

**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAMSUN VE GİRESUN İLLERİNDEN ALINAN SU
ÖRNEKLERİNDE *Cryptosporidium parvum*'un MOLEKÜLER
TEKNİKLER KULLANILARAK TESPİT EDİLMESİ**

Emine AYZAZ

YÜKSEK LİSANS

ORDU 2015

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Emine AYAZ tarafından hazırlanan ve Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN danışmanlığında yürütülen “Samsun Ve Giresun İllerinden Alınan Su Örneklerinde *Cryptosporidium parvum*’un Moleküler Teknikler Kullanılarak Tespit Edilmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 21/07/2015 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN

Başkan : Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN
Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

İmza :

Üye : Doç. Dr. Beyhan TAŞ
Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ülkü KARAMAN
Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

İmza :

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20/08/15 tarih ve 2015/351 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



20/08/2015

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Kürşat KORKMAZ

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



İmza

Emine AYAZ

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

SAMSUN VE GİRESUN İLLERİNDEN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDE *Cryptosporidium parvum*'un MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANILARAK TESPİT EDİLMESİ

Emine AYAZ

Ordu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, 2015

Yüksek Lisans, 155 s.

Danışman: Doç Dr. Zeynep KOLÖREN

Bu çalışmada, 2012, 2013 sonbahar; 2013, 2014 ilkbahar aylarında Giresun ve Samsun illerinde belirlenen toplam 45 istasyondan 420 çevresel, 120 içme suyu örneği alınmıştır. Alınan su örneklerinden DNA izole edilerek Nested PZR ile 18S rRNA geni, İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) yöntemiyle SAM-1 hedef geni kullanılarak *Cryptosporidium parvum*'un varlığı araştırılmıştır. Kullanılan iki metotla, Samsun ve Giresun illerinden alınan içme suyu örneklerinin hiç birinde *Cryptosporidium* DNA'sına rastlanılmamıştır. Samsun il ve ilçelerinden alınan 240 çevresel su örneğinin 101'i (%42) LAMP yöntemi ile, 92'si (%38.3) Nested PZR yöntemi ile *Cryptosporidium*'un varlığı açısından pozitif bulunmuştur. Giresun il ve ilçelerinden alınan 180 çevresel su örneğinde LAMP yöntemiyle 74 (%41.1), Nested PZR ile 70 (%38.8) örnekte *Cryptosporidium* DNA'sı tespit edilmiştir.

Nested PZR yöntemiyle pozitif olan örnekler PZR-RFLP tekniği kullanılarak *RsaI* restriksiyon enzimiyle kesilmiştir. Elde edilen kesim ürünleri değerlendirildiğinde tüm pozitif örneklerin *C. parvum* türüne ait olduğu gözlenmiştir. 18S rRNA gen bölgesinin çoğaltıldığı PZR ürünlerinden 18 örneğin sekansı alınmıştır.

Samsun ve Giresun il sınırlarında yer alan çevresel ve içme suyu kaynaklarında su kökenli protozoonlar ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmayla araştırma alanında su kirliliğine neden olan su kökenli protozoon *Cryptosporidium* türlerinin tespiti uluslararası kabul görmüş moleküler tekniklerle sağlanmıştır. Gerek bölgedeki halk sağlığı için tehlikeli protozoonun varlığının tespitiyle halk sağlığını korumaya yönelik temel bir çalışma olması gerekse yapılacak diğer çalışmalar için kaynak oluşturması bu çalışmanın önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium parvum*, Moleküler teknikler, Samsun, Giresun

ABSTRACT

INVESTIGATION ON *Cryptosporidium parvum* BY USING MOLECULAR TECHNICS IN WATER SAMPLES COLLECTED FROM PROVINCES OF GİRESUN AND SAMSUN

Emine AYZA

University of Ordu

Institute of Science

Department of Biology, 2015

MSc. Thesis, 155 p.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zeynep KOLÖREN

In this study, 420 environmental samples and 120 drinking water samples were collected from a total of 45 stations of Samsun and Giresun provinces in the period of 2012, 2013 fall and 2013, 2014 spring. DNA isolated from water samples were investigated by Nested PCR for 18S rRNA gene and Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for SAM-1 target gene. There are not any *Cryptosporidium*'s DNA by this two methods was found in drinking water samples collected from Samsun and Giresun Provinces. One hundred one (%42), 92 (%38.3) of 240 environmental samples has been found positive by LAMP, Nested PCR respectively in the province of Samsun. Seventy four (%41.1), 70 (%38.8) of 180 environmental samples were positive by LAMP, Nested PCR respectively in the province of Giresun.

The samples of which are positive by Nested PCR has been cut with RsaI restriction enzyme by using PCR-RFLP method. When the resulting of cut product is evaluated, all positive samples have been observed as *C. parvum*. These sequences of twenty one samples which are 18S rRNA gene PCR products has been obtained.

There are a few studies about water-borne protozoans in environmental and drinking water resources of Samsun and Giresun Province. The water-borne protozoan *G. intestinalis* which are causes of water pollution in the investigated region were determined by the internationally accepted molecular techniques in this research. The importance of this study was to establish both a basic work for protecting public health by detecting the presence of the dangerous protozoan in the investigated area and the source for other next studies.

Key Words: *Cryptosporidium parvum*, Molecular methods, Samsun, Giresun

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim süresinde bana bu çalışmayı gerçekleştirme olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesi ve çalışmanın yürütülmesinde öneri ve yorumlarıyla bana katkıda bulunan, çalışmamın her aşamasında benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Parazitoloji konusunda yıllardır edindiği bilgi ve tecrübelerini benden sakınmayan, bu tezi tamamlamamda büyük emeği bulunan ve çalışmalarına yön veren Sayın Yrd. Doç. Dr. Ülkü KARAMAN'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlığıyla güç vererek destek olan anne ve babam Sevim ve Ahmet AYAZ'a ve hayatta ablaya sahip olmanın bir ayrıcalık olduğunu hissettiğim ablalarım Derya CENGİZ ve Emruhan BAHADIR ve eşlerine teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarına başladığım ilk yıllardan itibaren yanımda olan, tüm sakarlıklarına rağmen bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen Elif DEMİREL ve Onuralp SEFEROĞLU'na, arazi çalışmalarımız sırasında zorla dinlettiği müziklerle bizi hiç yalnız bırakmayan kaptanımız Fatih KARAHASAN'a, çalışmalarım esnasında tüm nazımı çeken Başak GÜLABİ'ye, tüm yüksek lisans arkadaşlarıma ve Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nün tüm hocalarına teşekkür ederim.

Üniversite hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, başım her sıkıştığında hiç düşünmeden yardımına koşan, tüm nazımı çeken, aynı kanı taşımadan da kardeş olunabileceğini hissettiren ve kanıtlayan Çağla KILIÇ, Eda DEMİRKOL, Muammer DARÇIN, Burcu KAYGANA, Gülşah YILMAZ ve Berna ÇETİN'e her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Öğrenciliğimin son zamanlarında hayatıma renk katan, tüm üzüntümü ve sevincimi paylaştığım, kendimi hiçbir zaman yabancı (cevizli baklava alan cimri öğrenci) hissetmediğim geniş ailem Fen Bilimleri Enstitüsüne benden yardım ve desteklerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca üniversite hayatımda tanımakta çok geç kaldığım ama bu kısa zaman diliminde kalbimde kocaman yer edinen ve tezimin teşekkür kısmında ayrı bir paragrafı hak eden manevi ablam Esra DURU ve eşi Zafer DURU'ya benden hiçbir zaman aile sıcaklığı ve sevgisini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 111T818 nolu Kariyer projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

	Sayfa
TEZ BİLDİRİMİ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Suyun Önemi ve Su Kirliliği	2
1.2. Su Kalite Standartları	5
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. <i>Cryptosporidium</i> 'un Tarihçesi	10
2.2. <i>Cryptosporidium</i> 'un Taksonomisi	12
2.3. <i>Cryptosporidium</i> 'un Moleküler Yapısı ve Genotipleri	18
2.4. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü	21
2.4.1. Ekskistasyon (Kistlerin açılması).....	22
2.4.2. Merogoni (Asexüel çoğalma).....	23
2.4.3. Gametogoni	24
2.4.4. Fertilizasyon	24
2.4.5. Ookist dönemi	24
2.4.6. Sporogoni	25

2.5.	Kriptosporidiyoz	27
2.6.	Klinik Bulgular.....	28
2.7.	İmmünolojik ve Antijenik Yapı	30
2.8.	Bulaşma ve Korunma Yolları	31
2.9.	Kriptosporidiyozda Tanı	33
2.9.1.	Direkt Mikroskopik Boyama Yöntemleri	36
2.9.1.1.	Dışkı Örneklerinde Saklama Yöntemleri.....	36
2.9.1.2.	Dışkı Örneklerini Çoklaştırma (Konsantrasyon) Yöntemleri.....	37
2.9.1.3.	Basit Boyama Yöntemleri.....	37
2.9.2.	Serolojik Yöntemler	40
2.9.3.	Moleküler Yöntemler	42
2.9.4.	Histopatolojik İnceleme	44
2.9.5.	Kültür Yöntemleri	44
2.10.	Tedavi.....	45
3.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	46
3.1.	Yurtdışında Yapılan Çalışmalar	46
3.1.1.	Yurtdışında Yapılan Su Kökenli Çalışmalar.....	49
3.2.	Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	53
3.2.1.	Türkiye’de Yapılan Su Kökenli Çalışmalar.....	61
4.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	64
4.1.	Araştırma Bölgesinin Tanımı	64
4.1.1.	Giresun	64
4.1.2.	Samsun	65

