

Kırıkkale’de Bulunan Kuzuların Dışkılarının *Giardia duodenalis* Yönünden Araştırılması

Investigation of *Giardia duodenalis* in Lambs Feces in Kırıkkale Province

^{1b} Serkal GAZYAĞCI^a, ^{1b} Aycan Nuriye GAZYAĞCI^b, ^{1b} Adnan AYAN^c, ^{1b} Özlem ORUNÇ KILINÇ^d

^aKırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Kırıkkale, TÜRKİYE

^bKırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji ABD, Kırıkkale, TÜRKİYE

^cVan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik ABD, Van, TÜRKİYE

^dVan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: *Giardia duodenalis*, kuzularda verim kaybına yol açan ve assemblaj diye adlandırılan alt tipleri bulunan ciddi bir protozoer hastalıktır. Assemblaj A ve B hem insan hem de hayvanlarda bulunabilen zoonoz türlerdir. *G. duodenalis* özellikle genç bireylerde diyare ile seyreden gastrointestinal sorunlara ve hatta ölümlere sebep olabilmekte ve hayvan yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle diyareli hayvanlarda varlığının araştırılması önemlidir. Bu sebeplerden yola çıkılarak planlanan bu çalışmada Kırıkkale bölgesindeki kuzularda bulunan *G. duodenalis*'in yaygınlığını belirlemek amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada Kırıkkale ilinde değişik işletmelerden 79 adet kuzudan dışkı toplandı. Alınan örneklerden doymuş çinko sülfat flotasyon (ZnSO₄; %33) yöntemi kullanılarak mikroskopik olarak incelemeler yapıldı. Daha sonra 79 kuzu dışkılarından DNA ekstraksiyonu yapılarak ve elde edilen DNA'ların nanodropla konsantrasyonu ölçülerek bu DNA'lardan *G. duodenalis* spesifik primerler kullanılarak PCR (Polymerase Chain Reaction) testi yapıldı. Daha sonra jel görüntüleme sisteminde görüntüleri elde edildi. **Bulgular:** Mikroskopik inceleme sonucunda 79 örneğin 13 (%16,45)'ünde *G. duodenalis* kistleri görüldü. 79 kuzu dışkısına PCR yapıldı ve 16 (%20,25)'sında 511 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi. **Sonuç:** Sonuç olarak Kırıkkale bölgesinde ki kuzularda *G. duodenalis*'in önemli bir sorun teşkil ettiği, uygun tedavinin uygulanmasının, koruyucu tedbirlerin alınmasının ve halk sağlığını korumak adına yetiştiricinin bu konuda bilinçlendirilmesinin zorunlu olduğu, ayrıca sonraki çalışmalar ile bu yöredeki kuzularda *G. duodenalis*'in alt tiplerinin araştırılarak zoonoz potensiyeye sahip assemblajların yayılımının belirlenmesinin faydalı olacağı anlaşılmıştır.

ABSTRACT Objective: *Giardia duodenalis* is a serious protozoan disease that causes loss of yield in lambs and has subtypes called assemblage. Assemblage A and B are zoonoses that can be found in both humans and animals. *G. duodenalis* can cause gastrointestinal problems and even deaths with diarrhea especially in young individuals and cause significant economic losses in animal husbandry. It is important to investigate its presence, especially in diarrheal animals. In this study, which was planned based on these reasons; it was aimed to determine the prevalence of *G. duodenalis* in lambs in Kırıkkale region. **Material and Methods:** In this study, feces were collected from 79 lambs from different enterprises in Kırıkkale province. Microscopic examinations were carried out from the samples taken using saturated zinc sulfate flotation (ZnSO₄; 33%) method. Then, DNA extraction was performed from 79 lamb feces and the concentration of DNA obtained with nanodrop was measured and PCR test was performed using *G. duodenalis* specific primers from these DNA, Then, images were obtained in the gel imaging system. **Results:** As a result of microscopic examination, *G. duodenalis* cysts were seen in 13 of 79 samples (16.45%). PCR was performed in 79 lamb feces and 511 bp bands were obtained in 16 (20.25%). **Conclusion:** Consequently, *G. duodenalis* is an important problem in lambs in Kırıkkale region, it is obligatory to apply appropriate treatment, take protective measures and raise the awareness of the breeder in order to protect public health, and also in subsequent studies, *G. duodenalis* in lambs in this region. It was clearly understood that it would be beneficial to determine the spread of assemblage with zoonotic potential by investigating subtypes.

