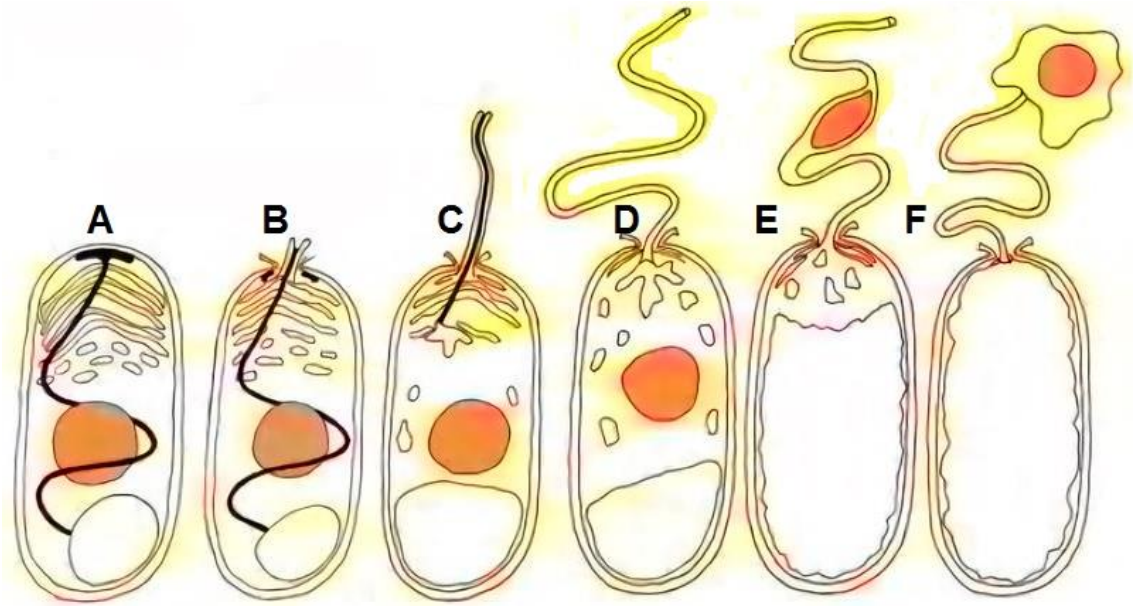
Mikrosporidia sporları, pasif dönemlerinde içerde sarmal halde durup, aktif dönemde konak hücre plazma zarını delebilecek kuvvette ekstrüde olan polar tüp aracılığıyla içeriklerini konak hücreye aktararak özel bir enfeksion yöntemi sergilerler (Ghosh et al. 2011).

Ortamdaki çevresel uyarıcılar (pH değişimleri, dehidasyon-rehidrasyon, çeşitli anyon ve katyonlar, musin veya polianyon, kalsiyum geçişi, hidrojen peroksit, ultraviyole, vb.) ile spor aktif hale gelir. Polaroplast ve posterior vakuol şişer (ozmotik basıncın anormal artışı ile) ve polar tüp zıt yönde dönerek anchoring diskten ayrılır. Polar tüp ekstrüde edilirken lastik eldivenin parmaklardan çıkarken sıyrılması gibi ters yöne ivmelenir,

protoplasttan gelen zarlar esneyip uzayarak polar tüp ile bağlanır. Ekstrüzyon, büyük bir kuvvetle meydana gelir ve konakçı hücrede herhangi bir tepki oluşmadan penetrasyon gerçekleşir. Posterior vakuolün hacimsel olarak genişlemesi sporoplazma ve çekirdeğin polar tüp aracılığı ile konakçı hücreye transfer edilmesine katkıda bulunur (Şekil 2). Polar tüpün konakçı hücre içindeki kısmı, parazitin dış kısmını oluşturmak için sporoplazmayı sarar. Sporoplazma ikiye bölünerek merontları oluşturur. *E. cuniculi'*nin konak hücre içindeki gelişim evreleri, konak hücreden köken aldığı düşünülen PV içinde olur (Wilson 1979, Jordan et al. 2006, Han and Weiss 2017).

Merontlar yapısal olarak tek katlı zarla çevrilmiş basit hücrelerdir. Parazit, enterosit, makrofaj, mezenkim hücreleri gibi farklı hücrelere yerleşip, besinlerini bu konak hücrelerden absorbe ederek gelişimlerine devam etmektedirler. Merontlar, merogoni olarak bilinen üreme şekliyle vejetatif bir şekilde çoğalır. Bu aşamanın sonunda merontun plazma membranının dış kısmında, elektronca yoğun materyal örtüsü birikmeye başlar ve merontlar sporonta dönüşür (Yaman vd. 2015).

Sporontlar bölünerek ve gelişerek sporoblastları oluşturur. Sporoblast etrafındaki kalın duvar daha da yoğunlaşmaya ve kalınlaşmaya başlar. Genel olarak spora ait organellerin birçoğu (polar filament, anchoring disk, anterior ve posterior vakuol, plazma membranı) bu safhada oluşur ve/veya gelişir. Özellikle Mikrosporidialar için karakteristik olan polar filament oluşumuna ait ilk bulguların gözlenmesi bu safhanın sporoblast olduğunu teyit etmede önemlidir. Sporoblastlar olgunlaşarak enfektif sporu oluştururlar (Latney et al. 2014, Yaman vd. 2015). Konakçı hücre, olgun sporlarla dolduğunda patlar ve sporlar serbest kalır. Serbest kalan olgun sporlar, çevredeki hücreleri enfekte edebilir, başka bir konak ile uzak dokulara (beyin, böbrek, akciğer, lens, miyokard) taşınabilir, deri yoluyla ve dışkı-idrar atıklarıyla dış ortama atılabilir (Joseph et al. 2005, Jordan et al. 2006).



Şekil 2.3 Spor germinasyonu sırasında polar filamentin ters dönmesi. (A) Olgun spor. (B) Ankoring disk parçalanır ve polar filament ters dönmeye başlar. (C) Polar filament ters dönmeye devam eder. (D) Polar filament tamamen ters döner ve sporoplasma polar filament içine doğru zorlanır. (E) Sporoplasma polar filament içine geçer. (F) Sporoplasma konak hücre sitoplazmasına geçer (Keeling and Fast 2002).

Endositozis

Mikrosporidia sporları, polar tüp ekstrüde olmadan konak hücre tarafından endositoz yolu ile hücre içine alınır. İçerisinde mikrosporidia sporlarını içeren endozom olgunlaşarak lizozom ile birleşir. Lizozom içinde sporlar hızla yıkımlanır; her nasılsa olgunlaşan lizozomun içinde yıkımlanmayan bazı sporlar aktif hale geçip polar tübü ekstrüde olarak lizozomdan kurtulup konak hücre sitoplazmasını enfekte eder (Franzen 2005). Kemirgen doku modellerinde yapılan deneysel in vitro çalışmalarda, etkenin endositoz ile hücreye girişini birincil enfeksiyon yolu olarak göstermemişlerdir (Latney et al. 2014).

Yukarıda bahsedilen hücreye giriş yollarının dışında, konak hücre ile temas yerinde, polar tüpün hücre membranını delmeden mekanik bir kuvvetle spor içeriğini hücre içine iterek kanal benzeri invaginasyon ile PV oluşturabileceği öne sürülmektedir (Bohne et al. 2011).

2.5 Epidemiyoloji

Mikrosporidialar bütün dünyada fırsatçı patojenler olarak kabul görmeye başlamış ve Arjantin, Avustralya, Botswana, Brezilya, Kanada, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Almanya, Hindistan, İtalya, Japonya, Hollanda, Yeni Zelanda, İspanya, Sri Lanka, İsveç, İsviçre, Uganda, Tayland, Birleşik Krallık, Amerika Birleşik Devletleri ve Zambiya gibi birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde microsporidiosis vakası bildirilmiştir (Joseph et al. 2005).

İlk olarak tavşanlarda tespit edilen *E. cuniculi,* insanlarda dahil olmak üzere yirmiden fazla memeli türde ve kuşlarda rapor edilmiştir (Weese and Fulford 2011, Hinney et al. 2016).

Tavşanlarda yapılan çalışmalar sonucunda cinsiyet ile *E. cuniculi* prevelansı arasında anlamlı bir ilişki bildirilmemiştir (Okewole 2008, Cray and Rivas 2013, Baldotto et al 2015, Pan et al. 2015).

İnsanların, *E. cuniculi* III suşuyla daha nadir olmakla birlikte bilinen tüm suşlarıyla (*E. cuniculi* I-II-III ve IV) enfekte olabildiği bilinmektedir (Hinney et al. 2016).

İnsanlarda *E.cuniculi*'ye ilişkin seroprevalans verileri oldukça değişkendir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar, tropikal hastalık geçmişi olan veya tropikal ülkeleri ziyaret etmiş insanlar çoğunlukta olmak üzere % 3.9 – 42 arası değişik oranlarda seropozitiflik bildirilmiştir (Weese and Fulford 2011).

Mikrosporidiaların daha iyi anlaşılması ve tanısı hakkında artan verilere rağmen, karmaşık epidemiyolojisini aydınlatmak için daha çok araştırma yapmak gerekmektedir. Zoonoz mikrosporidiaların insanlardaki prevalansını ortaya koyan çalışmalar yetersizdir (Lobo et al. 2012).

2.5.1 Bulaşma Yolları

Tavşanlarda enfeksiyonun meydana gelmesi, enfektif doz ve konağın direncine bağlı olmakla birlikte, sporların ağız yoluyla alınması (kafeste saçılmış idrar – dışkı, etken ile bulaşmış yem – su), solunması veya transplasental (vertikal bulaşma; yavruda üveit – fukoklastik, granülamatöz-, hipopiyon ve katarakt meydana gelmesine neden olur) yolla bulaşması ile olur (Rodriguez-Tovar et al. 2016, Jordan et al. 2006). Ayrıca, tavşanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, travmatik transmukozal, intravenöz, intratekal ve rektal bulaşma yolu ile de enfeksiyon oluşturulabildiği bildirilmiştir (Latney et al. 2014). Tavşanların % 50'sinde hastalık meydana gelmesi için sadece 46 *E. cuniculi* sporunun yeterli olduğu bildirilmiştir (Jordan et al. 2006).

Mikrosporidianın insanlara bulaşan türleri, hem su kaynaklarında hem de vahşi, evcil ve gıda amaçlı üretilen çiftlik hayvanlarında, laboratuvar hayvanlarında tespit edilmiştir (Anane and Attouchi 2010, Askari et al. 2015). Polonya'da yapılan bir çalışmada marketten alınan numunelerden maydanozda *E. cuniculi* sporları tespit edilmiştir (Jedrzejewski et al. 2007). Etkenin su, gıda ve zoonotik yolla bulaşması endişelendirici bir durumdur.

İnsanlar arasında bulaşmanın, hayvanlardaki gibi dışkı, idrar, solunum salgıları yoluyla olabileceği düşünülmektedir. Transplasental geçişin sadece hayvanlarda görüldüğü bilinmektedir. Sporlar, enfekte hayvanların idrar ve dışkıları ile atılarak su kaynaklarını kontamine edebilmektedir. Sporların çok küçük ve dış koşullara karşı dayanıklı olması enfeksiyonun bulaşında önemlidir. Mikrosporidia türlerinin konak seçiciliğinin olmadığı düşünülmekte, horizontal bulaşma için homoseksüel ilişki, intravenöz ilaç kullanımı, yüzme havuzlarındaki sular, saunalar, kontamine su ve mesleki temas risk faktörleri arasında gösterilmektedir (Oğuz 2013).

Tavşanlarda enfeksiyonun 35. günden başlayarak, 2-3 ay süreyle idrardan spor saçılımı olduğu bildirilmiştir (Jordan et al. 2006).