4.2.	Giresun ve Samsun İllerinde Örnekleme Yapılacak İstasyonlar.....	66
4.3.	Örneklerin Toplanması ve Alüminyum Sülfat ile Çöktürme.....	77
4.4.	Örneklerin Saflaştırılması (Sükroz Gradient Yöntemi)	77
4.5.	Örneklerin IFA Yöntemiyle Boyanması	78
4.6.	DNA İzolasyonu.....	78
4.7.	LAMP Tekniği	78
4.8.	Nested PZR Tekniği.....	79
4.9.	RFLP Tekniği.....	80
4.12.	PZR Ürünlerinin Dizi Reaksiyonu, Dizilerin Elde Edilmesi ve Hizalanması	81
4.13.	Genetik Verilerin Analizi	81
4.13.	İstatiksel Analiz.....	81
5.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	81
5.1.	<i>C. parvum</i> 'un IFA Yöntemiyle Tespit Edilmesi	82
5.2.	<i>C. parvum</i> 'un Moleküler Yöntemlerle Tespit Edilmesi.....	96
5.2.1.	Kullanılan Moleküler Metotların Hassasiyeti ve Özgünlüğü	96
5.2.1.1.	LAMP Metodunun Hassasiyeti ve Özgünlüğü.....	96
5.2.1.2.	Nested PZR Metodunun Hassasiyeti ve Özgünlüğü.....	98
5.2.2.	İstasyonlarımıza Ait Örneklere Uygulanan Moleküler Metodların (LAMP, Nested PZR, RFLP ve Sekans Analiz) Sonuçları.....	101
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	117
7.	KAYNAKLAR.....	120
	ÖZGEÇMİŞ.....	138

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Cryptosporidium</i> 'un yaşam döngüsü.....	26
Şekil 2.2. <i>Cryptosporidium</i> 'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri	26
Şekil 2.3. Boyanmış <i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri	40
Şekil 4.1. Araştırma alanını oluşturan Giresun ilindeki istasyonların haritası	64
Şekil 4.2. Araştırma alanını oluşturan Samsun ilindeki istasyonların haritası	65
Şekil 4.3. Samsun ili Terme ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	67
Şekil 4.4. Samsun ili Çarşamba ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	68
Şekil 4.5. Samsun ili Tekkeköy ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	69
Şekil 4.6. Samsun il Merkezinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	70
Şekil 4.7. Samsun ili Bafra ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	71
Şekil 4.8. Giresun il merkezinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	72
Şekil 4.9. Giresun ili Piraziz ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	73
Şekil 4.10. Giresun ili Bulancak ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	74
Şekil 4.11. Giresun ili Espiye ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	75
Şekil 4.12. Giresun ili Keşap ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar	76
Şekil 5.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> ookistlerinin IFA yöntemiyle fluoresan mikroskopunda x1 000 büyütme görüntüsü	82
Şekil 5.2. Giresun ili çevresel su örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ortalama ookist dağılımı	87
Şekil 5.3. Samsun ili çevresel su örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ortalama ookist dağılımı	87
Şekil 5.4. Giresun ili çevresel su örneklerinde aylara göre <i>Cryptosporidium</i> ookist dağılımı	89
Şekil 5.5. Samsun ili çevresel su örneklerinde aylara göre <i>Cryptosporidium</i> ookist dağılımı.....	89
Şekil 5.6. Giresun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ortalama ookistin istasyonlara göre ortalama değerleri	91

Şekil 5.7. Samsun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ortalama ookistinin istasyonlara göre ortalama değerleri	91
Şekil 5.8. Giresun ili 2012-2014 yılları arası çalışma dönemi sıcaklık-yağış grafiği.	92
Şekil 5.9. Samsun ili 2012-2014 yılları arası çalışma dönemi sıcaklık-yağış grafiği.	92
Şekil 5.10. LAMP tekniğiyle çoğaltılan seri sulandırılmış <i>Cryptosporidium</i> IOWA DNA'sı kullanılarak yapılan hassasiyet deneyinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	97
Şekil 5.11. LAMP tekniğinin özgünlüğünün agaroz jeldeki görüntüsü.....	98
Şekil 5.12. Nested PZR tekniği ile çoğaltılan seri sulandırılmış <i>Cryptosporidium</i> IOWA DNA'sının agaroz jeldeki görüntüsü.....	100
Şekil 5.13. Nested PZR tekniğinin özgünlüğünün agaroz jeldeki görüntüsü	100
Şekil 5.14. Giresun ve Samsun illerindeki istasyonlardan alınan su örneklerine ait LAMP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	104
Şekil 5.15. Samsun ve Giresun ili ve ilçelerinden alınan su örneklerine ait Nested PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	105
Şekil 5.16. Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerine ait Nested PZR ürünlerinin <i>RsaI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu agaroz jeldeki görüntüsü.....	108
Şekil 5.17. Giresun ilinden alınan örneklerde SSU rRNA gen bölgesine ait NJ filogeni ağacı	109
Şekil 5.18. Samsun ilinden alınan örneklerde SSU rRNA gen bölgesine ait NJ filogeni ağacı	110

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Yüzey sularını kirletme potansiyeli bakımından kirletici kaynakların Dünya Sağlık Örgütü'nce (DSÖ) yapılan sınıflandırması	4
Çizelge 1.2. Farklı tipte su kaynaklarında (1 litrede) bulunan fekal indikatörlerin ve enterik patojenlerin sınır değerleri	7
Çizelge 1.3. İçme suyu örneklerinde bulunan ve suyla taşınan patojenler	7
Çizelge 2.1. <i>Cryptosporidium</i> cinsine ait sınıflandırma	13
Çizelge 2.2. Mevcut bilgiler ışığında saptanan türler ve yerleştiği konaklar.....	15
Çizelge 2.3. <i>Cryptosporidium</i> türlerinin konakçıları, yerleştiği organ, ookistlerin morfolojik karakterleri ve 18S rRNA gen bölgesinin referans numaraları.....	17
Çizelge 2.4. <i>Cryptosporidium</i> genotipleri.....	20
Çizelge 2.5. Kriptosporidiyoz tanısında kullanılan yöntemler	35
Çizelge 2.6. Farklı boyama yöntemleriyle boyanan parazit ookistlerinin mikroskopik görünümü	39
Çizelge 4.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin amplifikasyonunda kullanılan LAMP primerleri	79
Çizelge 4.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. için Nested PZR Koşulları	80
Çizelge 5.1. Giresun il ve ilçelerine ait örneklerin IFA tekniğiyle <i>Cryptosporidium</i> sayım sonuçları	84
Çizelge 5.2. Samsun il ve ilçelerine ait örneklerin IFA tekniğiyle <i>Cryptosporidium</i> sayım sonuçları	85
Çizelge 5.3. Giresun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki <i>Cryptosporidium</i> ookisti değerlerinin istasyonlara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları	93
Çizelge 5.4. Giresun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki <i>Cryptosporidium</i> ookisti değerlerinin aylara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları	94
Çizelge 5.5. Samsun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki <i>Cryptosporidium</i> ookisti değerlerinin istasyonlara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları	95
Çizelge 5.6. Samsun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki <i>Cryptosporidium</i> ookisti değerlerinin aylara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	:	Ediltilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
AO	:	Acridine orange
AP-PZR	:	Arbitrary Primed-PZR
AR	:	Auramin-rhodamine
CDC	:	Hastalık Kontrol Merkezi
COWP	:	<i>Cryptosporidium</i> ookist duvar proteini
DFA	:	Direkt İmmunfloresan Antikor
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DSİ	:	Devlet Su İşleri
ELISA	:	Enzim Linked İmmunosorbent Assay
FDA	:	Gıda ve İlaç Yönetimi
HSP70	:	hsp 70 mRNA geni (70-kDa ısı şok proteini)
IFA	:	İndirekt İmmunfloresan Antikor
IL-12	:	İnterlökün-12
IL-5	:	İnterlökün-5
IMS	:	İmmunomagnetik separasyon
INF- γ	:	İnterferon- γ
ITS rDNA	:	Ribosomal internal transcribed spacer

LAMP	:	İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi
LMP	:	Low Melting Preparative
MAF	:	Modifiye Asit Fast
MKSA	:	Modifiye Kinyoun'un Aside Dirençli Boyama Yöntemi
MZN	:	Modifiye Ziehl Neelsen
NASBA	:	Nükleik Asit Dizisine Dayalı Çoğaltma
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
NJ	:	Neighbour Joining
NTZ	:	Nitazoksanid
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	:	Restriksüyon fragment length polymorphism
RNA	:	Ribonükleik Asit
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik Asit
SAF	:	Sodyum asetoasetik asit-formal
SAM	:	S-adenosylmethionine synthetase
SKKY	:	Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği
SSU	:	Küçük alt birim
TCP-1	:	T-kompleks protein 1 delta
TE	:	Tris-EDTA
TNF- α	:	Tümör nekroz faktörü- α