Anahtar Kelimeler: Kuzu; *Giardia duodenalis*; PCR; dışkı

Keywords: *Giardia duodenalis*; PCR; feces

Giardia duodenalis, dünya çapında çiftlik hayvanlarında enfeksiyonlara sebep olan yaygın zoonotik enterik bir parazittir ve aynı zamanda halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır.¹ İnsan

ve çiftlik hayvanlarında ishal, karın ağrısı, şişkinlik ve kilo kaybına sebep olur.² Özellikle kuzularda görülen *G. duodenalis* ile ilişkili en yaygın semptomlar kötü kokulu dışkı, sulu kıvamda ishali

Correspondence: Serkal GAZYAĞCI
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Kırıkkale, TÜRKİYE/TURKEY
E-mail: gazyagciserkal@gmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences.

Received: 03 Jun 2020

Received in revised form: 18 Aug 2020

Accepted: 31 Aug 2020

Available online: 17 Dec 2020

2146-8850 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

dışkı, kilo alımında azalma, beslenme etkinliğinin bozulmasını içeren enteritistir (*G. duodenalis* ile ilişkili enteritis). Şimdiye kadar *G. duodenalis*'in 8 assemblajı (A-H) belirlenmiştir.³ Assemblaj A ve B hem insan hem de hayvanlarda bulunmalarına rağmen, C-H insanlarda bulunmayan konak spesifiktir.¹

G. duodenalis enfeksiyonunun, Van bölgesindeki koyunlarda Assemblaj A ve alt genotip A3 görüldüğü bildirilmiştir.⁴ Assemblaj A insanlar, çiftlik hayvanları, ve diğer memelilerde; Assemblaj B insanlarda, primatlarda ve diğer memelilerde; Assemblaj C ve Assemblaj D köpek ve diğer kanidelerde; Assemblaj E sığır, koyun ve keçiyi içeren toynaklılarda; Assemblaj F kedilerde; Assemblaj G ratlarda ve Assemblaj H deniz memelilerinde görülmektedir.^{3,5-7}

Bu çalışmanın amacı Kırıkkale bölgesindeki kuzularda bulunan *G. duodenalis*'in yaygınlığını belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, Ocak 2018-Haziran 2018 tarihleri arasında Kırıkkale bölgesindeki çeşitli işletmelerden 79 adet kuzu dışkısı toplandı. Dışkı numuneleri manuel olarak her bir hayvanın rektumundan tek kullanımlık lateks eldivenle alınarak etiketli dışkı kaplarına konuldu. Etiketlere hayvanın cinsiyeti ve yaşı kaydedildi. Daha sonra numuneler laboratuvara getirilerek inceleninceye kadar +4°C'de saklandı.

Mikroskopik İnceleme: Doymuş çinko sülfat flotasyon (ZnSO₄; %33) yöntemi kullanılarak elde edilen preparatlar, Giardia kistleri yönünden mikroskop altında 400x büyütme ile incelendi.^{8,9}

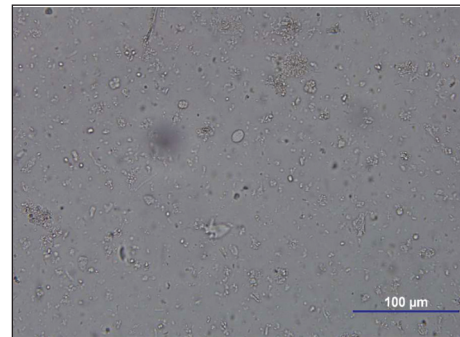
DNA ekstraksiyonu: 79 adet buzağı dışkı numunesinden DNA ekstraksiyonu için QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) kullanılarak kit protokolü takip edildi. Elde edilen DNA'lar bir sonraki aşamalara kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Nested PCR reaksiyonu: Caccio ve ark. tarafından tanımlanan (G7 F5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3' forward ve G759R 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'