2.5.2 Türkiye'deki Dağılımı

Ülkemizde insanlarda Microsporidiosis görülme sıklığına ilişkin çalışma sayısı çok azdır. Yapılan çalışmaya göre Karaman, Malatya ili ve çevresinden İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi polikliniklerine başvuran değişik hasta gruplarından oluşan 2665 kişinin %8,5'inde; Atambay ve diğerleri, sindirim sistemi yakınması ile İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi polikliniklerine başvuran 781 kişinin % 6,5'inde; Karaman ve diğerleri, yine İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi' nde kanser tanısı almış 320 kişinin % 10,9'ında ve sağlıklı bireylerden oluşan 320 kişilik kontrol grubunun ise % 5,6'sında; Türk, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli poliklinik ve kliniklerden rutin inceleme için gönderilen 225 ishalli dışkı örneğinin % 9,8'inde; Yazar ve diğerleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi acil birimine başvuran Akut Myeloblastik Lösemili (AML) - M3 bir hastada, Büget ve diğerleri ise Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tedavi gören bir AIDS hastasında Mikrosporidia spp. bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda tür ayrımı hakkında bilgi yer almamaktadır. Ayrıca PCR yöntemi ile immun sistemi baskılanmış bir çocukta; IFA - MAbs yöntemi ile onkoloji servisinde tedavi gören bir hastada *E. intestinalis* tespit edilmiştir (Çetinkaya 2014).

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına Ekim 2011 – Kasım 2012 yılları arasında gelen 200 ishalli dışkı örneğinin 77'sinde Microsporidia spp. tesbit etmiş, daha sonra Konvansiyonel Multipleks Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MN PCR) ile tiplendirme yapılmış ve 77 örneğin 70'inin Encephalitazoon spp., 70 örneğin 22'sinin *E. cuniculi* olduğunu bildirmiştir (Oğuz 2013).

Bağışıklık sistemi baskılanmış ve immun yetmezliği olan bireylerde mikrosporidia enfeksiyonlarına ilişkin yayınlanmış çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte bu mikroorganizmaların immunokompetan bireylerde mevcudiyetine ilişkin veri azdır. Mumcuoğlu ve diğerleri (2016), akut (74 hasta) ve kronik (41 hasta) diyareli immunokompetan hastalarda ve sağlıklı bireylerde (88 kişi) mikrosporidia prevelansı üzerine yaptıkları çalışmada; mikrosporidia prevelansının sırasıyla % 27, 34.1, 45.5 olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışma sonucunda, mikrosporidia pozitiflik oranının

ilerleyen yaşla arttığı ve analiz edilen katı dışkılarda % 51.4 pozitiflik saptandığı bildirilmiştir.

Türkiye'de tavşanlarda *E.cuniculi* enfeksiyonu ilk olarak Berkin ve Kahraman (1983) tarafından, 1976 yılında paraliz teşhisi konup ölen bir tavşan ve 1983 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarında aniden ölen üç tavşanda tesadüfi olarak tespit edilmiştir.

Ankara'da bir hayvan merkezdeki hayvan bakım elemanlarında *E. cuniculi* taraması amacıyla yapılan bir çalışmada, beş işçiden serum ve idrar örnekleri alınmış; İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) yöntemi ile değerlendirilen serum örneklerinden bir tanesi *E. cuniculi* seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca seropozitif örneğin sahibi olan işçinin idrar örneğinde modifiye Trikrom boyama yöntemi ile spor tespit edilmiştir (Carhan et al. 2015).

Özkan ve Alçığır (2018), 2012-2015 yılları arasında günlük olarak klinik muyene ile gözlemledikleri 171 adet tavşandan 5 (% 2.9) tanesinde oküler leyonlar (katarakt veya göziçi beyaz odak) tespit etmişlerdir. Hastalık teşhisini toplanan dokulardan klinikopatolojik olarak yapıp; makroskobik olarak kornea lezyonları, opasite artışı, lens yapısında bozulma, merkezi sinir sistemi (beyin) ve böbreklerde hiperemi bulgularını rapor etmişlerdir. Her üç dokudan hazırlanan preparatların, hematoksilen-eozin ve gram boyama ile histopatolojik değerlendirilmesini yapıp *E. cuniculi* ilişkili parazitoforus vakuolleri tespit etmişlerdir. Ayrıca histopatolojik incelemede cornea ve lens epitelinde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler, nonprulent interstisyel nefritis ve ensefalit bulgularını tespit etmişlerdir.

2.5.3 Dünya'daki Dağılımı

*Encephalitozoon cuniculi'*nin dünya genelinde, semptomatik (% 43-100) ve asemptomatik (% 37-68) tavşanlarda yüksek oranlarda görüldüğü bildirilmiştir (Shin et al. 2014).

Çizelge 2.1 *Encephalitozoon cuniculi'*nin prevalansına ilişkin uluslar arası veriler

Ülke	Tavşan sayısı	Teşhis yöntemi	Evcil tavşanlarda prevalans	Doğal ortamda yaşayan tavşanlarda prevalans	Kaynak
İspanya	22	IIF	9 %		Lores et al. 2002
İngiltere-İskoçya-Galler İngiltere-İskoçya İngiltere	97 pet 175 180 pet	ELISA IFAT ELISA	53,6 % 66,1 %	0%	Keeble and Shaw 2006 Cox and Ross 1980 A Harcourt-Brown 2004
İtalya	1,600 çiftlik 260 çiftlik 826 pet 125 pet	CIA, ELISA CIA CIA ELISA, CIA	31,6 % 75,4 % 59,56 % 67,2 %		Santaniello et al. 2009 Lonardi et al. 2013 Lavazza et al. 2016 Dipineto et al. 2008
İsviçre	72 pet 292 çiftlik	IFAT, ELISA	84,7% 7,5%		Latney et al. 2014 Muller 1998
Fransa	204	IFAT		3,9%	Latney et al. 2014, Chalupsky et al. 1990)
Avusturya	71	IFAT	50%–69,7%		Csokai et al. 2009
Almanya	277 pet 773	CIA IFAT CIA	41,7 % 43 %		Ewringmann and Gobel 1999, Hein et al. 2014
Slovakya	571	IFAT	41,7%		Halánová et al. 2003
Norveç	66	CIA	73%		Lyngset 1980
Japonya	23 hayvanat bahçesi 337 42 hayvanat bahçesi	Histopatoloji ELISA IgG, IgM ELISA, Western Blot Testi, Patoloji	78,3 % 63,5% IgG 28,5% IgM 76,2 %		Fukui et al. 2003 Igarashi et al. 2008 Fukui et al. 2013
Kore	186 pet	ELISA	22,6 %		Shin et al. 2014
Çin	300 çiftlik 1132 çiftlik	ELISA ELISA, MAT	18,67 % 21,9 %		Pan et al. 2015 Meng et al. 2015
Tayland	264 çiftlik	ELISA	42,4 %		Intachat et al. 2018

İran	10 laboratuvar	PCR	10%		Askari et al. 2015
Tayvan	171	CIA, ELISA	63,2% CIA 67,8% ELISA		Tee et al. 2011
Türkiye	150 laboratuvar	CIA	65,3%		Eroksuz 1999
Nijerya	237	IFAT	16,5%		Okewole 2008
Mısır	240 çiftlik	ELISA	15 %		Ashmawy et al. 2011
Avustralya	823 81 29 laboratuvar	IFAT IFAT IFAT	 75,9 %	0% 24,7 %	Cox et al 1980 B Thomas et al. 1997 Thomas et al. 1997
Amerika	203	Prospektif ELISA (protein elektroforezi ile birlkte)	62 %		Cray et al. 2009
Brezilya	186	ELISA	81,7 %		Baldotto et al. 2015
Meksika	80 çiftlik	CIA	100 %		Rodríguez-Tovar et al. 2016
Çekya	500 pet	ELISA IgG, gM	68 % IgG 32,4 % IgM		Jeklova et al. 2010

Önceleri oldukça sınırlı sayıda bildirilen Mikrosporidia olgu sayısı, günümüzde AIDS pandemisinden sonra gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler de dahil dünyada genelinde giderek artış göstermektedir. Tanımlamada kullanılan metotlar farklı olduğundan prevalans verileri de değişkenlik göstermektedir. En fazla veri Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avusturalyada bulunan HIV ile enfekte hastalara aittir. Enfekte olan hastalarda *E.bieneusi*'nin görülme oranı %5-50 arasında değişirken enfekte olmayan hastalarda da % 1.3-8 oranlarında seropozitiflik bildirilmiştir (Sancak ve Akyön 2005).

Halánová et al (2003) yaptığı çalışmada 456 insandan alınan elde edilen serum örnekleri, IFAT yöntemi kullanılarak *E. cuniculi* varlığı yönünden analiz edilmiştir; çalışmada ortaya çıkan veriler Çizelge 2.2'deki gibidir.

Çizelge 2.2 İnsanlarda *Encephalitozoon cuniculi* serolojik pozitiflik oranları (Halánová et al. 2003)

Hasta grubu	Hasta sayısı	*Encephalitozoon cuniculi* pozitif hasta sayısı	%
İmmun yetmezliği olan hastalar	24	9	37,5
Jinekolojik hastalar	57	10	17,5
HIV pozitif hastalar	4	-	-
Askerler	9	2	22,2
Köpek besleyen insanlar	22	-	-
Ormanda çalışan işçiler	92	-	-
Kesimhanede çalışan işçiler	98	5	5,1
Kan bağışı yapan kişiler	150	-	-
Toplam sayılar	**456**	**26**	**5,7**

İngiltere, Slovakya ve Norveç' te, IFA ve ELSA yöntemleri kullanılarak köpeklerde *E. cuniculi* seroprevalansı araştırılmış, % 0-37.8 oranları bildirilmiştir (Hollister et al. 1989, Akerstedt 2002, Halánová et al. 2003). Halánová et al. (2003) Slovakya'da yaptığı çalışmada, *E. cuniculi* seroprevalans oranlarını, kedilerde % 23.6, farelerde % 16, koyunlarda % 13.6 ve tavşanlarda % 41.7 olarak bildirmişlerdir.

Çekya, Slovakya ve Avusturya'da doğal ortamda yaşayan toplam 701 kır tavşanı (European hare- *Lepus europeus*)'ndan toplanan serum örnekleri, IFAT (>1:40 titre pozitif kabul edilmiş) test yöntemi ile *E. cuniculi* yönünden analiz edilmiş % 1,42 pozitiflik bildirilmiştir (Bártová et al. 2015).

Levkutová et al. (2004), atlarda *E. cuniculi* prevelansını belirlemek için yaptıkları çalışmada, 30'u fakülte hastanesine getirilen klinik bulgular gösteren; 72'si İsrail' deki 3 farklı at çiftliğindeki sağlıklı hayvanlar olmak üzere toplamda 102 adet attan alınan serum örneklerini IFA testi ile analiz etmiş; sırasıyla 25 adet (% 80), 43 adet (% 60) seropozitiflik oranı bildirmişlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri – Florida' da Cray ve Rivas (2013), 125 köpekten aldıkları serum örneklerinde *E. cuniculi* varlığını ELISA yöntemiyle test etmiş ve % 21.6 pozitiflik bildirmiştir.

Prevalansdaki bu farklılıklar, ekolojik farktörler ve yetiştirme sistemlerine göre aynı ülke içinde farklı yerlerde bile etkenin görülme oranının değişeceğini ve endemik olduğunu düşündürmektedir.

2.6 İmmunoloji

Çoğu memelide uzun süren bir konak - parazit etkileşimi sonucunda, latent ya da hafif semptomatik seyreden, düşük patojeniteli microsporodial enfeksiyon oluşmaktadır. Memelilerde gözlenen Encephalitozoon enfeksiyonlarında aktif bir immun cevap olmasına rağmen, parazitler konak hücrelerinde kalmaktadır. Parazitin çoğalması ve immun cevap arasında denge olduğu sürece enfeksiyon latent olarak kalmaktadır (Karaman 2007).

Hayvanlarda yapılan in vivo deneylerde enfeksiyona karşı serolojik cevap geliştiği, spesifik antikor yoğunluğu ile patolojik bulguların ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak her yüksek titre antikor pozitifliği gösteren hayvanda parazit bulunmadığı, antikor cevabının geçirilmiş bir enfeksiyon sonucunda da gelişebildiği bilinmektedir (Karaman 2007).