TRAP-C1	:	Trombospondin adhesive proteini <i>Cryptosporidium-1</i>
TRAP-C2	:	<i>Cryptosporidium-2</i> geninin Thrombospondin adhesive proteini
TÜİK	:	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	:	Ultraviyole
WHO	:	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
mg	:	Miligram
L	:	Litre
TS	:	Türkiye Standardı
ml	:	Mililitre
km	:	Kilometre
dk	:	Dakika
g	:	Gram
Ig	:	İmmüoglobulin
µm	:	Mikrometre

1. GİRİŞ

Canlı hayatının devamını sağlamada temel unsur olan su, sadece insanlar için değil, doğadaki tüm canlılar için yaşamsal önem arz eden önemli doğal kaynaklardan birisidir (Toroğlu ve ark., 2006). Tüm metabolik olaylarla doğrudan ilişkili olan su; çeşitli yaş gruplarına göre farklılıklar göstermekle birlikte insan vücudunun ortalama %70'ini oluşturmaktadır (Güler, 1997). Su, vücudumuzun pH dengesini koruyarak besinlerin ve artık maddelerin hücrelerdeki organellere dağılmasını sağlar. Kullanım alanlarının yaygınlığı ve ikame edilememesi suyun önemini arttırmaktadır (Akın ve Akın, 2007).

Suyun hal değiştirerek yeryüzü ile atmosfer arasındaki dolaşımına “hidrolojik döngü” denir. Bu süreç sırasında suya karışan maddeler, suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek “su kirliliği” olarak adlandırılan durumu ortaya çıkarmaktadırlar. Su kirliliği terimi, sularda insan etkisiyle oluşan ve suyun kullanımını kısıtlayan veya tamamen engelleyen ve su kaynaklarının kalitesini düşürerek, kullanımını bozacak düzeyde organik, inorganik, biyolojik ve radyoaktif kirleticiler içermesi olarak tanımlanmaktadır (Uslu, 2001).

Su kirliliğinin, ortamda yaşayan canlıları doğrudan doğruya etkilediği göz önüne alınırsa, suya olan gereksinimin artmasıyla beraber su kaynaklarının kalitesinin izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Öncelikle su kirliliğine neden olacak ve kirlilik etmeni veya tehdidi oluşturabilecek problemlerin tespit edilmesi gerekir. Çünkü su, oral-fekal enfeksiyon zincirinin en önemli halkasıdır. Evsel ve endüstriyel kaynaklı atık suların içme ve kullanma sularına karışmasıyla birçok patojen mikroorganizma suda hızla üreyerek salgın hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedirler (Fakir, 2012; Aksu, 2004). Bu nedenle içme ve kullanma sularının insan sağlığını tehdit eden zararlı mikroorganizma ve kimyasal maddelerden arındırılmış olması gereklidir (Baltacı, 1998). Çeşitli nedenlerle kirlenmiş su kaynaklarının ıslah edilmesi ve doğal kaynaklarının korunması için, su kalitesinin izlenmesi ve değerlendirilmesi çalışmalarının hızlandırılması gerekir (Dinçer, 2014).

Nüfusun hızla artmasına karşın su kaynaklarının sabit kalması nedeniyle güvenilir suya olan ihtiyaç her geçen gün önemini arttırmaktadır. Bu nedenle, kısıtlı olan

içme ve kullanma sularında mikrobiyolojik kirlilik halk sağlığı açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır (Alkan ve ark., 1999). Gelişen dünyada tüm hastalıkların yaklaşık %80'inin güvenilir su ve temizlik koşullarının yetersizliğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Her yıl büyük bir kısmını çocukların oluşturduğu 5 milyondan fazla kişi, su kirliliğine bağlı hastalıklarla hayatını kaybetmektedir (Anonim, 2007; Kaya, 2011).

1.1. Suyun Önemi ve Su Kirliliği

Tarih boyunca su, yaşamın her alanında sahip olduğu önem nedeniyle, tüm canlılar için en çok ihtiyaç duyulan temel unsurlardan biridir (Özsoy, 2009). Bu nedenle, yüzyıllar boyunca hızla artış gösteren kentleşme ve endüstrileşme süreci sonucunda insanların en temel ihtiyaçları olan içme suyunun sağlıklı olarak temini de yaşamsal önem kazanmıştır (Kali, 2008).

Dünya üzerinde toplam su miktarı yaklaşık 1.4 milyar km³'tür. Bu suların %97.5'i okyanuslarda ve denizlerde tuzlu su olarak, %2.5'i ise nehir ve göllerde tatlı su olarak bulunmaktadır (Gürer, 2007; Özdemir, 2010). Tatlı su kaynakları sınırlı oranlarda yağışlarla kendini yenileyebilen doğal kaynaklardandır. Yeryüzünün 3/4'ünün sularla kaplı olması, su bolluğu olduğu görünümü verirken, dünya nüfusunun üçte biri önemli derecede su sıkıntısı çekmekte ve 2025 yılına kadar bu oranın özellikle kalkınmakta olan ülkelerde daha üst sınırlara yükselmesi beklenmektedir (Anonim, 2003; Özsoy, 2009; Kaya, 2011). Bu nedenle su kaynaklarının değerlendirilmesi ve bilinçli atık su yönetimi için su kalitesini bozmadan alınacak önlemlerle, akarsu kaynaklarının kirletilmesinin önlenmesi hayati önem taşımaktadır (Coşkun, 2012).

Ülkeler kişi başına düşen yıllık su miktarına göre su zengini ve fakiri olarak gruplandırılmaktadır. Yıllık kişi başına düşen kullanılabilir su miktarı 1 000 m³'ten daha az ise su fakiri, 1 000-2 000 m³ arasında su azlığı çeken ve 2 000 m³'ten çok ise su zengini ülkeler olarak tanımlanırlar. Bugün Türkiye'nin nüfusunun yaklaşık 72 milyon olduğu düşünülürse, kişi başına düşen 1 555 m³'lük yıllık kullanılabilir miktarıyla su azlığı yaşayan ülkeler arasında yer aldığı söylenebilir (Atalık, 2006).

Devlet Su İşleri'nin (DSİ) su potansiyeli hesaplamalarına göre Türkiye kişi başına yıllık 1 652 m³ su potansiyeline sahiptir. Birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de doğal kaynakların dikkatsiz kullanımı sonucu temiz su ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tahminlerine göre Türkiye 2030 yılında su sıkıntısı yaşayan ülkeler arasında yer alacaktır (Coşkun, 2012; Dinçer, 2014).

Hızla artan dünya nüfusu ve insanoğlunun daha iyi yaşam standartlarını yakalama arzusu nedeniyle ekolojik denge bozulmakta ve çevre kirliliği canlıların yaşamını tehdit altına almaktadır (Yorulmaz, 2006). Doğal kaynakların aşırı ve yanlış kullanımı sonucunda, yaşamın temel unsurları olan hava, su ve toprağın yapısını bozulmaktadır (Özçağlar, 2000).

Su kirliliğinin kontrolünün esaslarının belirlenmesi için gerekli olan hukuki ve teknik esasları ortaya koymayı hedefleyen Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği (SKKY), 1988 yılında yürürlüğe girmiştir (Resmi Gazete, 1988). Bu yönetmeliğe göre su kirliliği; su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi şeklinde gözlenen ve doğrudan veya dolaylı yoldan biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, balıkçılıkta, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde veya enerji atıklarının boşaltılması şeklinde tanımlanır. Yüzey sularının kirlenmesine sebep olan kirlilik etkeni ve kaynakları Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Yüzey sularını kirlenme potansiyeli bakımından kirlenici kaynakların Dünya Sağlık Örgütü'nce (DSÖ) yapılan sınıflandırması (Dinçer, 2014)

Kirlilik Etkeni	Kaynağı
Bakteriler, virüsler ve diğer hastalık yapıcı canlılar	Hastalıklı veya hastalık taşıyan organizmalar
Organik maddelerden kaynaklanan kirlenme	Ölmüş bitki ve hayvan artıkları
Endüstri atıkları	Fenol, arsenik, siyanür, krom, kadmiyum vb.
Yağlar ve benzeri maddeler	Her türlü yağlar, petrol vb.
Sentetik deterjanlar	Fosfat bazlı kimyasallar
Radyoaktivite	Radyoaktif maddeler (plütonyum, uranyum, toryum vb.)
Pestisitler	Zararlılarla mücadelede kullanılan organik maddeler
Yapay organik kimyasal maddeler	Petrol ve türevleri
Anorganik tuzlar	Toksik değildir ancak yüksek dozda iken tehlike yaratırlar
Yapay ve doğal tarımsal gübreler	Gübrelerin içerdiği azot ve fosfor elementleri
Atık ısı	Termik santraller

Dünyanın birçok bölgesinde, tatlı su kaynaklarının mikrobiyal kontaminasyonu halk sağlığı açısından hala büyük bir sorun oluşturmaktadır. Suların hijyenik açıdan kirlenmesine neden olan hastalık yapıcı mikroorganizmalar, genellikle hastalıklı (portör=hastalık taşıyıcı) hayvan ve insanların dışkılarıyla taşınmaktadır. Bulaşıcı etki ya bu atıklarla doğrudan temasla ya da bu atıkların karıştığı sulardan dolaylı olarak gerçekleşir. Endüstriyel, tarımsal ve evsel artıklarla kirlenmiş sular hiçbir işleme tabi tutulmadan ya da bir kısmı işlenerek dere ve göllere sık sık boşaltılmakta, bunun sonucunda yüzey sularının kalitesi bozulmaktadır. Bu nedenle insan ve hayvan dışkıları içeren ve önemli sağlık riski oluşturan atıkların alıcı ortamlara verilmesinden önce uygun bir dezenfeksiyon işlemi yapılması gerekir (Alkan ve ark., 1999; Kaya, 2011).