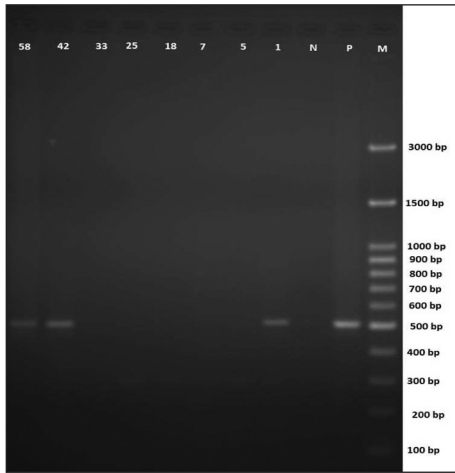
reverse) primerleri kullanılarak 753 bp'lik β-giardin gen bölgesinin amplifikasyonu yapıldı.¹⁰ 25 mL mastermix içerisinde 10 pmol forward ve reverse primer, 200 μM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1U Taq Polymerase ve 10X PCR buffer, Nükleaz Free Water ve 100 ng DNA kullanıldı. Reaksiyon 95°C'de 15 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her siklus denatürasyon (95°C'de 30 saniye), bağlanma (60°C'de 30 saniye) ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 7 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından Lalle ve ark. tarafından tanımlanan (BG1F 5'-GAACGAGATCGAGGTCCG-3' forward ve BG2R 5'-CTCGACGAGTTCGTGTT-3' reverse) primerleri kullanılarak 511 bp'lik β-giardin gen bölgesinin amplifikasyonu yapıldı.¹¹ Bunun için 25 mL mastermix içerisinde 10 pmol forward ve reverse primer, 200 μM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1U Taq Polymerase ve 10X PCR buffer, Nükleaz Free Water ve 100 ng DNA kullanıldı. Reaksiyon 95°C'de 15 dakikalık ön denatürasyonu takiben, her siklus denatürasyon (95°C'de 30 saniye), bağlanma (55°C'de 30 saniye) ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 7 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri Safe-T-Stain ile boyanarak % 1,5'luk agaroz jelde görüntüleri elde edildi.

BULGULAR

Mikroskopik inceleme sonuçları: İncelenen kuzu dışkı örneklerinin mikroskop altında yapılan (400x) muayenelerinde, 79 örneğin 13 (%16,45)'ünde *Giardia* spp. kistlerine rastlanmıştır (Resim 1).



RESİM 1: Giardia spp. Kistin mikroskopik görüntüsü.



RESİM 2: Giardia duodenalis Nested PCR agaroz jel görüntüsü. M: Marker. N: Negatif kontrol. P: Pozitif kontrol. 1, 42, 58: Pozitif örnekler.

Nested PCR sonuçları: Nested PCR, 79 örneğin tamamına uygulandı. Kuzuların 16 (%20,25)'sında 511 bp büyüklüğünde spesifik bantlar elde edilmiştir (Resim 2).

TARTIŞMA

Giardia duodenalis, koyunları da enfekte edebilen gastrointestinal bir protozondur. İyi bilinen bir zoonotik patojendir ve koyunlar insan enfeksiyonu kaynağı olarak gösterilmiştir.⁷ Dünya genelinde yapılan çalışmalarda Jafari ve ark. İran'ın Ahvaz bölgesinde 12 aylıktan küçük koyun ve keçilerde sırasıyla PCR testi ile %19,8 ve %15,9 oranında *G. duodenalis* enfeksiyonu belirlemişlerdir.¹² Wegayehu ve ark. Etiyopya'da 389 kuzudan topladıkları dışkı örneklerinin PCR testi ile 8'inde (%2,1) *G. duodenalis* pozitifliği saptamışlardır.¹³ Ryan ve ark. batı Avustralya'da 500 koyun dışkı örneğinin PCR ile %44'ünde Giardia pozitifliği tespit etmişler ve koyunların su kaynaklarını Giardia ile kontaminasyonunda önemli bir potansiyel olduğunu belirtmişlerdir.¹⁴ Zhang ve ark. Çin'in Heilangjiang bölgesinde 539 koyun dışkısının 30'unda (%5,6) mikroskopik olarak Giardia kisti gördüklerini bildirmişlerdir.¹⁵ Robertson ve ark. Norveç'de 550 kuzu dışkı örneğinin 42'sinde (%23) PCR ile Giardia pozitifliği tespit etmişler ve bu 42 örneğin birinde zoonotic Asemblaj B olduğunu bildirmişlerdir.¹⁶

Bununla birlikte, halk sağlığı için potansiyel tehdit olan bu protozoon ülkemizde yaygın olarak

görülmektedir.¹⁷⁻²¹ Ayrıca kuzularda *G. duodenalis*'in yaygınlığı ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Yapılan önceki çalışmalarda Van bölgesinde kuzularda *G. duodenalis*'in yaygınlığı mikroskopik olarak % 36, PCR test ile %42 olarak tespit edilmiştir.⁴ Bu çalışmada mikroskopik inceleme sonucunda 79 örneğin 13 (%16,45)'ünde, Nested PCR ile 16 (%20,25)'sında *G. duodenalis*'in yaygınlığı tespit edilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma ile Kırıkkale ilinde bulunan kuzuların *Giardia duodenalis* ile yaygın enfekte oldukları ve ekonomik olarak da ciddi kayıplara neden olabileceği tespit edildi. Çiftlik hekimliğinde ve sürü kontrolünde Giardia duodenalis'in varlığı göz önünde bulundurularak teşhis ve tedavi protokolü uygulanması gerekliliği anlaşılmış ve bu yöredeki kuzularda *G. duodenalis*'in alt tiplerinin araştırılarak zoonoz potensiyele sahip assemblajların yayılımının belirlenmesinin faydalı olacağı kanısına varılmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçlarının bu kadar değişken olmasının örnek alınan hayvanların yaşlarına, bölgenin hijyen şartlarına ve coğrafik yapısına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Serkal Gazyağcı; **Tasarım:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Denetleme/Danışmanlık:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan

Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Analiz ve/veya Yorum:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Kaynak Taraması:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Makalenin Yazımı:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem

Orunç Kılınç; **Eleştirel İnceleme:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç; **Malzemeler:** Serkal Gazyağcı, Aycan Nuriye Gazyağcı, Adnan Ayan, Özlem Orunç Kılınç.

KAYNAKLAR

- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(1):110-40. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An update on Giardia and giardiasis. Curr Opin Microbiol. 2016;34:47-52. [Crossref] [PubMed]
- Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of Giardia. Int J Parasitol. 2013;43(12-13):943-56. [Crossref] [PubMed]
- Ayan A, Alic Ural D, Erdogan H, Orunc Kilinc O, Gultekin M, Ural K. [Prevalance and Molecular Characterization of Giardia duodenalis in Livestock in Van, Turkey]. IJEES. 2019;9(2):289-96. [Crossref]
- Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol. 2008;38(11):1239-55. [Crossref] [PubMed]
- Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW; ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of Giardia duodenalis. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(12):558. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Wang H, Qi M, Zhang K, Li J, Huang J, Ning C, et al. Prevalence and genotyping of Giardia duodenalis isolated from sheep in Henan Province, central China. Infect Genet Evol. 2016;39:330-5. [Crossref] [PubMed]
- Wilson JM, Hankenson FC. Evaluation of an inhouse rapid ELISA test for detection of giardia in domestic sheep (Ovis aries). J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010;49(6):809-13. [PubMed] [PMC]
- Xiao L, Herd RP. Quantitation of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. J Clin Microbiol. 1993;31(11):2944-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002;32(8):1023-30. [Crossref] [PubMed]
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of Giardia duodenalis and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int J Parasitol. 2005;35(2):207-13. [Crossref] [PubMed]
- Jafari H, Jalali MH, Shapouri MS, Hajikalai MR. Determination of Giardia duodenalis genotypes in sheep and goat from Iran. J Parasit Dis. 2014;38(1):81-4. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Wegayehu T, Karim MR, Li J, Adamu H, Erko B, Zhang L, et al. Prevalence and genetic characterization of Cryptosporidium species and Giardia duodenalis in lambs in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. BMC Vet Res. 2017;13(1):22. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, McInnes L, et al. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for Cryptosporidium and Giardia parasites. Appl Environ Microbiol. 2005;71(9):4992-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Zhang W, Zhang X, Wang R, Liu A, Shen Y, Ling H, et al. Genetic characterizations of Giardia duodenalis in sheep and goats in Heilongjiang Province, China and possibility of zoonotic transmission. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(9):1826. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Robertson LJ, Gjerde BK, Furuseth Hansen E. The zoonotic potential of Giardia and Cryptosporidium in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. Vet Parasitol. 2010;171(1-2):140-5. [Crossref] [PubMed]
- Aliç Ural D, Erdoğan H, Toplu S, Ayan A. [Application of Oral Clinoptilolite Intended For Prevention of Giardiasis in Goat Kids] Kocatepe Vet J. 2017;10(3):158-63.
- Ayan A, Aliç Ural D, Paşa S, Erdoğan S, Erdoğan H. [May clinoptilolite be an alternative and natural solution for the treatment of giardiasis in lambs?] J VetBio Sci Tech. 2018;3(2):16-20. [Crossref]
- Toros G, Ural K. Single dose secnidazole treatment efficiency against naturally occurring Giardia duodenalis infection in calves. Rev MVZ Córdoba. 2018;23(2):6660-70. [Crossref]
- Ayan A, Erdoğan S. [Could Antiparasitic Cure with Clinoptilolite be Achieved in Dogs Naturally Infected with Giardia duodenalis?]. Kocatepe Vet J. 2019;12(3):305-9.
- Çamkerten G, Erdoğan H, Aliç Ural D, Çamkerten İ, Erdoğan S, Ural K. [Levels of Serum 25 (OH) D3 in Naturally Infected Lambs With Giardia duodenalis]. Kocatepe Vet J. 2019;12(1):71-4. [Crossref]