Antikor varlığının korunma için tek başına yeterli olmadığı, bununla birlikte farelerde *in vitro* şartlarda bazı antikorların, parazitin makrofajlar tarafından fagosite edilmesini kolaylaştıran opsonize edici etki gösterdiği bildirilmiştir. HIV pozitif gibi hücresel immün yetmezlik durumlarında latent Mikrosporidial enfeksiyon ortaya çıkabilir. İnsan microsporidiosisisinde humoral immun cevap iyi aydınlatılmamıştır, ancak Mikrosporidiaya özgül antikorların tek başına koruyucu olmadığı bildirilmiştir (Karaman 2007).

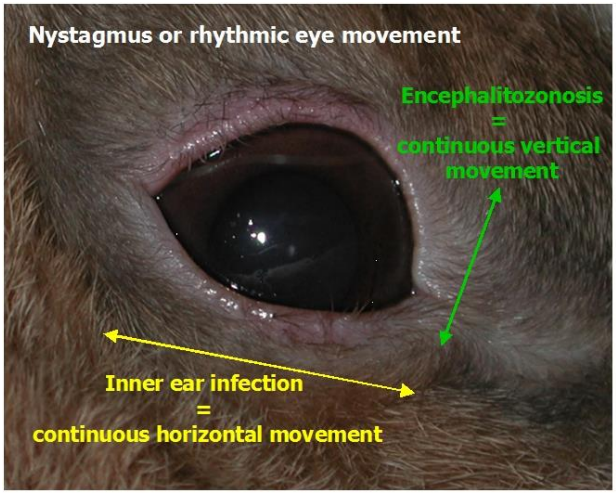
Encephalitozoon cuniculi enfeksiyonuna karşı konak direnci açısından hücresel bağışıklığın kritik olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda CD8 + T hücrelerinden yoksun *E. cuniculi* pozitif farelerin hayatta kalamadığı, bu hücrelern sitotoksik cevabının koruyucu bağışıklık için önemli olduğu bildirilmiştir (Moretto et al. 2010).

Azalan CD4 + T hücre (≤100 CD4 + hücre/mm3) seviyesi olan microsporidiosis vakası görülen AIDS hastalarında hastalığın daha şiddetli seyrettiği; bu durumun microsporidiosise karşı konak direncinin fonksiyonel T lenfositlere dayandığı hipotezini desteklediği bildirilmektedir (Didier and Weiss 2006, Moretto et al. 2012).

2.7 Klinik Bulgular

Tavşanlarda ensafalitazoonozis bulguları ani gelişebilir, şiddetli vakalar ölümle sonuçlanabilir. Vestibüler hastalık bulguları, head tilt (başın yana eğilmesi-karakteristik) ve ataksi ensefalitazoonozis erken dönem bulguları arasındadır (Jordan et al. 2006).

Yapılan çalışmalarda, *E. cuniculi* seropozitif olan tavşanlarda görülme sıklığı değişmekle birlikte vestibüler ve vestibüler olmayan nörolojik bulgular, idrar tutamama, böbrek yetmezliği, poliüri, polidipsi ve oküler lezyonlar (fakoklastik üveit, katarakt) gibi bulguların mevcut olduğu bildirilmiştir. Raporlanan nörolojik bulgular, nöbetler, parezi, başın titremesi ve aşağı bükülerek sallanması, kranial sinir defisiti, davranış bozuklukları (agresyon), ataksi, nistagmus (vertikal- şekil 2.4 de resmedilmiştir), vücudun boyuna eksen etrafında dönme hareketidir (Dipineto et al. 2008; Weese and Fulford 2011, Lavazza et al. 2016, Ozkan ve Alçiğir 2018) Nöbetler aniden meydana gelir, bazı tavşanlarda kalıcı körlük, işitme kaybı ve bilinç kaybı-koma görülürken bazı olgularda hasta tamamen eski haline dönmektedir (Jordan et al. 2006).



Şekil 2.4 *Encephalitazoon cuniculi* enfeksiyonunda gözde ritmik vertikal hareketler olur (nistagmus) (Esther 2019)

Oküler leyonlar çoğunlukla unilateraldir (Weese and Fulford 2011). Bazı araştırmacılar, oküler lezyonların meydana gelmesi hakkında, *E. cuniculi* sporlarının uterusta fetüsün lens kapsülünün henüz oluşmadığı veya ince olduğu gelişim döneminde lensi enfekte ederek doğumdan sonra lezyonların meydana geldiğini düşünmektedir. Lensin enfeksiyonu, aynı zamanda pastörellozda da görülebilen fokaklastik üveite neden olabilmektedir. Lens kapsülünün anteriorunda meydana gelen yırtılma, alanda yangılanma sonucu zonal granülamatöz lens üveitine neden olabilmektedir. Yine lens liflerinin hasarına bağlı olarak katarakt oluşabilmektedir (Jordan et al. 2006).

Mikrosporidiaların hedef hücrede yaşam döngüsünü ve apoptozisi değiştirebildiği düşünülmektedir (Aguila et al. 2006).

Encephalitozoon cuniculi ile enfekte köpeklerde körlük, büyüme geriliği ve nefritis ile karakterize, ensefalit-nefrit sendromu yaygındır. Hastalığın erken döneminde, depresyon, iştahsızlık ve kilo kaybı; ilerleyen zamanda ataksi, hipermetri, merkezi-kortikal körlük ve dönme hareketi görülebilmektedir (Weese and Fulford 2011).

Encephalitozoon cuniculi'nin, bağışıklık sistemi baskılanmış insanlarda, özellikle granülamatöz ensefalit, peritonit, hepatit, üretrit, prostatit, nefrit, sinüzit,

keratokonjunktivit, sistit, diyare ve sistemik enfeksiyon gibi bulgulara neden olabileceği bildirilimiştir (Weese and Fulford 2011).

2.8 Teşhis Yöntemleri

Ensephalitozoonosis'in klinik tanısı, veteriner hekimler için dört ana nedenden dolayı zor olabilir.

- Etkene maruziyet veya enfeksiyonu doğrulamak için serolojik yöntem kullanılabilir, ancak genelleşmiş titreler parazitizm ve klinik belirtilerin derecesi ile ilişkili değildir. Klinik bulgular, etkenin lokalizasyonu ve konağın immun yanıtına göre değişebilmektedir.
- Serokonversiyon, hastada bağışıklığa neden olmaz.

- Nörolojik semptomlu hastalarda, *E. cuniculi* enfeksiyonu ile ilişkili lezyonların histolojik şiddeti ve dağılımı, nörolojik klinik bulguların şiddeti veya nöroanatomik lokalizasyonu ile doğrudan ilişkili değildir.

- Son olarak nöral migrasyon ve spor sayılarının azaltılmasında etkinlik gösteren güncel tedavi önerilerine yönelik yapılan bazı çalışmalarda, spor sayısının azalmasına rağmen klinik belirtilerin devam edebildiği bildirilmiştir. *E. cuniculi* enfeksiyonlarında çoğunlukla hücre rupturunun neden olduğu iltihap ile ilişkilendirilen nörolojik semptomları hedef alan çalışmalar sınırlıdır (Latney et al. 2014).

Bir kişide Mikrosporidiosis tanısı koyabilmek için:
- Vücut sekresyonlarında ya da dokularda sporların gösterilmesi,
- Doku biyopsilerinde veya otopsi-nekropside gelişim safhalarının saptanması,
- Hasta serumunda antikorların saptanması,
- Hücre kültüründe gelişim dönemlerinin tespit edilebilmesi gerekmektedir (Türk 2010).

Mikrosporidiosis tanısında, dışkı, duodenum aspirasyon sıvısı, bronkoalveoler lavaj (BAL), beyin omurilik sıvısı (BOS), konjonktiva sürüntüsü, balgam ve doku biyopsi örneği kullanılabilir. İntestinal mikrosporidiosis tanısında dışkı örneği tercih edilir. Dışkı taze olmalı, kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı ve dışkı incelenmesi için aynı kişiden farklı günlerde 3 defa alınan örnekler değerlendirilmelidir (Oğuz 2013).

Encephalitozoon cuniculi enfeksiyonunun tanısı, histopatolojik doku incelemeleri sırasında karakteristik lezyonlarda ve idrarda etkenin tespiti, serolojik testler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile konabilir. *E. cuniculi* sporları gram pozitiftir, hematoksilen - eosin zayıf boyanıp, Goodpasture ve Giemsa yönteminde iyi boyanırlar. *E. cuniculi'*ye karşı serum antikorlarını tespit etmek için indirek immunofloresan testi, dot – enzyme – linked immunosorbent (dot – ELISA) testi ve aglütinasyon testleri kullanılmaktadır. PCR, doğrulayıcı testtir ve etkenin genotip ayrımı yapılırken uygulanır (Simmons ve Gibson, 2012). Mikrosporidiayı klinik örneklerden tanımlamak için pek çok yöntem mevcuttur; ışık ve floresan mikroskobu, elektron mikroskobu, PCR, histolojik incelemeler, serolojik tanı, hücre kültürü, akım sitometrisi kullanılmaktadır (Türk 2010).

Histolojik incelemede beyin dokusunda, perivasküler hücre infiltrasyonu ile meningoensefalit, lenfosit ve gliyal hücrelerin eşlik ettiği fokal granülomlar gözlemlenir. Ayrıca bazı olgularda multifokal mineralizasyon gözlemlenir. Beyin lezyonları enfeksiyonu takiben yaklaşık 3 aydan sonra veya ilk antikor tespitinden yaklaşık 8 hafta sonra görülür (Jordan et al. 2006).

Makroskobik muayenede böbreklerin, soluk, küçülmüş, fibrotik, üzerinde düzensiz grimsi lekeli yüzeyi yer yer çukurlaşmış bir yapıda olduğu görülür. Histolojik incelemede, renal tübüllerin dejenerasyonu, makrofaj infiltrasyonu ile birlikte granülamatöz interstisyel nefritis gözlemlenir. Ayrıca böbrek biyopsisinde, antikor üretiminden yaklaşık 5 hafta sonra veya enfeksiyonu takiben yaklaşık 9. haftada *E. cuniculi* sporları görülebilir (Jordan et al. 2006).

2.8.1 Işık ve Floresan Mikroskobu

Konvansiyonel bir yöntem olup, Mikrosporidia sporlarını tanımlamak için çeşitli boyama teknikleri mevcuttur. Chromotrope 2R Boyama, Quick-hot Gram's–chromotrope boyama, Calcofluor White M2R Boyama, Giemsa Boyama, Weber'in Trikrom Boyası, Warthin-Starry Boyası, % 1 Acid Fast Boyası, Acridine orange boyama gibi çok çeşitli boyalar ile sporlar gözlenebilmektedir. Işık mikroskobu ile tür ve cins ayrımı yapılamamaktadır (Jordan et al. 2006, Joseph et al. 2006, Türk 2010, Oğuz 2013).

Sitolojik preparatları ile biyopsi numunelerinin boyanmaları, dokuya bağlı nedenlerle ve zeminin de boyanmasından dolayı farklı sonuçlar verebilir. Histolojik numuneler incelenirken Mikrosporidialar gözden kaçabilir, zira doku-konak immun durumuna bağlı olarak yangısal reaksiyondan dolayı zayıf boyanabilir. Soluk boyanan veya kısmen boya almayan spor duvarları hale görünümünde olup, düzensiz yapıları mayaları andırabilir (Joseph et al. 2006).

Calcofluor white M2R (kalkoflor beyazı) boyama, idrar örneği, dışkı smearı ve solunum yolu lavaj örneklerinde Mikrosporidia sporlarını tanımlamak için yaygın kullanılan kemilüminesan bir boyadır ve 15 dakika gibi kısa sürede sonuç verir. Boya, endospor tabakasındaki kitine bağlanarak mavi–beyaz floresan verir. 395-415 nm dalga boyu uzunluğunda incelenir. Canlı sporlar oval mavimsi-turkuaz renkte görünürken, ölü sporlar beyaz sarı renkte görülmektedir. Boyamanın duyarlılığı yüksektir ancak özgül değildir. Bu yöntem ile spor morfolojisi anlaşılmasına rağmen iç yapısı görülememektedir. Bununla birlikte, sadece Mikrosporidialara özgü değildir, mayalar ve örnekteki diğer maddeler ile karışabilir; ayrıca ultraviyole ışık kaynağı olan mikroskop gerektirdiğinden sadece teşhis laboratuvarlarında uygulanmaktadır (Jordan et al. 2006, Türk 2010).