Son zamanlarda büyük şehirlerimizde yapılan çalışmalarda şebeke suları, mikrobiyolojik kalitelerinin yanı sıra fizikokimyasal özellikleri yönünden de değerlendirilmektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre; ülke genelinde il merkezlerinden alınan şebeke sularının %17'si, kaynak sularının %31.4'ü; ilçelerden alınan şebeke sularının %36.6'sı, kaynak sularının ise %36.3'ü standartlara uygunluk göstermemiştir (Alemdar ve ark., 2009; Demirel, 2014).

1.2. Su Kalite Standartları

Toplum sağlığı açısından, içme ve kullanma sularının hastalık yapıcı mikroorganizmaları ve zararlı kimyasal maddeleri içermesi istenmemektedir. Bu nedenle su kalitesinin belirlenmesinde, suyun faydalı bir Şekilde kullanılmasını sağlayan tüm fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametrelerin tespit edilmesi gerekmektedir. Sularda bu Őartların sağlanabilmesi ve suda bulunması arzu edilmeyen maddelerin belirli bir seviyenin altında tutulmasının sağlanması amacıyla çeşitli standartlar geliŐtirilmiŐtir. Bunlar arasında DSÖ tarafından geliştirilen içme suyu standartları yaygın olarak kullanılmaktadır (WHO, 1996; Kaya, 2011). Bu standartların oluŐturulmasındaki amaç, suyun içerdiği bir takım maddelerin belli sınırları aŐması halinde ortaya çıkabilecek su kirliliğinin insan yaŐamına zararlı etkilerinin önlenmesidir (Özdemir, 2010).

Resmi Gazete’de 31/12/2004 tarih ve 25687 sayıyla yayınlanarak yürürlüğe giren SKKY’nin, 1. maddesinde amacını, ülkenin yeraltı ve yerüstü su kaynakları potansiyelinin korunması ve en iyi bir biçimde kullanımının sağlanması için, su kirlenmesinin önlenmesini sürdürülebilir kalkınma hedefleriyle uyumlu bir Şekilde gerçekleŐtirmek üzere gerekli olan hukuki ve teknik esasları belirlemek olarak tanımlamaktadır.

Sağlıklı ve temiz su; insan sağlığına zararlı olabilecek mikroorganizmaları ve kimyasalları içermeyen, ancak insan yaşamı için gerekli mineralleri gerekli miktarlarda bünyesinde bulunduran renksiz, kokusuz ve berrak olmalıdır (Özsoy, 2009). Su kalitesi ölçütlerinin tespit edilmesindeki temel amaçlardan ilki suyun kirlenmekten korunmasıdır. Çünkü dezenfeksiyon işlemi uygulanmış içme suyu; ham suyun kalitesine ve arıtım derecesine bağlı ya da arıttıktan sonra, depolanmasında ve dağıtım safhasında deđiŐikliđe uğrayarak bozulabilmektedir. Dezenfeksiyon işlemi özellikle halk sağlığını tehlikeye düşürebilecek sonuçların engellenebilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle su kaynaklarının insan ve hayvan atıkları ile kirlenmesinin engellenmesi özellikle gastrointestinal hastalıklardan korunmak için hayati önem arz etmektedir (Dinçer, 2014).

Su kalitesi kriterleri ile su kalitesi standartları arasında ayırım yapmak çok önemlidir. Kriterler suyun güvenilir olarak kullanımını sağlayan ve suyun

kalitesini bozan farklı maddeler üzerinde getirilen nitel veya nicel sınırlamalardır. Standartlar ise, bu kriterlerle birlikte suyun kullanım amaçlarını ve kalitesini koruyabilecek şekilde planlanan gerekli arıtmalar ile denetim yollarıdır (Dinçer, 2014). Su kalite kontrolünün yapılabilmesi ve gerekli standartların tesis edilebilmesi için öncelikle su kaynaklarının hangi maksatlar için kullanılacağıının bilinmesi gereklidir (Twort, 1974; Fakir, 2012). Her ülkenin kendine özgü içme suyu kalite standardı vardır. Ülkemiz için kabul edilen TSE 266 İçme Suyu Standardı 17.02.2005 tarih ve 25730 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanarak yürürlüğe giren İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliktir.

Fekal kirlilik insan ve insan dışı çeşitli kaynaklardan meydana gelmektedir. İnsan kaynaklı fekal indikatörlerin kontaminasyonu insan sağlığı için büyük risk oluşturmaktadır (Scott ve ark., 2003). Protozoonlar ve bazı enterovirüsler klor içeren birçok dezenfektana karşı oldukça dayanıklıdır. Bu nedenle doğrulama testlerinde, intestinal enterokoklar, *Clostridium perfringens* ve bakteriyofajlar gibi organizmalar için çeşitli analizlerin yapılması gerekir. Farklı tipte su kaynaklarında bulunan fekal indikatörler ve enterik patojenlerin buldukları yere göre maksimum ve minimum değerleri Çizelge 1.2’de, içme suyunda bulunan ve suyla taşınan protozoonlar ise Çizelge 1.3’de gösterilmiştir (Anonim, 2008; Kaya, 2011).

Çizelge 1.2. Farklı tipte su kaynaklarında (1 litrede) bulunan fekal indikatörlerin ve enterik patojenlerin sınır değerleri (WHO, 2008)

Patojen ya da enterik grup	Göller ve baraj gölleri	Yerleşim bölgelerindeki dere ve ırmaklar	Yerleşim bölgelerinden uzaktaki dere ve ırmaklar	Yeraltı suyu
<i>Campylobacter</i>	20 – 500	90 – 2500	0 – 1100	0 – 10
<i>Salmonella</i>	–	3 – 58000 (3 - 1000)	1 – 4	–
<i>E. coli</i>	10000-1000000	30000-1000000	6000 – 30000	0 – 1000
Virüsler	1 – 10	30 – 60	0 – 3	0 – 2
<i>Cryptosporidium</i>	4 – 29	2 – 480	2 - 240	0 – 1
<i>Giardia</i>	2 – 30	1 – 470	1 – 2	0 – 1

Çizelge 1.3. İçme suyu örneklerinde bulunan ve suyla taşınan patojenler (Anonim, 2008)

Patojen (protozoon)	Sağlığa etkisi (salgınlar)	Su ortamında (20°C) hayatta kalma süresi	pH: 7-8 iken standart dozda klora dayanıklılığı	Nispi bulaşıcı doz	Önemli hayvansal kaynak
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Yüksek	Değişen olabilir	< 1 dk.	> 10 ⁴	Yok
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Yüksek	1 aydan fazla	> 30 dk.	> 10⁴	Var
<i>Cyclospora cayatanensis</i>	Yüksek	1 aydan fazla	> 30 dk.	> 10 ⁴	Yok
<i>Entamoeba histolytica</i>	Yüksek	1 hafta ile 1 ay arası	> 30 dk.	> 10 ⁴	Yok
<i>Giardia intestinalis</i>	Yüksek	1 hafta ile bir ay arası	> 30 dk.	> 10 ⁴	Var
<i>Naegleria fowleri</i>	Yüksek	Değişken olabilir	Genellikle < 1 dk.	10 ² -10 ⁴	Yok
<i>Toxoplazma gondii</i>	Yüksek	1 aydan fazla	> 30 dk.	> 10 ⁴	Var

İnsan sağlığını olumsuz yönde etkileyen biyolojik ajanlar, su ve besim maddeleri ile vücuda alınıp, böbreklerde ve bağırsaklarda lokalize olarak dışkı ve idrarla dış ortama atılmaktadır (Yousefi, 1991; Aysal, 2004). Çevreye verilen parazit ookistleri içme ve kullanma suları, eğence amaçlı kullanılan sular aracılığıyla insanlara bulaşmaktadır. Su yolu ile yayılan ve hastalıklara neden olan parazitler arasında *C. parvum*, *G. intestinalis*, *E. histolytica* en önemlileridir (Bilgehan, 1990; Yousefi, 1991; Aysal 2004). Enfeksiyon; kirli ellerle, kirli besin ve suların ağız yoluyla alınması ile gerçekleşmektedir. Tüm canlılar tarafından kullanılan suyun emin ve güvenilir olması gerekmektedir (Aysal, 2004).

İçme-kullanma sularına uygulanan dezenfeksiyon işleminde, dezenfeksiyon dozu düşük tutularak yan ürünlerden kaynaklanan kirlenmenin önlenmesi sağlanır. İçme-kullanma sularına uygulanan dezenfeksiyonda klor kullanılması durumunda u noktalardan alınan numunelerde serbest klor miktarı 0.5 mg/L'den fazla olmamalıdır (Anonim, 2005; Demirel, 2014).

Paraziter enfeksiyonların yayılmasının önlenmesi için suyla geçen diğer patojenlere karşı uygulanan önlemlere ilave uygulamaların da yapılması gereklidir. Son yıllarda giderek önemini arttıran *Cryptosporidium* ookisti ve *Giardia* kistleri gibi paraziter etkenlerin ortamdaki uzaklaştırılmasında kimyasal koagülasyon, flokülasyon, sedimentasyon, filtrasyon gibi çoklu bariyer yöntemleri de uygulanmaya başlanmıştır. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda ozonun ve suların ultraviyole (UV) ile işlenmesinin, canlı *C. parvum* ookistlerini içeren su kaynaklarının dezenfeksiyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Ardıç, 2007; Kaya, 2011).

Bu çalışmada suyun hayatımızdaki önemi, su kirliliği ve su kirliliğin önlenmesi gibi nedenler dikkate alınarak; Samsun ve Giresun illerinden alınan su rneklelerinde *C. parvum*'un varlığının moleküler yöntemler kullanılarak (LAMP, IFA, PZR-RFLP, NESTED PZR) tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Su kirliliğine neden olan parazitlerin varlığını tespit etmek, bu kirliliğe karşı alınacak önlemlerin belirlenmesinde ilk aşamadır. Bu alışma sonucunda; Giresun ve Samsun illerinde ve çevrelerindeki ilçelerde mevcut su kaynaklarının ne oranda

su kökenli *C. parvum* ile kontamine olduğu tespit edilecek ve ona göre parazitin bulaşımı ve yayılmasını nleme amaçlı stratejik bir plan oluşturulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

İnsan ve hayvanlarda gastrointestinal hastalıklara neden olan *C. parvum*, 4-6 µm büyüklüğünde ve evrimini tek bir konakta tamamlayan zorunlu hücre içi bir protozoondur (Terzi, 2005). *Cryptosporidium* türlerinin etken olduğu hastalık kriptosporidiyoz olarak adlandırılmaktadır. Oral-fekal yolla bulaşan bu paraziter enfeksiyonun ortaya çıkması için, ookistlerin enfekte insan, hayvan ya da kontamine su ve yiyecekler aracılığıyla alınması gerekmektedir (Kaya, 2011). Diyare, karın ağrısı, bulantı, kusma ve kilo kaybı gibi belirtiler gösteren kriptosporidiyoz, bağışıklık sistemi bozulmuş kişilerde hayatı tehdit edebilir. *Cryptosporidium* türlerinin en önemli özelliği içme ve kullanma sularına uygulanan klorlama işlemine karşı dirençli olup nemli ortamda aylarca canlı kalabilmesidir. Bu nedenle su yoluyla meydana gelebilecek büyük salgınları oluşturma riski taşımaktadır (Lucio-Foster ve ark., 2004; Uyar ve Özkan, 2009).

2.1. *Cryptosporidium*'un Tarihçesi

Apicomplexa şubesinin Coccidia grubunda yer alan *Cryptosporidium* cinsi ilk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilerek “fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri” şeklinde tarif edilmiştir (Fayer ve Ungar, 1986; Current ve Garcia, 1991; Ok ve ark., 1995). Amerikalı parazitolog Ernest Edward Tyzzer de paraziti 1907 yılında laboratuvar faresinin gastrik kriptomlarında tespit etmiştir. Araştırmacı diğer Coccidia cinslerinden farklı olarak ookistlerinin içinde sporokistlerinin olmaması nedeniyle eski Yunancada “hidden sporocysts (saklı kist)” anlamında gelen *Cryptosporidium* olarak isimlendirmiştir (Casemore ve ark., 1985; Hashwey ve ark., 1997). Fare mide bez epitelindeki bu türe *Cryptosporidium muris* adlandırılmasında yine 1910 yılında Tyzzer tarafından yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarında da bu protozoonun seksüel ve aseksüel gelişimini açıklayarak ookistlerin dışkı ile dışarı atıldığını ve ookistlerin içindeki sporozoitlerin serbest halde olduğunu tespit etmiştir. İnsanlarda enfeksiyon yapan ve *C. muris*'inkinden daha küçük ookistlere sahip olan yeni türü ise 1912 yılında *C. parvum* olarak tanımlamış ve oluşturduğu hastalığa ise kriptosporidiyoz adını vermiştir (Fayer ve Ungar, 1986; Aysal, 2004; Xiao ve ark., 2004; Fayer, 2008; Fayer, 2010; Ekinci, 2012). Yine Tyzzer 1929 yılında tavukların bağırsak epitellerindeki paraziti *C.*

parvum olarak tanımlamıştır. Levine 1961 yılında bu türü *C. tyzerr* olarak değiştirilmiştir. Yaklaşık 20 sene sonra da bu yeni türün *C. meleagridis* ile aynı olduğu açıklanmıştır (Wittner ve ark., 1993; Fayer, 2008; Delioğlu, 2011).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise balık, sürüngen ve kuşlarda etkili olan *Cryptosporidium* türleri tespit edilmiştir (Current ve Bick, 1989; Sears ve Kirkpatrick, 2001). Slavin 1955 yılında 10-14 günlük hindi palazlarında şiddetli ishal ve ölüme neden olan *C. meleagridis*'i yeni bir tür olarak belirtmiştir. Bu türün hindilerde yaygın olarak ishale, nadir olarak da ölüme sebep olduğu belirtilmiştir (Starling ve Arrowood, 1993). Sığırlarda *Cryptosporidium* etkeninin diyareye neden olduğu 1970'lerin başında rapor edilmiştir Yapılan çalışmalar ile birlikte parazitin yapmış olduğu hastalığın önemi de ortaya çıkmıştır (Sears ve Kirkpatrick, 2001; Fayer, 2008).

Cryptosporidium ile ilgili ilk insan olgusu 1976 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) Washwille bölgesinde immun sistemi yeterli, kusma, ishal ve karın ağrısı şikayeti olan bir kız çocuğunda görülmüştür. Hastalığın akut ve kendini sınırlayan enterokolit şeklinde seyrettiği bildirilmiştir. Daha sonra başka bir olgu da immun sistemi baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide görülmüştür. Bu olgunun bir çiftlikte yaşayan hayvanlarda saptanan enfeksiyonla aynı zamanda ortaya çıkmış olması nedeniyle kriptosporidyozun bir zoonoz olabileceği belirtilmiştir. ABD'nde Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (AIDS) hastalarında parazite bağlı olarak gelişen ishal olgularının artması nedeniyle öneminin arttığı saptanmıştır (Slavin, 1955; Fayer ve Ungar, 1986; Current ve Bick, 1989; Current ve Garcia, 1991; Meisel ve ark., 1992).

AIDS'li hastalarda 1981-1982 yıllarında da görülen uzun süreli, sık sık bol sulu dışkı, zayıflama gibi belirtiler enfeksiyonun fırsatçı patojen olabileceğini düşündürmüştür. Normal bağışıklık sistemine sahip ve immun sistemi baskılanmış olan kişilerde hastalık oluşturabilen bu parazitin özellikle AIDS'li hastalarda şekillenen ishal olgularında izole edilmesinin ardından, 1982 yılında ABD'nde Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından AIDS'li hastalarda ishal nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda hayvan bakıcılarında, turistlerde ve bağışıklık sistemi sağlam

kişilerde de salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (Nime ve ark., 1976; Markel ve ark., 1986; Tzipori ve Ward, 2002; Çetinkaya, 2004; Özcel ve ark., 2007; Elgün, 2009).

Current ve ark., (1983), tarafından yapılan bir çalışmada da *Cryptosporidium*'un normal ve immünsüpresif kişilerde ishale neden olduğu bildirilmiştir. Yine Kuzey Amerika'nın Güney Milwaukee bölgesinde 1985 yılında kontamine içme suyundan kaynaklanan salgında 403 000 kişi enfeksiyona yakalandığı belirtilmiştir. Özellikle AIDS hastalarının etkilendiği salgınlar nedeniyle de parazit önemli epidemik karakter taşıyan hastalıklar gurubuna dâhil edilmiştir (Sears ve Kirkpatrick, 2001; Truong ve Ferrari, 2006; Fayer, 2008; Gündüz, 2012).

2.2. *Cryptosporidium*'un Taksonomisi

Cryptosporidium spp. Apicomplexa şubesi, Sporozoasida sınıfının, Coccidia alt sınıfı, Eucoccidiorida takımının, Cryptosporidiidae familyasında bulunan hücre içi bir parazittir. Parazitin taksonomideki yeri ilk kez 1911 yılında Leger tarafından belirlenmiştir (Dubey ve ark., 1990; Altıntaş, 2002). *Cryptosporidium* türlerinin 1986'da Fayer ve Ungar tarafından yayımlanan ve günümüzde de hala kabul edilen sınıflandırılması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma (Mehlhorn ve Piekarsk, 2002; Hazer, 2007).