Chromotrope (asit) bazlı boyalar idrar, göz, dışkı ve solunum yolundan alınan örneklerde Mikrosporidia sporlarını tanımlamak için kullanılabilir. Weber'in Trikrom boyaması (modifiye trikrom boyama), özellikle dışkı örneklerinde kullanılan bir

yöntemdir. Preparatta yeşil ya da mavi zemin üzerinde, spor duvarı parlak pembe renge boyanırken sporun içi şeffaf ya da yatay köşegen çizgi şeklinde (kemer benzeri bant) görülmekte ve bu görünüm polar tübülü göstermektedir. Bu şekli ile bakterilerden ayırt edilebilmektedir. Işık mikroskobunda kesin tanı olarak kullanılabilen duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Quick-hot Gram's chromotrope boyası, sporu koyu mor renge boyamaktadır (Joseph et al. 2006, Jordan et al. 2006, Türk 2010).

Warthin-Starry, doku preparatlarının boyanmasında kullanılan en iyi yöntemlerden biridir. Bu yöntemde sporlar kahverengimsi siyah renkte görünür. Özellikle *E. bieneusi* ile Encephalitozoon türlerinin tanısında duyarlılığı oldukça yüksek olup boyama sonuçlarının elektron mikroskobu sonuçlarıyla %100 uyum gösterdiği tespit edilmiştir (Türk 2010).

Giemsa ve Gram boyama yöntemleri dışkı örnekleri için tercih edilmez, zira Mikrosporidia sporları ile örnekte bulunabilecek diğer bakteri ve maya gibi mikroorganizmalar ayırd edilemez. Bununla birlikte Giemsa boyama idrar ve doku örneklerinde tercih edilebilir ve sporlar açık mavi renkte gözlemlenir (Jordan et al. 2006).

Gram boyama, histolojik örneklerde tanı koymada yardımcı olabilir. Gram pozitif boyanan sporlar, tomurcuklanma göstermemesi ile mayalardan ayrılırlar. Nihai karar için % 1'lik aside dirençli boyama ya da Weber modifiye trikrom boyama ile tanının doğrulanması gerekir (Sancak ve Akyön, 2005).

%1 asit fast boyama yönteminde, sporlar parlak kırmızı renkte görünürken arka zemin mavisimsi renkte görülmektedir. Kornea biyopsilerinde Mikrosporidia tespitinde başarılı bir yöntemdir (Joseph et al. 2006).

Acridine orange boyama yönteminde, sporlar oval görünürler ve turuncu floresan verirler. Sporları arka zeminden ayırmak zordur. Mayalarla karıştırılabilmekte, ancak tomurcuklanma göstermemesi ile ayırt edilmektedir (Türk 2010).

2.8.2 Elektron Mikroskobu

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM- Transmission Electron Microscope) ile biyopsi dokuları, vücut sıvı örnekleri (idrar, sinüs aspirat, safra, BOS) ya da dışkı örnekleri Mikrosporidia tanısı için incelenebilmektedir. Biyopsi ve otopsi-nekropsi ile alınan dokular TEM ile incelendiğinde parazitin tüm evreleri görülebilirken, vücut sıvılarında ve dışkıda ise yalnızca sporlar saptanabilmektedir (Türk 2010).

Günümüzde TEM, moleküler yöntemlerin uygulanamadığı laboratuvarlarda tanımlamada kullanılmakta ve tür tayininde altın standart kabul edilmektedir. TEM ile sporların yapısal özellikleri incelenerek, Mikrosporidia'lar cins hatta tür düzeyine kadar tanımlanabilir. Encephalitazoon türleri polar tüplerine (sarmallarına) bakılarak ayırt edilebilir. Bununla birlikte, *E.cuniculi* ve *E.hellem*'in yapısı benzerlikten dolayı TEM altında bile ayırt edilememektedir, tür ayrımının yapılabilmesi için Western Blot veya PCR tekniklerinin uygulanması gerekmektedir (Sancak ve Akyön 2005, Jordan et al. 2006, Oğuz 2013).

2.8.3 Hücre Kültürü

İn vitro hücre kültürü yöntemi, konak ile mikroorganizma ilişkinin daha iyi anlaşılması, tür tayininin yapılması ve tanıda kullanılacak yeni immünolojik yöntemlerin geliştirilmesi yönünde birçok fayda sağlamaktadır (Sancak ve Akyön 2005). Mikrosporidialar, maymun (Vero) ve tavşan böbrek hücrelerinde (RK13), insan fötal akciğer fibroblast hücrelerinde (MRC-5) ve köpek böbrek hücre kültüründe (MDCK) üretilebilmektedir (Sancak ve Akyön 2005).

Encephalitozoon cuniculi, *E.hellem* ve *E.intestinalis*'in dahil olduğu birkaç Mikrosporidia türüne antimikrobiyal ajanların etkilerini değerlendirmek için hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Bununla birlikte, enfekte hücrelerde Mikrosporidiaları göstermek 3-10 hafta sürebilmektedir, çalışmayı olumsuz

etkileyebilecek mikroorganizmalarla kontaminasyon riski vardır. Yönteminin zahmetli ve zaman alıcı olmasından dolayı klinik tanıda pratik değildir (Türk 2010).

2.8.4 Seroloji

Serolojik testler *E. cuniculi* enfeksiyonu teşhisi amacıyla en çok kullanılan yöntemdir. Doğal yollarla oluşturulan enfeksiyondan sonra 4. haftada, *E. cuniculi*'ye karşı antikorların tespit edilebildiği; 9. haftada ise titresinin pik seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (Jordan et al. 2006).

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA) denir. Mikrobiyoloji tanı laboratuvarlarında oldukça önemli bir yere sahip olan bu yöntem, enzimle işaretli immuno reaktiflere dayanan bir antijen arama testidir. Radyoimmünotestler (RIA) EIA'den daha önce kullanılmaya başlanmasına rağmen, işaretleme için kısa ömürlü radyo izotopların kullanılması, toplum sağlığı ve çevreye zararlı radyoaktif madde kullanılması ve EIA'ya göre daha düşük hassasiyet potansiyeline sahip olması RIA'in endokrinoloji laboratuvarlarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur. Mikrobiyoloji alanında immünfloresan (IF) teknikleri de RIA'ya göre daha çok tercih edilmektedir. Ancak IF tekniklerinin uygulanmasında iyi eğitilmiş eleman gereksinimi ve sonuçların yorumlanmasının sübjektif olması bu yöntemin de yaygın kullanımını engellemektedir. EIA'de kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi diğer iki yönteme göre avantajlarıdır. Bununla birlikte analizlerin kısa sürede sonuçlanması ve fazla sayıda örnekle çalışma olanağı sağlaması gibi avantajları da vardır (Cirak 1999). Bununla birlikte, indirekt immunofloresan antikor testi (IFAT), mikrosporidia enfeksiyonlarının serolojik teşhisi için altın standart olarak kabul edilip; >1:20 titre pozitif olarak nitelendirilir. Bazı teşhis laboratuvarlarında IFAT ile *E. cuniculi* enfeksiyonu teşhisinde kullanılmak üzere deneysel temelli, monoklonal ve poliklonal antikorlar geliştirilmiştir (Jordan et al. 2006).

Enzim bağlı immünosorbent deneyinde (Enzyme-linked Immunosorbent Assay-ELISA) bir enzimle bağlanmış antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur. ELISA testleri antijen veya antikor (sınıfa özgül antikor da olabilir) ilişkisini araştırmak temeline dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir. (Cirak 1999). IFAT, *E. cuniculi* teşhisine yönelik ELISA ve dot-ELISA (modifiyeli) yöntemleriyle kıyaslanmış; her iki yöntemin hassasiyetiyle aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Jordan et al. 2006).

İmmün floresan, immünoperoksidaz, ELISA ve "Western blotting" gibi birçok yöntem, insan serumunda Mikrosporidia'ya karşı oluşan IgG ve IgM tipi antikorların tespitinde kullanılmaktadır. Bu testler için gereken spesifik antijenler, doku kültürlerinde üretilen Mikrosporidia türlerinden (öneğin *E.bieneusi* kültürde üretilemez) hazırlandığından, ancak bu türlere karşı antikor varlığının araştırılabilmesini mümkün kılmaktadır. HIV pozitif hastalarda immün yetmezlikten dolayı antikor oluşturulamadığından Mikrosporidia serolojik tanısında bu yöntemler kullanılamamaktadır. Bununla birlikte Mikrosporidia'ya karşı tespit edilen antikorların akut ya da latent bir enfeksiyonu mu, çapraz reaksiyonu mu, yoksa poliklonal B hücre aktivasyonunu mu gösterdiği ayırt edilememektedir (Sancak ve Akyön 2005). Spesifik IgM antikorları, akut, reaktif enfeksiyon veya reenfeksiyonu işaret ederken, IgG antikorları kronik enfeksiyon varlığını işaret etmektedir (Jeklova ve ark., 2010).

2.8.5 Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, taksonomik sınıflama, filogenetik çalışmalar, özellikle klinik örneklerden Mikrosporidia tespiti ve tür ayırımı için kullanılmaktadır (Türk 2010).

Mikrosporidia tanımlaması ve tür tayini, "intergenik spacer" bölgeleri veya Ribozomal RNA'in LSU (large subunit) ve SSU (small subunit) gen bölgelerini polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle amplifiye ederek yapılabilmektedir. Tanı ve tür tayininde PCR dışında, RFLP (Restricted fragment length polymorphism), FISH (Fluorescence in situ hybridization) yöntemi, heterodubleks analizi ve DNA dizi analizi olmak üzere

diğer moleküler yöntemlerde kullanılabilmektedir. Son yıllarda insanları enfekte eden Mikrosporidia'ların genomlarının dizi analizi yapılmaktadır. Fransa'da bir grup araştırmacı *E.cuniculi*'nin tüm genomik yapısınının dizi analizini tamamlamıştır (Sancak ve Akyön 2005).

Vücut sekretleri veya idrarda *E.cuniculi* sporlarını PCR tekniğini kullanarak tespit etmek mümkün olmasına rağmen zordur. Zira vücut sıvılarında *E. cuniculi* DNA' sının varlığı, hastalık ile direkt ilişkili değildir. Bununla birlikte negatif idrar sonuçları da kesin olarak aktif ensefalitazoonozis olmadığını göstermez, sporlar aralıklı zamanlarla idrarla saçılabilir (Weese and Fulford 2011).

2.9 Ayırıcı Tanı

Tavşanlarda ensefalitazoonozis, bazı patojenlerin (viral, bakteriyel, protozoal), toksinlerin veya travmatik etkilerin neden olduğu hastalık durumuyla kolaylıkla karışabilir. Tavşanlarda *E. cuniculi* söz konusu olduğunda, orta kulak/iç kulak enfeksiyonu, omurga travması/kırık, bakteriyel merkezi apseler veya ensefalit (Pasteurella enfeksiyonu), yayvan bacak sendromu, metabolik/toksik hastalıklar (kurşun zehirlenmesi, hepatik lipidozis), Toxoplasmosis, viral ensefalit (*Herpes simplex*), Listeriozis, merkezi sinir sistemi neoplazileri (lenfoma), vasküler bozukluklara bağlı sekonder merkezi sinir sistemi hipoksisi, dejeneratif merkezi siinir sistemi lezyonları; yakın zamanda yer değiştiren tavşanlarda Borna virüs hastalığı, kuduz ve Baylisascaris enfeksiyonları da dikkate alınmalıdır (Keeble 2016).