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik özellikleri
Alem	Animalia	
Alt Alem	Protista	Ökaryotik, tek hücreli canlı
Şube	Apicomplexa	Mikrotübüllerden oluşan apikal kompleks yapıları vardır. Veziküler bir çekirdeğe sahip olup tüm türleri parazittir.
Sınıf	Sporozoa	Ookist oluşturma, seksüel ve aseksüel üreme, hücreye giren parazitin kayma kontraksiyon şeklinde hareketi gibi özellikleri vardır.
Alt Sınıf	Coccidia	Biyolojileri merogoni, gametogoni ve sporogoni şeklindedir. Seksüel faz hücre içinde gerçekleşir. Ergin gamontlar küçük olup yine hücre içindedir, çoğu vertebralılarda parazitlenir.
Takım	Eucoccidia	Merogoni vertebralı konakta geçer.
Alt Takım	Eimeriina	Makro ve mikro gamet oluşumu farklıdır. Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet gelişir. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet gelişir. Zigot hareketsiz olup konoid mevcuttur.
Aile	Cryptosporidiidae	Monoksen gelişim söz konusudur ve konak süreci hücrenin yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez, çıplak 4 sporozoiti vardır. Mikrogametleri flagella taşımaz.
Cins	<i>Cryptosporidium</i>	

Bu çizelgede; farklı konaklardan izole edilen *Cryptosporidium* türlerinin, ookist duvarı ve sporozoit antijenleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve türler arasında farklılıklar gösterilmiştir. Tyzzer'ın farelerde yaptığı çalışma sonucunda, büyük ookist yapısıyla mide paraziti olan *C. muris* ve küçük ookist yapısıyla bağırsak paraziti olan *C. parvum* olarak iki tür tanımlanmıştır (Tyzzer, 1912; Xiao ve ark., 2002).

İzole edildikleri konakçı göz önüne alınarak 1984 yılına kadar yapılan çalışmalarda balıklar, sürüngenler, kuşlar ve memelilerde *Cryptosporidium* türleri tanımlanmıştır. Upton ve Current 1985 yılında memelileri enfekte eden *C. parvum*

ve *C. Muris*'i, kuşları enfekte eden *C. baileyi* ve *C. meleagridis*'i geçerli türler olarak bildirmişlerdir (Aysal, 2004; Kaya 2011).

C. parvum'un memeli izolatlarının, pek çok açıdan *C. meleagridis* ve *C. saurophilum*'a benzediği ancak, bu etkenin reptil ve kuşlarda kolaylıkla enfeksiyon oluşturamadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde kuşlardan elde edilen *C. baileyi* ookistleri ve reptillerden elde edilen *C. serpentis* ookistlerinin, fare ve diğer laboratuvar hayvanlarını enfekte etme çalışmaları da başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Kedilerden ve kobaylardan elde edilen *Cryptosporidium* izolatları da laboratuvar hayvanlarını enfekte edememiş, bu nedenle de kedi izolatı *C. felis*, kobay izolatı ise *C. wrairi* olarak adlandırılmıştır (Xiao ve ark., 2000).

Cryptosporidium türlerinin; morfolojileri, konak özgüllükleri, konakta yerleşim yerleri ve son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler ile belirlenen moleküler özelliklerine dayanılarak günümüzde, 21 farklı *Cryptosporidium* türünün olduğu bildirilmiştir. Bu türler arasında balıklarda *C. nasorum*, kuşlarda *C. meleagridis* ve *C. baileyi*, reptillerde *C. serpentis* ve memelilerde *C. parvum* ve *C. muris* en tanınmış olanlarıdır (Tzipori ve Ward, 2002). Çizelge 2.2'de mevcut bilgiler ışığında saptanan türler ve yerleştiği konaklar verilmiştir.

Çizelge 2.2. Mevcut bilgiler ışığında saptanan türler ve yerleştiği konaklar (Fayer ve Ungar, 1986; Hazer, 2007)

Tür	Tür Araştırmacı -tarih	Konak
<i>C. muris</i>	Tyzzzer, 1907	Fare
<i>C. parvum</i>	Tyzzzer, 1912	Fare, İnsan
<i>C. crotali</i>	Triffit, 1925	Yılan
<i>C. vulpis</i>	Wetzel, 1938	Tilki
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	Hindi
<i>C. wrairi</i>	Vatterling Jervis, Merrill, Sprinz, 1961	Domuz
<i>C. tyzzeri</i>	Levine, 1961	Tavuk
<i>C. lampropeltis</i>	Anderson, Dusynski Marguardi, 1968	Kertenkele
<i>C. ctenosauris</i>	Dusynski, 1969	Kertenkele
<i>C. ameivae</i>	Peraza ve Bastarda, 1969	Kertenkele
<i>C. agni</i>	Barker ve Carbonell, 1974	Koyun
<i>C. bovis</i>	Barker ve Carbonell, 1974	Sığır
<i>C. anserinum</i>	Proctor ve Kemp, 1974	Kaz
<i>C. cuniculus</i>	İnman, Takeucki, 1979	Tavşan
<i>C. felis</i>	İseki, 1979	Evcil Kedi
<i>C. garnhami</i>	Bird, 1981	İnsan
<i>C. nasorum</i>	Levine, 1981	Balık
<i>C. hesi</i>	Levine, 1981	Maymun
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1981	Yılan
<i>C. baileyi</i>	Current, Upton ve Haynes, 1986	Tavuk

Günümüzde giderek önemini arttıran PZR-RFLP ve sekans analizi gibi moleküler teknikler de *Cryptosporidium*'un sınıflandırılmasının ve türlerinin ayrımında fayda sağladığı belirtilmiştir (Tzipori ve Ward, 2002; Ramirez ve ark., 2004). Yapılan çalışmalar insanda enfeksiyona neden olan *Cryptosporidium hominis* (önceden *C. parvum* tip I veya *C. parvum* insan genotipi olarak isimlendirilen) ve *C. parvum* (önceden *C. parvum* tip-II veya sığır genotipi olarak isimlendirilen) iki genotipinin olduğunu göstermiştir. *C. Hominis*'in yüksek konak adaptasyonu ve çok az genetik varyasyon gösterdiği, *C. parvum*'un ise geniş bir konak spektrumu olduğu ve birçok genotip içerdiği belirtilmiştir (Leav ve ark., 2003; Joachim, 2004; Fayer, 2004). Son zamanlarda yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları sayesinde konakçıları, yerleştiği organ ve ookistlerin morfolojik karakterleri ve gen bankasında 18S rRNA referans numaraları dikkate alınarak yapılan *Cryptosporidium*'un sınıflandırılması Çizelge 2.3'de verilmiştir (Plutzer, 2008).

Çizelge 2.3. *Cryptosporidium* türlerinin konakçıları, yerleştiği organ, ookistlerin morfolojik karakterleri ve 18S rRNA gen bölgesinin referans numaraları (Plutzer, 2008; Delioğlu,2011)

Türler	Büyük Konakçı	Enfeksiyon bölgesi	Ookist Büyüklüğü (µm)	Gen Bankasındaki Referans Numarası (18S rRNA)
<i>C. andersoni</i> (Lindsay ve ark., 2000)	Sığır, Deve	Bezli mide	5.5 × 7.4	AF093496
<i>C. baileyi</i> (Current ve ark., 1986)	Kümes hayvanları	Bursa	4.6 × 6.2	L19068
<i>C. bovis</i> (Fayer ve ark., 2005)	Sığır	İnce bağırsak	4.7-5.3 × 4.2-4.8	AY741305
<i>C. canis</i> (Fayer ve ark., 2001)	Köpekler	İnce bağırsak	4.5 × 4.7	AF112576
<i>C. fayeri</i> (Ryan ve ark., 2008)	Kızıl Kanguru	İnce bağırsak	4.5 × 5.1	AF159112 AF112570
<i>C. felis</i> (Iseki, 1979)	Kediler	İnce bağırsak	4.5 × 5.0	AF108862
<i>C. galli</i> (Pavlassek, 1999)	İspinoz	Bezli mide	8.25 × 6.3	AF316624 AY168847
<i>C. hominis</i> (Morgan-Ryan ve ark., 2002)	İnsan	Kalın bağırsak	4.5 × 5.5	AF108865
<i>C. meleagridis</i> (Slavin, 1955)	Hindi, İnsan	Kalın bağırsak	4.5-4.0 × 4.6-5.2	AF112574
<i>C. molnari</i> (Alvarez-Pellitero ve Sitja-Bobadilla, 2002)	Balık	Mide (ve bağırsak)	4.7 × 4.5	AY524773
<i>C. muris</i> (Tyzzer, 1907)	Kemirgenler	Mide	5.6 × 7.4	AB089284
<i>C. parvum</i> (Tyzzer, 1912)	Sığır, Çiftlik hayvanları, İnsan	İnce bağırsak	4.5 × 5.5	AF112571
<i>C. saurophilum</i> (Koudela ve Modry, 1998)	Kertenkele, Yılan	Mide ve ince bağırsak	4.2-5.2 × 4.4-5.6	AF112573
<i>C. scophthalmi</i> (Alvarez-Pellitero ve ark., 2004)	Balık	Bağırsak (ve mide)	3.7-5.0 × 3.0-4.7	Veri yok
<i>C. serpentis</i> (Levine, 1980)	Kertenkele, Yılan	Mide	5.6-6.6 × 4.8-5.6	AF151376
<i>C. suis</i> (Ryan ve ark., 2004a)	Domuz	İnce	4.9-4.4 × 4.0-4.3	AF115377
<i>C. wrairi</i> (Vetterling ve ark., 1971)	Kobay	İnce bağırsak	4.9-5.0 × 4.8-5.6	AF115378

2.3. *Cryptosporidium*'un Moleküler Yapısı ve Genotipleri

Cryptosporidium türlerine ait ookistlerin yapısında, kromozom büyüklüğü 0.9-1.4 Mb arasında değişen 8 kromozom bulunmaktadır. Genomun A+T içeriği %60-70 arasında değişmekte olup, toplam genom uzunlukları *C. parvum*'da 9.11 Mb ve *C. hominis*'te 9.16 Mb olduğu bilinmektedir (Piper ve ark., 1998). Kromozom üzerinde bulunan gen sayıları türler arasında farklılıklar göstermektedir. Örneğin; *C. hominis*'te 3 994, *C. parvum*'da 3 952 gen olduğu düşünülmektedir (Gold ve ark., 1995; Thompson ve ark., 2005; Üner ve ark., 2007; Kissinger, 2008). Genomun G+C oranı ise *C. parvum*'da %30.3 iken, *C. hominis*'te %31.7'dir. Genlerin %5-20'sinde intron yoktur. *C. parvum*'da kodlanmayan bölge büyüklüğü 2.32 iken, *C. hominis*'de 2.87'dir (Abrahamsen ve ark., 2004; Xu ve ark., 2004).

C. parvum ve *C. hominis* türleri incelendiğinde genom uzunluğundaki değişikliklere rağmen genomlarının %97 oranında aynı olduğu ve türleri arasındaki fenotipik farklılıkların genler arasındaki çok küçük değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki türde de 4-5 adet tRNA, 6 adet 5S rRNA ve 5 adet 5.8S, 18S ve 28S RNA genleri bulunmaktadır. *Cryptosporidium*'un bazı türlerinde, Apicomplexa grubu parazitlerde bulunan mitokondri veya plastid organelleri *C. parvum*'da görülmemektedir (Le Blancq ve ark., 1997; Taqhi-Kilani ve ark., 1994; Üner ve ark., 2007).

Homolog makro moleküllerin nükleotid ve amino asit dizisinde meydana gelen farklılıklar türler arasındaki evrimsel uzaklıkların ölçülmesini sağlamaktadır. Ribozomal RNA'lar, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içermeleri nedeniyle, türler arasındaki varyasyonların belirlenmesinde en çok kullanılan molekül olduğu bilinmektedir. Prokaryotlarda büyüklükleri 5S, 16S ve 23S olan üç çeşit ribozomal RNA molekülü bulunmaktadır. Eukaryotlarda ise dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü üzerinde odaklanmıştır. 16S ve 18S rRNA'ları ribozomun küçük alt biriminin (30S veya 40S) bir parçası olduklarından, SSU (küçük alt birim) dizilemesi kısaltması, 16S veya 18S dizilemesi ile eş anlama gelmektedir. Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji

ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu rutin hale gelmiştir (Madigan ve ark., 1997; Üner ve ark., 2007).

Uluslararası kaynaklarda yayınlanan *Cryptosporidium* spp.'nin genotipleri Çizelge 2.4'de verilmiştir. *Cryptosporidium* spp. alt türlerinin belirlenmesi için son zamanlarda yapılan moleküler taksonomik çalışmalarda *Cryptosporidium* genotipleri 18S rRNA'daki ve 70 kDa heat shock protein genindeki farklılıklar esas alınmıştır (Plutzer, 2008).

Çizelge 2.4. *Cryptosporidium* genotipleri (Plutzer, 2008; Delioğlu, 2011).

Genotip Adı (Diğer Konakçısı)	Referans	Gen Bankası Erişim Numarası (18SrRNA)
Ayı genotipi (siyah ayı)	Xiao ve ark., 2000a	AF247535
Kunduz genotipi	Feng ve ark., 2007a	EF641022
<i>C. andersoni</i> 'ye benzer genotip (vahşi yak ve sığır) aşağıdakileri buna göre değiştirilim	Karanis ve ark., 2007a Nagano ve ark., 2007	EF613341
<i>C. bovis</i> 'ye benzer genotip 1 (sheep)	Santin ve ark., 2007	EF362478-81
<i>C. bovis</i> 'ye benzer genotip 2 (yak, keçi)	Feng ve ark., 2007b Karanis ve ark., 2007a	DQ871346
<i>C. muris</i> 'ye benzer (Japon tarla faresi)	Hikosaka ve Nakai, 2005	AY642591
Geyik genotip 1 (blesbok, nyala)		
Geyik, koyun, lemur, muflon, sincap, çizgili sincap, kunduz, dağ sıçanı, geyik fare, rakun, insan)	da Silva ve ark., 2003	AF442484
Geyik genotip 2 (dağ keçisinin)	Feltus ve ark., 2006 Xiao ve ark., 2000b	DQ640639
Çizgili sincap genotip 1 (sincap, geyik, fare)	Feng ve ark., 2007a	EF641026
Çizgili sincap genotip 2	Feng ve ark., 2007a	EU096238
Çakal genotip	Xiao ve ark., 2002	AY120909
Geyik genotip	Xiao ve ark., 2002	AY120910
Geyik-benzer genotip (sığır)	Santin ve ark., 2004	AY587166
Geyik fare genotip 1	Xiao ve ark., 2002	AY120905
Geyik fare genotip 2	Feng ve ark., 2007a	EF641027
Geyik fare genotip 3 (sincap)	Feng ve ark., 2007a	EF641014
Geyik fare genotip 4	Feng ve ark., 2007a	EF641019
Morgan ve ark., 2001	Morgan ve ark., 2001	AF316630
Ördek genotip 2 (Kanada kazları)	Zhou ve ark., 2004b	AY504514
Ermin genotip 1	Xiao ve ark., 2000b Feng ve ark., 2007a	AF262331
Dağ gelinciği genotip	Xiao ve ark., 1999a	AF112572
Dağ gelinciği-benzer genotip (Su samuru)	Gaydos ve ark., 2007	DQ288166
Tilki genotip 1	Xiao ve ark., 2002	AY120907
Tilki genotip 2	Xiao ve ark., 2002	AY120908
Keçi genotip (<i>Capra hircus</i>)	Karanis ve ark., 2007a	EF613339
Kaz genotip 1 (Kanada kazları)	Xiao ve ark., 2002	AY120912
Goose genotip 2 (Kanada kazları)	Zhou ve ark., 2004b	AY504512
Kaz genotip 3 (Kanada kazları)	Zhou ve ark., 2004b	AY504513
Goose genotip 4 (Kanada kazları)	Jellison ve ark., 2004	AY324638
Kaz genotip 5 (Kanada kazları)	Jellison ve ark., 2004	AY324641
At genotip (Prezewalski atı)	Ryan ve ark., 2003a	AY273770
Kertenkele genotip	Xiao ve ark., 1999a	Veri yok
Keseli memeli genotip 1	Morgan ve ark., 1999b	AF108860
Keseli memeli genotip 2 (Doğu gri kangru)	Power ve ark., 2004	AF513227
Vizon genotip	Feng ve ark., 2007a	EF641015
Firavun faresi genotip	Abe ve ark., 2004	AB102769
Maymun genotip	Xiao ve ark., 1999a	AF112569
Fare genotip 1 (Sıçan)	Xiao ve ark., 1999a	AF112571
Fare genotip 2 (Vahşi Avustralya faresi)	Foo ve ark., 2007	EF546483
Misk sıçanı genotip 1 (misk sıçanı, tarla faresi)	Xiao ve ark., 2002	AY120904
Misk sıçanı genotip 2 (tilki, tarla faresi)	Zhou ve ark., 2004a	AY545547
Keseli sıçan genotip 1	Xiao ve ark., 2002	AY120902
Keseli sıçan genotip 2	Xiao ve ark., 2000b	AF262334
Devekuşu genotip	Meireles ve ark., 2006	DQ002931
Domuz genotip	Ryan ve ark., 2003c	AY271721
Tavşan genotip	Xiao ve ark., 2002	AY120901
Koyun genotip	Ryan ve ark., 2005b	AY898790
Kır faresi genotip (wildebeest)	Jiang ve ark., 2005b Feng ve ark., 2007a	EF641010
Kokarca genotip (raccoon, sincap, keseli sıçan, nehir samuru)	Xiao ve ark., 2002	AY120903
Yılan genotip	Xiao ve ark., 1999b	AF093499
Çizgili sincap genotip	Atwill ve ark., 2004	AY462232
Kaplumbağa genotip(yıldız kap.)	Xiao ve ark., 2002	AY120914
Tarla faresi genotip	Jiang ve ark., 2005b Feng ve ark., 2007a	EF641020
Çulluk genotip (Avrasya çulluğu)	Ryan ve ark., 2003a	AY273769

Kriptosporidiyozun, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği ile belirlenebilmesi için hsp 70 mRNA geni (70-kDa ısı şok proteini) (Di Giovanni ve ark., 1999), 18s SSU rRNA geni (ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge) (Xiao ve ark., 1999), β tubulin kodlayan mRNA geni (Widmer ve ark., 1999), amyloglikosidoz enzimini kodlayan mRNA geni (Jenkins ve ark., 2000), methionin aminopeptidaz, T-kompleks protein 1 delta (TCP-1) içeren chaperonin kodlayan genler (Wu ve ark., 2004), COWP (*Cryptosporidium* ookist duvar proteini), TRAP-C1 (trombospondin adhesive proteini *Cryptosporidium*-1), TRAP-C2 (*Cryptosporidium*-2 geninin Thrombospondin adhesive proteini) genleri sık kullanılan molekülledendir (Pedroza-Diaz ve ark., 2001).