Nörolojik bulgular göz önünde bulundurulduğunda, *Toxoplasma gondii (ensefalit), Baylisascaris procyonis, Listeria monocytogenes* ve *Pasteurella multocida* etkenleri de tanıya giderken düşünülmelidir. *T. gondii* ve *L. monocytogenes* serolojik yöntemlerle *E. cuniculi'* den ayırt edilebilir. Yine postmortem histopatolojik incelemede, *T. gondii* ve *B. procyonis* etkenleri beyin dokusunda tespit edilebilir. *P. multocida* enfeksiyonu tavşanlarda sıkça görülür, birincil olarak üst solunum yolu enfeksiyonu ve pnömoniye neden olmakla birlikte tavşanlardaki bulguları ensefalitazoonozis ile karışabilmektedir.

Klinik olarak *E. cuniculi* merkezi vestibüler rahatsızlıklara neden olurken *P. multocida* periferal vestibüler rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bununla birlikte *P. multocida'*nın direk vestibüler sistemde yerleşerek lezyon oluşturması durumunda merkezi vestibüler rahatsızlıklara da neden olabilir. Hematolojik değerlendirmede *E. cuniculi* karakteristik bir bulgu göstermez; ancak *P. multocida* hastalarında sıklıkla nötrofili ve sola kayma görülür. Tavşanların çoğu bu etkenlere maruz kalmaktadır; seroloji direkt teşhis değil şüphenilen patojeni elemek için yararlı bir yöntemdir (Jordan et al. 2006).

2.10 Tedavi

Tedavide amaç, spor oluşumunu durdurmayı ve yangıyla birlikte semptomları azaltmaktır. İn vitro çalışmalar, benzimidazolün parazitin hücre zarının yapısını bozarak ve sproroplazmanın konak hücreye aktarımında gerekli olan tübülin proteinini inhibe ederek etkili olduğunu göstermektedir. Tavşanlarda fenbendazol ile önerilen tedavi protokolü, 20 mg/kg günde 1 kez 4 hafta süre ağız yolu ile uygulamaktır. Fenbendazolün çok ilerlememiş vakalarda klinik bulguları azalttığı ve etkene maruz kalan hayvanlarda korunmada etkili olduğu bildirilmiştir. Albendazol halihazırda AIDS hastalarında Mikrosporidian enfeksiyonların sağaltımında kullanılmaktadır. Tavşanlarda *E. cuniculi* tedavisinde deneysel olarak kullanılmıştır, ancak uzun süreli yan etkileri bilinmemektedir. Bununla birlikte albendazolün tavşanlarda teratojenik ve embriyotoksik etkisinin olduğu bilinmektedir ve kullanımına bağlı ölüm de rapor edilmiştir. Tavşanlarda albendazolün *E. cuniculi* tedavisinde, 7,5-20 mg/kg dozda günde 1 kez 3-14 gün süreye kullanılması önerilen kullanım şeklidir (Brown 2009, Keeble 2016).

Encephalitozoon cuniculi ile enfekte, fakoklastik üveitis görülen bir tavşanda önce fakoemilsüfkasyon ile lens uzaklaştırılmış; 4 ay sonra keratit ve şiddetli yangı gelişen hasta ilk dört hafta 30 mg/kg, sonraki dört hafta 15 mg/kg günde 1 kez ağız yolu ile albendazol ve %1 prednizolon (6 saatte bir) ile tedavi protokolü uygulanmış, 8 hafta sonunda yangının iyileştiği ancak korneada hasar kaldığı bildirilmiştir (Jordan et al. 2006). Yine 15-30 mg/kg günde 1 kez ağız yolu ile 30-60 gün süreyle oksibendazol kullanılabilir. Kısa etkili kortikosteroitlerin klinik semptomlara neden olan yangıyı

azalttığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışma glukokortikoidlerle tedavi edilen, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) bulguları olan grupta % 50 düzelme olduğunu göstermiştir. 0,3 mg/kg günde 1-3 kez deksametazon uygulanabilir. Prednisolonun sistemik kullanımı klinik semptomları hafifletebilir ancak immunsupresif olduğu için dikkatli kullanılması gerekir. Nöbet, konvülziyon gibi durumlarda, 0,5 mg/ kg subkutan (SC), intramuskuler (IM), intravenöz (IV) diazepam, 0,07-0,22 mg/kg IM, IV midazolam uygulanabilir. Yine karakteristik baş eğme (head tilt) durumuna karşı 0,25-0,5 mg/kg ağız yoluyla 8 satte 1 kez proklorperazine kullanılabilir. Teşhis amacıyla yapılacak analizler zaman alabileceğinden, primer ve sekonder etkenlere karşı tedbir amaçlı antibiyotiğe (15-30 mg/kg ağız yolu ile 12 saatte 1 kez 7-10 gün trimethoprim-sulfamethoxazole, 10 mg/kg ağız yolu ile 12 saatte 1 kez 7-10 gün enrofloksasin) başlanabilir. Oküler lezyonlar için (fukoklastik üveit) 8 hafta süreyle temel tedaviye ek olarak % 1 topikal prednizolon asetat (12 saatte 1 kez) göz damlası uygulanabilir. Lens kaynaklı üveit olgularında fakoemülsifikasyon ile lensin çıkarılması başarılı sonu verebilir. Tüm bunların yanında, genel destek yaklaşımı, sıvı sağaltımı, iyi diyet, bağırsak motilite düenleyiciler gibi uygulamalar da hastalığın tedavi sürecinde önemlidir (Brown 2009, Keeble 2016).

Beauvais et al. (1994), MRC5 fibroblast hücre kültüründe bazı ilaç moleküllerinin *E. cuniculi* ile etkileşimleri üzerine yaptıkları çalışmada, albendazol (0,005µg/ml), fumagillin (0,001g/ml), 5 fluorourasil (3g/ml), siprofloksasin (30g/ml)' nin *E.cuniculi'*nin gelişimini inhibe ettiği saptanmış; ayrıca klorokin, pefloksasin, azitromisin ve rifabutinin de yüksek konsantrasyonlarda kısmen etkili olduğu bildirilmiştir. Mikrosporidiyi inhibe eden konsantrasyonları fibroblastlar için de toksik olduğundan arprinocid, metronidazol, minosiklin, doksisiklin, itrakonazol ve diflorometilnitin değerlendirilememiştir. Yaplan çalışmaya göre, pirimetin, piritrexim, sülfonamidler, paromomisin, roksitromisin, atovakuon ve flusitozi ise *E. cuniculi*'ye karşı etkisiz bulunmuştur.

2.11 Korunma ve Mücadele

Bir tavşan üretim kolonisini *E. cuniculi*'den ari duruma getirmek, zaman ve maddi kaynak kaybına neden olmasına rağmen mümkündür. İki haftada bir 2 ay boyunca serum antikor seviyeleri test edilirek, düşük titreye sahip olsa bile seropozitif hayvanlar koloniden ayrılır. Test işlemi, bütün hayvanlar 1 ay sürsince seronegatif oluncaya kadar devam eder. Test süreci sonunda ayrılan sağlıklı seronegatif hayvanlar, üretim kolonisini tekrar oluşturmak için kullanılır. Bu protokolü uygulamanın pratik olmadığı durumlarda, profilaktik fenbendazol uygulamaları (yeme ilave edilmiş), seropozitif hayvanların tespit edilip ayrımı, hayvanların yaşam kalitesini artırmak, hijyen kurallarına uymak ve periyodik dezenfeksiyon işlemleri, hayvanların suluklarını kaseden suluk sistemine geçirmek kolonide hastalığı kontrol altında tutmaya yönelik fayda sağlayabilir (Keeble 2016).

Mikrosporidia sporlarının kuruluğa (dehidratasyon), distile su veya asit / alkali tamponlarla inkübasyona, dondurma ve çözülme işlemlerine dirençli olduğu bilinmektedir, su içerisinde ve diğer çevre koşullarında inaktif kalabilirler (Oğuz 2013).

Dış ortama oldukça dayanıklı olan Mikrosporidia sporu, suda da uzun süre canlı kalabilmektedirler. Ayrıca küçük ebatlarından dolayı su filtrelerinden de geçebilmektedirler (Yazar ve ark. 2013). Oda sıcaklığında kurutulmuş sporların en az 4 hafta hayatta kalabildiği bildirilmiştir (Waller 1979).

Fekal-oral yolla direkt ve indirekt bulaşma için; kişisel hijyene, özellikle el temizliğine önem verilmelidir. Çeşitli vücut sıvılarında enfektif sporlar bulunabileceğinden özellikle sağlık çalışanlarının riski göz önünde bulundurması geekmektedir. Konjüktivit ve diğer göz enfeksiyonları açısından kirli ellerle gözlere dokunulmamalıdır. Ayrıca evde hazırlanan lens solüsyonları kullanılmamalıdır (Yazar ve ark. 2013).

Kaynatılarak 5 dakikada, otoklavla sterilizasyon işleminde 120°C'de sporlar canlılığını yitirmektedir. Sporların bulunabileceği yerlerin, dezenfektanın (% 70 Etanol, % 0,3-1 Formaldehit, % 1 Hidrojen peroksit, % 1 NaOH) yapısına ve etki mekanizmasına bağlı

olarak değişmekle birlikte yeterli konsantrasyonda 30 dk dezenfeksiyon işleminin etkeni ortadan kaldırmak için etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte dondurmak dezenfeksiyonda etkili değildir (Yazar ve ark. 2013).

Tavşanlarda, *E.cuniculi* ile enfekte olmuş yavruların tespit edilip uzaklaştırılması, koloniden etkenin eradikasyonunda etkili olabilir (Jordan et al. 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan gereçler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan gereçler

MALZEME	ÖZELLİK	MODEL	MİKTARI
Sabitleme kutusu	-	-	2 adet
Etil Alkol	%70	CAS No. 64-17-5	1L
Ksilol	-	CAS No: 1330-20-7	100ml
Enjektör	21g – 5ml -Yeşil	plusmed-53256	50 adet
Pamuk	-	-	1 kavanoz
Biyokimya tüpü	Jelli – 4ml	SKY®	50 adet
Ependorf tüp	Kapaklı- 1,5ml	Lp Italiana Spa	50 adet
Cam yazar	Siyah	-	2 adet
ELISA Kiti	-	Xpressbio	1 adet
Mikropipet	100µl		1adet
Mikropipet	10µl		1 adet
Pipet ucu	100µl		100 adet
Pipet ucu	10µl		100 adet

3.2. Hayvan Tesisleri

Bu çalışmada İstanbul, Ankara ve Tekirdağ' da bulunan 3 farklı tesiste barınan tavşanlardan (Yeni Zelanda) elde edilen kan örnekleri kullanılmıştır. Hayvanlar üzerindeki tüm uygulamalar ulusal hayvan deneyleri etik ilkelerine uygun olarak klinik amaçlı veteriner hekim uygulamaları kapsamındadır (Madde-2b). Hayvan sayıları ve tesis özellikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışma kapsamında tesislerin özellikleri ve örnek sayısı

TESİS	ÖZELLİK	HİJYEN KURALI	ÖRNEK SAYISI
A	Açık	YOK	10
B	Yarı Açık	VAR/YOK	10
C	Kontrollü	VAR	10

3.3. Yöntem

3.3.1. Tavşanlar ve Klinik Değerlendirme

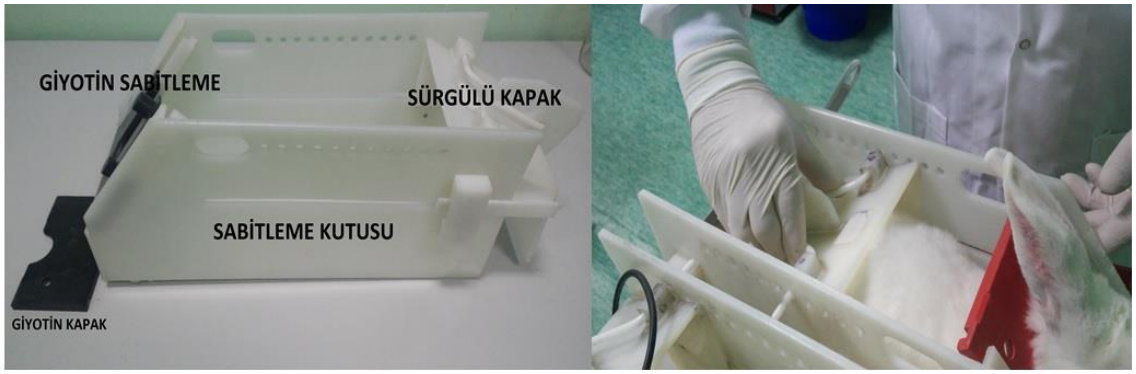
Bu çalışmada, hayvanlar üzerinde deneysel amaçlı herhangi bir işlem yürütülmemiştir. Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 2. Maddesi b bend kapsamında deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamaları kapsamında yürtülmüştür.

Çalışma kapsamındaki tavşanlar ayrıca klinik olarak değerlendirildi, tesislerdeki hiçbir hayvanda klinik bulguya rastlanmadı. Her iki cinsiyetten 2,0-3,5 kg vücut ağırlığına sahip ergin tavşanlar, günlük olarak su, yem alımı, idrar ve dışkı çıktıları da izlenerek kontrol edildi. Ensefalitozoon enfeksiyonun klinik semptomları bakımından hayvanlar muayene edildi. Hayvanlar klinik olarak hastalığın semptomları içerisinde tortikollis, nöbet, arka ve ön bacaklarda paraliz, çırpınma gibi nörolojik bulgular, gözde katarak benzeri oluşumlar, şaşılık, düzensiz vertikal göz hareketleri ve polidipsi, poliüri gibi semptomlarla böbrek yetmezliği bakımından değerlendirildi.

3.3.2. Kan Alma ve Serum Eldesi

Serolojik analiz için bir zaptırap kutusunda sabitlenen her bir hayvanın aseptik koşullar için kan alma işlemi uygulanacak kulak tamamen dezenfekte edildi (Şekil 3.1). Kulak

ksilollü pamukla silinerek damarın genişlemesi sağlandı. Şekil 3.2'deki gibi damara (marginal kulan veni) tekniğine uygun olarak 21 G iğneli 5 ml hacimli enjektör kullanılarak girildi ve 4 ml jelli biyokimya tüpüne kan örneği alındı. Kan alımından hemen sonra tüp, 10 saniye boyunca 180 açıyla yavaşça ters düz yapıldı. Sahaya olası kanamayı önlemek için 30-60 sn basınç uygulandı. Hayvanlar tekrar kafeslerine alındı. Aralıklarla kulak veni kanamaya karşı gözlemlendi. Alınan örnekler oda sıcaklığında bir saat bekletildi. Kan örnekleri, santrifüj cihazına dengeli yerleştirilerek 2000rpm de 10dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda her bir örnekten ependorf tüpüne 1ml serum alındı. Serum örnekleri, hayvanların bulunduğu tesis ve hayvan numaralarına yazılarak serolojik analiz yapılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 3.1 Tavşanların zapturapt altına alınma işlemi (Orijinal).



Şekil 3.2 Tavşan kulağından kan alma işlemi

3.3.3. Serolojik Analiz

Tavşanlarda *E. cuniculi*'ye özgü antikor (Ig G) yanıtlarını belirlemek için, pozitif ve negatif kontroller (tavşan serumu) içeren bir ELISA kiti (Rabbit Biotech International-USA) kullanıldı (Şekil 3.3). Üreticinin talimatlarına göre analiz adım adım yürütüldü. Serum örnekleri, kit ile sağlanan örnek seyrelticisi ile 1:50 oranında seyreltildi. Daha sonra, seyreltilmiş numunenin 100 µl'si *E.cuniculi* antijenleri ile önceden kaplanmış 96-kuyucuklu bir mikrotitre plakaya eklendi. Numune ilavesinde sonra 37° C'e ayarlı etüv içerisinde 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, her kuyucuk kitin yıkama çözeltisi ile beş kez yıkandı. Kullanıma hazır Peroksidaz Konjugattan her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi. Reaktif ilavesinden sonra kuyucukların üstü kapatılarak 37° C'e ayarlı etüv içerisinde 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, her kuyucuk kitin yıkama çözeltisi ile beş kez yıkandı. Daha sonra, kullanıma hazır ABTS (2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit] -diamonyum tuzu) Peroksidaz Substrattan her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi. Plak oda sıcaklığında 30 dk tutuldu. Renk gelişimi, durdurma çözeltisinden her bir kuyucuğa 25 µl ilave eklenerek durduruldu. Plak, 15 dk içinde bir ELISA mikrotitre okuyucusunda 405 nm'de okundu. Örnek optik yoğunluk (OD) ve negatif kontrol OD (Δ) arasındaki farkın 0.300'den büyük veya eşit olması halinde, örnek pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan ELISA kiti.

4. BULGULAR

4.1. Tesisler ve Seroloji

4.1.1 Tesis A

Bu alanda bulunan hayvanlar bir araştırmacı tarafından oluşturulan çevresel koşullar sınırlı düzeyde olan açık alanda barındırılarak bakımı yapılan bir tesistir. Burada hiçbir hijyen uygulaması olmayıp hayvanlar tamamen toprak zeminde ve grup halinde bulundurulmaktadır. Hayvanlar çevreye tamamen açık ve toprak zeminde geleneksel kaplarla yem ve yeşilliklerle beslenmektedir. Doğal aydınlanma kullanılmakta ve herhangi bir iklimlendirme yapılmamaktadır. Bu tesis tamamen geleneksel kümes yapısında olup, burada bulunan tüm hayvanlardan (n=10) kan öreği alınmıştır.

Yapılan ELISA sonucuna göre elde edilen analiz bulguları ve seropozitiflik durumları Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. A tesisinde alınan örneklerin hastalık yönünden %70 seropozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Çalışmaya alınan A tesisi seroloji test sonuçları

KOD	POZİTİF O.D	NEGATİF O.D	SONUÇ (Δ)	POZİTİF/NEGATİF
1A	2,087	0,127	1,96	+
2A	2,153	0,182	1,971	+
3A	1,831	0,103	1,728	+
4A	0,64	0,131	0,509	+
5A	1,919	0,167	1,752	+
6A	0,284	0,256	0,028	-
7A	0,154	0,131	0,023	-
8A	2,306	0,162	2,144	+
9A	0,209	0,18	0,029	-
10A	1,684	0,125	1,559	+

4.1.2 Tesis B

Bu alanda çevresel kontrol sistemi olmayan yarı açık, havalandırmanın pencerelerle yapıldığı geleneksel bir aile tesisinde hayvanlar (n=46) çalışmaya alınmıştır. Tavşanlar tel kafeslerde tek veya ikili olarak tutulmaktadır. İklimlendirme ve aydınlatmanın kontrolsüz olduğu bu tesiste hayvanlara ticari pelet yem su verilmektedir. Tesis içerisinden rastgele örneklem ile 10 adet tavşandan kan örneği alınmıştır.

Yapılan ELISA sonucuna göre elde edilen analiz bulguları ve seropozitiflik durumları Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. B tesisinde alınan örenklerin hastalık yönünden % 40 seropozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.2 Çalışmaya alınan B tesisi seroloji test sonuçları

KOD	POZİTİF O.D	NEGATİF O.D	SONUÇ (Δ)	POZİTİF / NEGATİF
1B	0,189	0,122	0,067	-
2B	0,207	0,188	0,019	-
3B	0,199	0,162	0,037	-
4B	0,133	0,132	0,001	-
5B	0,122	0,143	0,021	-
6B	0,181	0,156	0,025	-
7B	2,324	0,179	2,145	+
8B	1,908	0,152	1,756	+
9B	2,347	0,153	2,194	+
10B	2,016	0,136	1,88	+

4.1.3. Tesis C

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından deneysel ve diğer bilimsel amaçlara yönelik deney hayvanı üretim, kullanım, tedarik ve araştırma için çalışma izni; ayrıca uluslar arası akreditasyonu olan tesiste in vivo test materyali olarak kullanılan tavşanlar çalışmaya alınmıştır. Bu tesiste bulunan hayvanlar, 18 ila 21°C'lik bir sıcaklıkta,% 50 ± 5'lik nispi nemlilikte ve 12:12'lık bir ışık / karanlık döngüsünde kontrollü bir odada;

1.12.2011 tarih – 28141 sayılı Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik ve ilgili Avrupa Birliği yönergesine (2010/63/AB yönergesi ek 3) uygun kafeslerde, kontrollü ve ayrı ayrı barındırılmaktadır. Tavşanlar standart bir ticari pelet yem ile beslenmekte ve su *ad libitum* sağlanmaktadır.

Yapılan ELISA sonucuna göre elde edilen analiz bulguları ve seropozitiflik durumları Çizelge 4.3'de özetlenmiştir. C tesisinde alınan örenklerin hastalık yönünden %80 seropozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Çalışmaya alınan C tesisi seroloji test sonuçları

KOD	POZİTİF DEĞER	NEGATİF DEĞER	SONUÇ(Δ)	POZİTİF / NEGATİF
1C	1,596	0,215	1,381	+
2C	1,859	0,234	1,625	+
3C	1,863	0,213	1,65	+
4C	2,098	0,224	1,874	+
5C	1,902	0,030	1,602	+
6C	0,415	0,228	0,187	-
7C	1,542	0,159	1,383	+
8C	0,385	0,164	0,221	-
9C	1,87	0,176	1,694	+
10C	1,812	0,18	1,632	+

Çalışma içerisinde hastalığın seroprevalansı bakımından elde edilen serolojik bulgulara göre tesis ya da hijyen özelliklerinden bağımsız olarak değerlendirildiğinde hastalığın tavşanlarda % 63.3 (19/30) oranında seropozitif olduğu belirlenmiştir. Tüm tesislerdeki seropozitiflik durumu Çizelge 4.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4 Çalışmaya alınan tesislerde *Encephalitazoon cuniculi* seroprevalansı

TESİS	POZİTİF	%	NEGATİF	%
A	7	70	3	30
B	4	40	6	60
C	8	80	2	20
TOPLAM	**19**	**63.3**	**11**	**36.6**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Elazığ'da 15 farklı tavşan kolonisinden toplamda 150 tavşan, CIA testi ile *E. cuniculi* varlığı açısından taranmış, % 65.33 seropozitiflik bildirilmiştir (Eroksuz et al. 1999).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, 2007-2010 yılları arasında, pet hayvanı olarak beslenen 310'u çeşitli hastalık bulgusu gösteren ve 516'sı klinik olarak sağlıklı toplamda 826 tavşandan elde serumlar ile yapılan çalışmada, hastalıklı tavşanlarda % 70.65 klinik olarak sağlıklı tavşanlarda % 52.91 *E. cuniculi* seropozitiflik oranı bildirilmiştir. Ayrıca, 492 pozitif tavşanda hastalık belirtisi gösteren tavşan oranı 219 (% 44.5) olarak bildirilmiştir (Lavazza et al. 2016).

Tayland'da iki farklı ildeki, gıda amaçlı tavşan yetiştirme çiftliğinden elde edilen 264 numune ELISA testi ile analiz edilmiş % 42.4 *E. cuniculi* pozitiflik tespit edilmiştir. Prevalans çiftliklerden birinde % 20, diğerinde % 71.9 olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmada, iki çiftlik arasında aynı kesimhaneyi kullanmak dışında herhangi bağ veya hayvan transportu olmadığı; çiftliklerin farklı yönetim ve beslenme programı kullandığı, havalandırma sistemleri ve kesime giden tavşanların yaşlarında farklılık olduğu bildirilmiştir (Intachat et al. 2018).

Yine İtalya'da 40 ve 13 farklı ticari çiftlikten toplanan tavşan serumlarıyla yapılan iki çalışmada çiftliklerin hepsinde etken tespit edildiği bildirilmiştir (Santaniello et al. 2009, Lonardi et al. 2013).

Çin' de, birbirinden farklı iklim ve çevre koşullarına sahip, özellikle belirtilen ırkların yetiştiriciliği yapılan (Japanese White, New Zealand, Rex) üç farklı bölgeden klinik olarak sağlıklı 300 adet tavşan ve 300 adet insan *E. cuniculi* seropozitifliği yönünden araştırılmıştır. Çalışma sonucunda tavşanlarda, her bölgede (ırkta) farklı olmak üzere (% 9, 6, 41) toplamda % 18.67 (56/300); insanlarda, aynı sıralamayla her bölgede farklı olmak üzere (% 6, 5, 18) toplamda % 9.67 (29/300) pozitiflik saptanmıştır (Pan et al. 2015).

Japonya'da yapılan bir araştırmada, 20 farklı ilden, klinik bulgu gösteren/göstermeyen toplamda 337 tavşandan toplanan serum örnekleri, ELISA test yöntemi kullanılarak anti *E. cuniculi* IgG ve IgM antikorları yönünden taranmıştır. Çalışma sonucunda, % 63.5 (214/337) IgG- ELISA pozitif; % 28.5 (96/337) IgM- ELISA pozitif olduğu bildirilmiştir (Igarashi et al. 2008).

İngiltere, İskoçya ve Galler'de, rutin sağlık kontrolleri ve anestezi öncesi kontrollerde klinik belirti göstermeyen 97 tavşandan elde edilen serumlar indirekt ELISA yöntemiyle analiz edilmiş; 52 (% 53.6) örnek *E. cuniculi* seropozitif olarak değerlendirilmiştir (Keeble and Shaw 2006).

Brezilya' da, 3 farklı ilden, 160 tanesi klinik semptom göstermeyen ve 26 tanesinde çeşitli hastalık bulguları olan (oftalmik, nörolojik) toplamda 186 tavşandan toplanan serumlar ELISA yöntemiyle test edilmiş, örneklerden % 81.7 (152)'sinin *E. cuniculi* seropozitif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada Baldotto et al. (2015), *E. cuniculi* pozitiflik oranını asemptomatik hayvanlarda % 85.0 (136/160), hastalıklı hayvanlarda % 61.5 (16/26) olarak tespit etmişlerdir.

Ozkan et al (2011), 50'si klinik olarak sağlıklı, 2 sinde eğri boyun sendromu (tortikollis-head tilt) ve ekstremitelerde güçsüzlük bulguları olmak üzere aynı kolonide toplamda 52 tavşanı CIA yöntemiyle *E. cuniculi* varlığı yönünden test etmiş; 4 (% 7.7) tavşanı seropozitif olarak değerlendirmişlerdir.

Bu çalışmada herhangi klinik semptom bulgusu olmayan tavşanlardan alınan örneklerin değerlendirilmesi sonucunda, farklı lokasyonlardaki tüm tesislerde etkene rastlanmış ve % 63.3 oranında seropozitiflik belirlenmiştir. Bu verilerle tavşanlarla yapılan önceki çalışmalarla benzer bulgular elde edilmiştir. Bununla birlikte çalışmada araştırma alanı olarak kullanılan tesislerin hijyen ve yetiştirme sistemlerine yönelik yapılan değerlendirmede ilginç bulgular elde edilmiştir. Şöyle ki; hiçbir hijyen kuralı olmayan geleneksel kümes tipi yetiştirme yapılan hayvanlar ile tamamen kontrollü bir sistemde yetiştirlen hayvanların serolojik sonuçları birbirine yakın bulunmuştur. Diğer taraftan geriye kalan tesisteki seropozitiflik daha düşük bulunmuştur.

Elde edilen bulgular ışığında sonuç olarak; (a) Etkene, hayvan sirkülasyonunun fazla olmadığı, kontrol progamları uygulanan akredite bir tesisde de rastlanmasından dolayı alınan hayvanların orjin olarak enfekte olabileceği (b) Sürüye entegre edilecek hayvanların serolojik taramaların yapılmasının ve karantina süresi sonunda uygun olan hayvanların koloniye dahil edilmesinin sürü sağlığı için oldukça önemli olduğu (c) Etkenin bulaş yolları göz önünde bulundurulduğunda tesiste enfekte bir hayvanın sürü için enfeksiyon kaynağı olabileceği, rutin sağlık taramalarında seropozitif tespit edilen hayvanların ivedilikle sürüden ayrılmasının doğru olacağı (d) Yine standart protokollerin uygulandığı tesiste insidansın yüksek bulunmasından dolayı, çevresel bir çok faktöre dirençli spor formu olduğu bilinen etkenle mücadele için tesislerde olası yürütülen septik/aseptik protokollerin yeterli olmadığı (e) Zoonoz karakterdeki enfeksiyonun hayvan bakıcısı, araştırmacılar için de potansiyel risk taşıyabileceği, toplum sağlığı açısından bu durumun göz önünde bulundurulması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

Aguila, C. Del., Izquierdo, F., Granja, A.G., Hurtado, C., Fenoya, S., Fresno, M., Revilla, Y. 2006. Encephalitozoon microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. International Journal for Parasitology. 36(8):869-876.

Akerstedt, J. 2002. Serological investigation of canine encephalitozoonosis in Norway . *Parasitol Res* 89(1): 49 - 52. https://doi.org/10.1007/s00436-002-0724-2.

Anane, S., Attouchi, H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. Gastroenterol Clin Biol, 34(8-9):450-64. doi: 10.1016/j.gcb.2010.07.003

Ashmawy, K.I., Abuakkada, S.S., Awad, A.M. 2011. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in farmed domestic rabbits in Egypt. Zoonoses Public Health. 58(5):357-364.

Askari, Z., Mirjalali, H., Mohebali, M., Zarei, Z., Shojaei, S., Rezaeian, T., Rezaeian, M. 2015. Molecular detection and identification of zoonotic microsporidia spore in fecal samples of some animals with close-contact to human. Iran J Parasitol. 10(3):381-388.

Baldotto, S.B., Cray, C., Giannico, A.T., Reifur, L., Montiani-Ferreira, F. 2015. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in pet rabbits in Brazil. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24:435-440.

Bártová, E., Marková, J., Sedlák, K. 2015. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in European hares (*Lepus europaeus*). Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 22(4):674-6.

Beauvais, B., Sarfati, C., Challier, S., Derouin, F. 1994. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 38(10):2440-48

Berkin, Ş., Kahraman, M.M. 1983. Türkiye' de tavşanlarda *Encephalitozoon* (Nosema) *cuniculi* enfeksiyonu. Ankara Üıniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 30(2):397-406.

Bohne, W., Böttcher, K., Groß, U. 2011. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell–pathogen interface. International Journal of Medical Microbiology. 301(5):395-399. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.006

Brown, V. 2009. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits – aetiology, treatment and infection control. https://www.vettimes.co.uk (Erişim tarihi: 3.11.2018).

Carhan, A., Ozkan, O., Ozkaya, E. 2015. The First identification of *Encephalitozoon cuniculi* infection in an animal care worker in Turkey. Iran J Parasitol. 10(2):280-285.

Carly, N.J, Anne M.Z, David S.L. 2006. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. COMPENDIUM, 108-116.

Cirak, M.Y. 1999. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) systems. Turkiye Klinikleri J Med Sci. 19:242-248.

Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., Zimmerli, S. 2000. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. Infection and Immunity. 68(12):6939-6945.

Cox, J.C., Ross, J. 1980. A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. *Res Vet Sci.* 28(3);396.

Cox, J.C., Pye, D., Edmonds, J.W., Shepherd, R. 1980. An investigation of *Encephalitozoon cuniculi* in the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia. *J Hyg (Lond).* 84(2):295–300.

Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S.A., Arheart, K.L. 2009. Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. American Journal of Veterinary Research. 70(4):478-482

Cray, C., Rivas, Y. 2013. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in dogs in the United States. Journal of Parasitology. 99 (1):153-4. https://doi.org/10.1645/GE-3152.1

Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., Künzel, F. 2009. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. Veterinary Parasitology. 163(1-2):18-26.

Çetinkaya, Ü. 2014. Farklı hasta gruplarında *Encephalitozoon intestinalis*'in araştırılması. Doktora tezi (basılmamış). Erciyes Üniversitesi, 92 s., Kayseri.

Desoubeaux, G., Piqueras, M.d.C., Pantin, A., Bhattacharya, S.K., Peschke, R., Joachim, A., Cray, C. 2017. Application of mass spectrometry to elucidate the pathophysiology of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. PLoS ONE 12(7): e0177961. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177961

Didier, E., Vossbrinck, C., Baker, M., Rogers, L., Bertucci, D., & Shadduck, J. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology, 111(4): 411-421. doi:10.1017/S0031182000065914

Didier, E.S., Weiss, L.M. 2006. Microsporidiosis: current status. Curr Opin Infect Dis. 19(5):485–492.

Didier, P.J., Snowden, K.F., Alvarez, X., Didier, E.S. 2016. Microsporidiosis. Chapter 69. https://veteriankey.com/microsporidiosis/

Dipineto, L., Rinaldi, L., Santaniello, A., Sensale, M., Cuomo, A., Calabria, M., Menna, L.F., Fioretti, A. 2008. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses and Public Health.* 55(3):173–175.

Edlind, T.D., Li, J., Visvesvara, G.S., Vodkin, M.H., Mc Laughlin, G.L., Katiyar, S.K. 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol.* 96:359-67

Eroksuz, Y., Eroksuz, H., Ozer, H., Cevik, A., Unver, O. 1999. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazig, Turkey: Pathomorphologic and serologic (Carbonimmunoassay Test) studies. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* 54(3):73–77.

Esther, van P. 2019. Middle and inner ear (otitis media and interna). http://www.medirabbit.com/EN/Neurology/Otit/otitis.htm

Ewringmann, A., Göbel, T. 1999. Examinations on clinics and therapy of encephalitozoonosis in pet rabbits. Kleintierpraxis 44(5):357-372.

Franzen, C., Muller, A., Hartmann, P., Salzberger, B. 2005. Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Mikrosporidia). *Parasitology, 130*(3), 285-292. doi:10.1017/S003118200400633X

Franzen, C. 2005. How do Mikrosporidia invade cells? Folia Parasitologica. 52:1–13

Fukui, D., Bando, G., Kosuge, M., Yamaguchi, M., Nakaoka, Y., Furuya, K., Murata, K. 2003. Clinical and pathological study of encephalitozoonosis in a zoo rabbit colony. Journal of the Japan Veterinary Medical Association. 56. 464-469.

Fukui, D., Bando,G., Furuya, K., Yamaguchi, M., Nakaoka, Y., Kosuge, M., Murata, K. 2013. Surveillance for an outbreak of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits housed at a zoo and biosecurity countermeasures. Journal of Veterinary Medical Science. 75(1):55-61

Ghosh, K., Nieves, E., Keeling, P., Pombert, J.F., Henrich, P.P., Cali, A., Weiss, L.M. 2011. Branching network of proteinaceous filaments within the parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem.* Infection and Immunity. 79(3);1374–1385. doi:10.1128/IAI.01152-10

Halánová, M., Cisláková, L., Valencákova, A., Bálent, P., Adam, J., Trávnicek, M. 2003. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia . *Ann Agric Environ Med.* 10: 117 – 120 .

Han, B., Weiss, L.M. 2017. Mikrosporidia: Obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*. *5*(2), 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.

Harcourt-Brown, F.M. 2004. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 13(2); 86-93.

Hein, J., Flock, U., Sauter-Louis, C., Hartmann, K. 2014. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Germany: Prevalence and sensitivity of antibody testing. Veterinary Record 174(14):350.

Hirt, R.P., Logsdon, J.M., Healy, B., Dorey, M.W., Doolittle, W.F., Embley, T.M. 1999. Mikrosporidia are related to fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(2):580-585.

Hinney, B., Sak, B., Joachim, A., Kváč, M. 2016. More than a rabbit's tale - Encephalitozoon spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 76-87.

Hofmannová, L., Sak, B., Jekl, V., Mináriková, A., Škorič, M., Kváč , M. 2014. Lethal *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection in Steppe lemmings (Lagurus lagurus). *Veterinary parasitology*, *205 1-2*, 357-60.

Hollister, W., Canning, E., Viney, M. 1989. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. Veterinary Record 124, 332-336.

Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno, A., Kariya, T. and Furuya, K. 2008. High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. J. Vet. Med. Sci. 70: 1301–1304.

Intachat, C., Jiwaganont, P., Wannasilp, S., Udompattanakorn, O., Kovitvadhi, A., Jala, S., Kawvongvan, D., Chandang, P., Lertwatcharasarakul, P., Sanyathitiseree, P. 2018. Slaughterhouse Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Meat Rabbits at Central Part of Thailand. Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine. 2560. 12(2): 35-45.

Jedrzejewski, S., Graczyk, T.K., Slodkowicz-Kowalska, A., Tamang, L., Majewska, A.C. 2007. Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. Applied and Environmental Microbiology. 73(12): 4071–4073.

Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H., Knotek, Z., Faldyna, M. 2010. Usefulness of detection of specific IgM and IgG

antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. Vet Parasitol. 170(1-2): 143–148

Jordan, C.N., Zajac, A.M., Lindsay, D.S. 2006. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. Parasitology Compendium. 28(2):108-116.

Joseph, J., Vemuganti, G.K., Sharma, S. 2005. Mikrosporidia: Emerging ocular pathogens. Indian J Med Microbiol. 23(2):80-91

Joseph, J., Vemuganti, G.K., Garg, P., Sharma, S. 2006. Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by different stains. BMC Clinical Pathology. 6:6. doi:10.1186/1472-6890-6-6

Karaman, Ü. 2007. İnsanlarda Mikrosporidia'ların epidemiyolojisi (Malatya ili örneği). Doktora tezi (basılmamış). İnönü Üniversitesi, 120 s, Malatya.

Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretaillade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivares, C. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature. 414: 450-3. Doi: 10.1038/35106579

Keeble, E.J., Shaw, D.J. 2006. Seroprevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in domestic rabbits in the United Kingdom. Vet Rec. 158(16):539-44.

Keeble, E. 2016. Nervous system and musculoskeletal disorders. In: BSAVA Manual of Rabbit Medicine. Meredith, A and Lord, B (eds), British Small Animal Veterinary Association, p: 214-32, England.

Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann Rev Microbiol. 2002;56: 93–116.

Lange, C., Johny, S., Baker, M., Whitman, D., Solter, L. 2009. A new encephalitozoon species (Microsporidia) isolated from the Lubber Grasshopper, Romalea microptera (Beauvois) (Orthoptera: Romaleidae). The Journal of Parasitology, 95(4), 976-986. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/27735687

Latney, L.T.V., Bradley, C.W., Wyre, N.R. 2014. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. Veterinary Medicine: Research and Reports. 5:169-.180.

Lavazza, A., Chiari, M., Nassuato, C., Giardiello, D., Tittarelli, C., Grilli, G. 2016. Serological Investigation on *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in north-central Italy. Journal of Exotic Pet Medicine. 25(1):52–59

Levkutová, M., Hipíková, V., Faitelzon, S., Benath, G., Paulík, Š., Levkut, M. 2004. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in horses in the Israel. Ann Agric Environ Med. 11: 265–267.

Lores, B., Aguila, C. Del., Arias, C. 2002. *Enterocytozoon bieneusi* (Mikrosporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97 (7):941-945

(PDF) Nature of rabbit encephalitozoonosis and the practical aspects of therapy. Available from: https://www.researchgate.net/publication/287938623_Nature_of_rabbit_encephalitozoonosis_and_the_practical_aspects_of_therapy [accessed Oct 18 2018].

Lobo, M.L., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. 2012. Mikrosporidia as emerging pathogens and the implication for public health: A 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *International journal for parasitology*, 42(2), 197-205. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751912000021

Lonardi, C., Grilli, G., Ferrazzi, V., Dal Cin, M., Rigolin, D., Piccirillo, A. 2013. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. Res Vet Sci. 94:295-298.

Lyngset, A. 1980. A survey of serum antibodies to Encephalitozoon cuniculi in breeding rabbits and their young. Lab Anim Sci. 30(3):558–561.

Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the Microsporidia. Clinical Microbiology Reviews. 18(3):423–445

Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S. 1959. A case of Encephalitozoon-like body infection in man. AMA Arch. Pathol. 67(2):181-187.

Meng, Q.F., Wang, W.L., Ni, X.T., Li, H.B., Yao, G.Z., Sun, X.L., Wang, W.L., Cong, W. 2015. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in China. *The Korean journal of parasitology*, *53*(6), 759-63.

Meissner, E.G., Bennett, J.E., Qvarnstrom, Y., da Silva, A., Chu, E.Y., Tsokos, M., Gea-Banacloche, J. 2012. Disseminated microsporidiosis in an immunosuppressed patient. Emerging infectious diseases, 18(7), 1155-8.

Moretto, M.M., Lawlor, E.M., Khan, I.A. 2010. Lack of Interleukin-12 in p40-deficient mice leads to poor CD8+ T-Cell immunity against Encephalitozoon cuniculi infection. Infection and Immunity. 78(6): 2505–2511

Moretto, M.M., Khan, I.A., Weiss, L.M. 2012. Gastrointestinal cell mediated immunity and the microsporidia. PLoS Pathog 8(7): e1002775. doi:10.1371/ journal.ppat.1002775

Mumcuoglu, I., Cetin, F., Dogruman Al, F., Oguz, I., Aksu, N. 2016. Prevalence of Microsporidia in healthy individuals and immunocompetent patients with acute and chronic diarrhea. Infectious Diseases. 48:2:133-137. DOI: 10.3109/23744235.2015.1094572

Oğuz, İ. 2013. İshalli olgularda Mikrosporidia sıklığının calcafluor beyazı ve uvitex 2b kemilüminesans boyama yöntemleriyle araştırılması ve moleküler tiplendirilmesi. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Gazi Üniversitesi, 122 s, Ankara.

Okewole, E.A. 2008. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 75:33–38

Otto, G.M., Franklin, C.L., Clifford, C.B. 2015. Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats. In: Laboratory Animal Medicine. Elsevier BV. Page: 151-207. http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409527-4.00004-3

Ozkan, O., Ozkan, A.T., Zafer, K. 2011. Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. Veterinary Parasitology. 179(1–3):234-237. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.007

Özkan, Ö., Alçığır, M.E. 2018. Subacute Stage of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Eye Lesions of Rabbit in Turkey. Iran J Parasitol. 13(2):301-309.

Pakes, S.P., Shadduck, J.A., Cali, A. 1975. Fine Structure of E*ncephalitozoon cuniculi* from rabbits, mice and hamsters. The Journal of Protozoology, 22: 481-488. doi:10.1111/j.1550-7408.1975.tb05213.x

Pan, Y., Wang, S., Liu, X., Li, R., Sun, Y., Gadahi, J.A. 2015. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in humans and rabbits in China. *Iranian Journal of Parasitology*. *10*(2):290–295.

PDSA 2018. PDSA Animal Wellbeing Report. https://www.pdsa.org.uk/media/4371/paw-2018-full-web-ready.pdf Erişim tarihi: 3.11.2018

Ramanan, P., Pritt, B.S. 2014. Extraintestinal Microsporidiosis. Journal of Clinical Microbiology. 52(11):3839-3844.

Rodríguez-Tovar, L.E., Nevárez-Garza, A.M., Trejo-Chávez, A., Hernández-Martínez, C.A., Hernández-Vidal, G., Zarate-Ramos, J.J., Castillo-Velázquez, U. 2016. *Encephalitozoon cuniculi*: Grading the Histological Lesions in Brain, Kidney, and Liver during Primoinfection Outbreak in Rabbits. Journal of Pathogens. Article ID 5768428, 9 pages. https://doi.org/10.1155/2016/5768428

Rodríguez-Tovar, L.E., Villarreal-Marroquín, A., Nevárez-Garza, A.M., Castillo-Velázquez, U., Rodríguez-Ramírez, H.G., Navarro-Soto, M.C., Trejo-Chávez, A. 2017. Histochemical study of *Encephalitozoon cuniculi* spores in the kidneys of naturally infected New Zealand rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *29*(3):269-77. https://doi.org/10.1177/1040638716668559

Sancak, B., Akyön, Y. 2005. Microsporidia: Genel özellikleri, enfeksiyonları ve laboratuvar tanısı. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 39(4), 513-22.

Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L.F., Cringoli, G., Fioretti, A. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. Res Vet Sci. 2009; 87:67-69.

Shin, J.-C., Kim, D.-G., Kim, S.-H., Kim, S., Song, K.-H. 2014. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, *52*(3), 321–323. http://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.321

Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troemel, E.R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F., Solter, L. 2016. Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain. Trends in Parasitology. 32(4):336-348.

The Taxonomy Database of the National Center for Biotechnology Information. 2019. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6035, Erişim tarihi: 11.06.2019.

Tee, K.Y., Kao, J.P., Chiu, H.Y., Chang, M.H., Wang, J.H., Tung, K.C., Cheng, F.P., Wu, J.T. 2011. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Vet Parasitol.* 183(1):68–71.

Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti J. 2010. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. Journal of Clinical Microbiology. 48(7):2651-2653

Thomas, C., Finn, M., Twigg, L., Deplazes, P., Thompson, R. 1997. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. Australian Veterinary Journal, 75: 808-810. doi:10.1111/j.1751-0813.1997.tb15658.x

Türk, S. 2010. İshalli olgularda Mikrosporidia sıklığının farklı boyama yöntemleriyle araştırılması. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Gazi Üniversitesi, 92 s., Ankara.

Waller, T. 1979. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. Laboratory Animals. 13:227-230.

Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H., Lüthy, R. 1997. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virüs infection. The New England Journal of Medicine. 336(7):474-478.

Weese, J.S., Fulford, M.B. 2011. Fungal Disease. Companion Animal Zoonoses. p: 275-99 Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-0-813-81964-8

Wilson, J.M. 1979. The biology of *Encephalitozoon cuniculi*. Medical Biology. 57:84-101.

Wright, J.H., Craighead, E.M. 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. http://doi.org/10.1084/jem.36.1.135

Xu, Y., Weiss, L.M. 2005. The Mikrosporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. Int J Parasitol. 35(9):941-953.

Yaman, M., Algı, G., Güner, B.G. 2015. Mikrosporidia Karakterizasyonunda Morfolojik ve Ultrastrüktürel Özellikler. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 39:52-59.

Yazar, S., Koru, Ö., Hamamcı, B., Çetinkaya, Ü., Karaman, Ü., Kuk, S. 2013. Mikrosporidialar ve Mikrosporidiyozis. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 37:123-134

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hakan TÜFEK

Doğum Yeri : KKTC / Lefkoşa

Doğum Tarihi : 02.06.1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Gülseren sk. 20/10 Anıttepe mh. Çankaya/ANKARA

Tel : 5422080842

E-posta : hakan.veterinary@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Emlak Bank Süleyman Demirel Lisesi 2001 - 2005

Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2005 - 2011

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Tezli Yüksek Lisans) 2017 -

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Turk İlaç ve Serum Sanayi A.Ş. Deney Hayvanları Laboratuvarı – Sorumlu Veteriner Hekim, Mart 2019

Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Birimi - Veteriner Hekim, Aralık 2017-Mayıs 2018; Sorumlu Veteriner Hekim Mayıs-Eylül 2018

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı, Sorumlu Veteriner Hekim, Ekim 2016-Temmuz 2017

Kuğulu Veteriner Kliniği, Ankara - Veteriner Hekim, 2016

Pati Life Veteriner Kliniği, Ankara - Veteriner Hekim, 2016

Pet Friendly Veteriner Kliniği, Ankara - Veteriner Hekim, 2015

Damlagöl Ecza Deposu San. Tic. Ltd. Şti. - Sorumlu Yönetici, 2014

Monşer Veteriner Kliniği, İzmir - Veteriner Hekim, 2011

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama Çiftliği Staj, 2009

23. FISU Summer Universiade - Lojistik Birim Görevlisi, İzmir, 2005

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

TÜFEK, H, ÖZKAN, Ö. (2018). Laboratuvar Hayvan Biliminde 4R Kuralı. Kommagene Biyoloji Dergisi, 2 (1), 55-60.