Duyarlılık açısından en yaygın gen bölgelerinin, Nested PZR tekniğinde kullanılan ve genomda tek kopyası bulunan dihidrofolat redüktaz enziminin kodlayan gen ile genomda 5 kopyası bulunan 18S rDNA geni olduğu bildirilmiştir (Pedroza-Diaz ve ark., 2001). Ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) bölgeleri COWP, dihidrofolat redüktaz-timidilat sentaz (dhfr-ts), TRAP-C1, TRAP-C2 ve HSP70 gibi genlerin sekans analizi, RFLP analizi gibi yöntemler de *Cryptosporidium* türlerinin ayırımında en sık kullanılan yöntemlerdir (Tzipori ve Ward, 2002; Ramiez ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalarla, izole edilen parazit türlerinin konağa göre uyum kazanmış genotiplerinin bulunduğu belirlenmiştir. Memeliler açısından en önemli tür olan *C. parvum*'un insan, sığır, fare, gelincik, ayı ve domuz genotiplerindeki farklılıklar bu duruma örnek olarak gösterilebilmektedir. Arbitrary Primed-PZR (AP-PZR) yöntemiyle yapılan araştırmalar, *C. parvum*'un insan ve sığır serotiplerini kanıtlamaktadır. İnsanlarda görülen su, yiyecek veya bazı faktörlerden kaynaklanan salgınlarda yapılan çalışmalar, *C. parvum*'un hem sığır, hem de insan genotipinin bulunduğunu göstermiştir (Xiao ve ark., 1998; Xiao ve ark., 2000; Fayer, 2000).

2.4. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

İnsan ve hayvanlarda sindirim ve solunum yolu epitel hücrelerinin mikrovillus bölgesine yerleşerek bu bölgelerde enfeksiyon oluşturan *C. parvum* yerleşim yeri nedeniyle diğer hücre içi parazitlerden ayrılabilir. Çünkü diğer hücre içi parazit

türleri hücrenin sitoplazması içinde yerleşim gösterirken, *C. parvum* hücrenin ekstrastoplazmik alanında yerleşir ve birbirini izleyen eşeyli ve eşeysiz üremeyle çoğaldığı bilinmektedir (Saygı, 1998; Delioğlu, 2011).

Dışkı ile dışarı atılan ookistler 2-6 µm çapında, kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde dört sporozoit bulunmaktadır. Diğer koksidian parazitlerden farklı olarak ookistlerinin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistleri bulunmamaktadır (*Cryptosporidium*=gizli sporokist). Sporozoit formları 4.9x1.2 µm çapındadır. Sporozoitlerden oluşan trofozoitler ise 2-2.5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapılardır (Hammes ve ark., 2006; Fayer ve ark., 2008)

Parazitin yerleştiği ve konak hücre orjinli bölgeye parazitoforoz vaküol denir. *C. parvum*'un yaşam siklusu tek bir konakta altı gelişim evresi halinde gerçekleşmektedir. Bu gelişim evreleri; eksitasyon, merogoni, gametogoni, fertilizasyon, ookist dönemi ve sporogoni olarak tanımlanmaktadır (Current ve Bick, 1989; Saygı, 1998; Ungar, 1995; Spano ve Crisanti, 2000).

2.4.1. Ekskistasyon (Kistlerin açılması)

Parazitin enfekte konağın dışkıları ile dışarı atılan formu, sporlanmış ve enfektivite kazanmış ookist şeklindedir. Bu ookistler, 2-6 µm çapında, kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde dört sporozoit bulunmaktadır. Ookistler yiyecek, içecek veya bazı diğer çevresel etmenler aracılığıyla oral yoldan, konjunktiva aracılığıyla veya solunum yoluyla alınabilmektedirler (Starling ve Arrowood, 1993).

Sindirim yoluyla konak hücre tarafından alınan ookistlerin normal şartlarda ince bağırsakta açılması “eksitasyon” olarak adlandırılmaktadır. Kist açılımında rol oynayan faktörler arasında pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik indirgeyici etmenler sayılabilirler (Starling ve Arrowood, 1993; Sears ve Kirkpatrick, 2001). Ağız aracılığıyla alınan kalın duvarlı ookistler uygun konakların sindirim yolunda açılır, ookist içerisindeki hareketli sporozoitler serbest kalır ve bağırsak lümenine dökülürler (Ungar, 1995; Robin ve Petry, 1999).

Konak hücre içinde gerçekleşen ekskistasyona benzer kist açılımı, bazı uygun şartlar altında dış ortamda da gerçekleşebilmektedir. Örneğin, 37°C musluk

suyunda veya herhangi bir şekilde 37°C'ye maruz bırakılan ookitlerin, derişik çamaşır suyuna alındığında ekskiste edildiği gözlenmiştir. Bu durumda kistlerin açılmasına sebep olan faktörün ozmotik stres olduğu düşünölmektedir. Bu deney sayesinde safra tuzlarının tek başına kistlerin açılımını uyardığı, total safra salgısının da, özellikle ookistlerin zayıf hipoklorit solüsyonu gibi oksidatif ajanlara maruz kalmasından sonra ekskistasyonu sağladığı anlaşılmıştır. Bir başka deneyde ise araştırmacılar, 4-23°C'lik bir ortamda bir gece bekletilen ookistlerin 37°C'deki fosfat buffer tuz solüsyonunda bekletildikten sonra açıldığını tespit etmişlerdir (Starling ve Arrowood, 1993).

2.4.2. Merogoni (Asexüel çoğalma)

Konağın sindirim yolunda serbest kalan sporozoitlerin her biri apikal oluşumlarının yardımıyla konağın bağırsak epitel hücreleri (enterositler) içine girerek epitel hücrelerin mikrovillus bölgesinde (parazitoforoz vaküol içerisinde) trofozoit (tek nükleuslu meront) formuna dönüşmektedirler (Ok ve Balcıoğlu, 2007). Sporozoitlerin bağırsakta tutunma yeri jejunumun sonu ve ileum olup, buna ek olarak da pankreatik kanallar, safra kanalı ve solunum sistemine de yerleşebilmektedirler. Sporozoitler 4.9x 1.2 µm çapında olup çekirdekleri 1/3 arka kısmındadır, duvarı ise 50 nm kalınlığında düz ve renksiz yapıdadır. Sporozoitlerden oluşan trofozoitler ise 2-2.5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapılar olup ribozomal endoplazmik retikuluma gereksinim duymaktadırlar (Saygı, 1998; Yetkin, 1998).

Apikal kompleks tam olarak farklılaşmamış halde olup, trofozoitler olgunlaşınca kaybolur ve ribozomal endoplazmik retikulum meydana gelmektedir. Konak hücre içerisinde beslenen, büyüyen trofozoit şizogoni ile çoğalarak 6-8 merozoit meydana getirmektedir. Merozoitleri taşıyan hücreye tip-I meront (şizont) denilmektedir. Özellikle immünsüpresif hastalarda, tip-I meront oluşumunun sürekli tekrarı söz konusu olabilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Tip-I merontların parçalanmasıyla serbest hale geçen merozoitler diğer hücrelere girerek yeni bir şizogoniyi başlatırlar ve tip-I veya tip-II merontlara dönüşmektedirler. Şizogoni sonrasında tip-II meront içerisinde 4 merozoit meydana gelmektedir. Tip-II merontlardan oluşan merozoitler yeni hücreleri

enfekte eder ve gametogoninin oluşmasında rol oynamaktadırlar (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

2.4.3. Gametogoni

Şizogoni sonucunda tip-II merontların içinde oluşan 4 merozoit, hücre parçalanınca serbest kalarak yeni konak hücrelerine yerleşerek eşeyli üreme fazı olan gametogoniyi başlatmaktadırlar. Gametogoni ile birlikte bu merozoitler, mikro veya makro gametositlere, daha sonra da mikro ve makrogametlere dönüşmektedirler (Ok ve ark., 1995; Saygı, 1998; Topçu ve ark., 2002). Her bir mikrogamonttan kamçısı bulunmayan 16 tane mikrogamet ve her bir makrogamonttan ise yalnızca bir makrogamet meydana gelmektedir (Özer, 1990; Ungar, 1995; Erdoğan, 2003).

2.4.4. Fertilizasyon

Yaşam döngüsünün dördüncü evresinde, bağırsak lümeninde serbest olarak bulunan 0.4-0.5 µm büyüklüğünde ve ince yapılı kamçısız mikrogametlerden birisinin, 4-6 µm büyüklüğündeki makrogameti döllemesi sonucunda zigot oluşmaktadır (Current ve Bick, 1989; Mark ve ark., 1999; Erdoğan, 2003).

2.4.5. Ookist dönemi

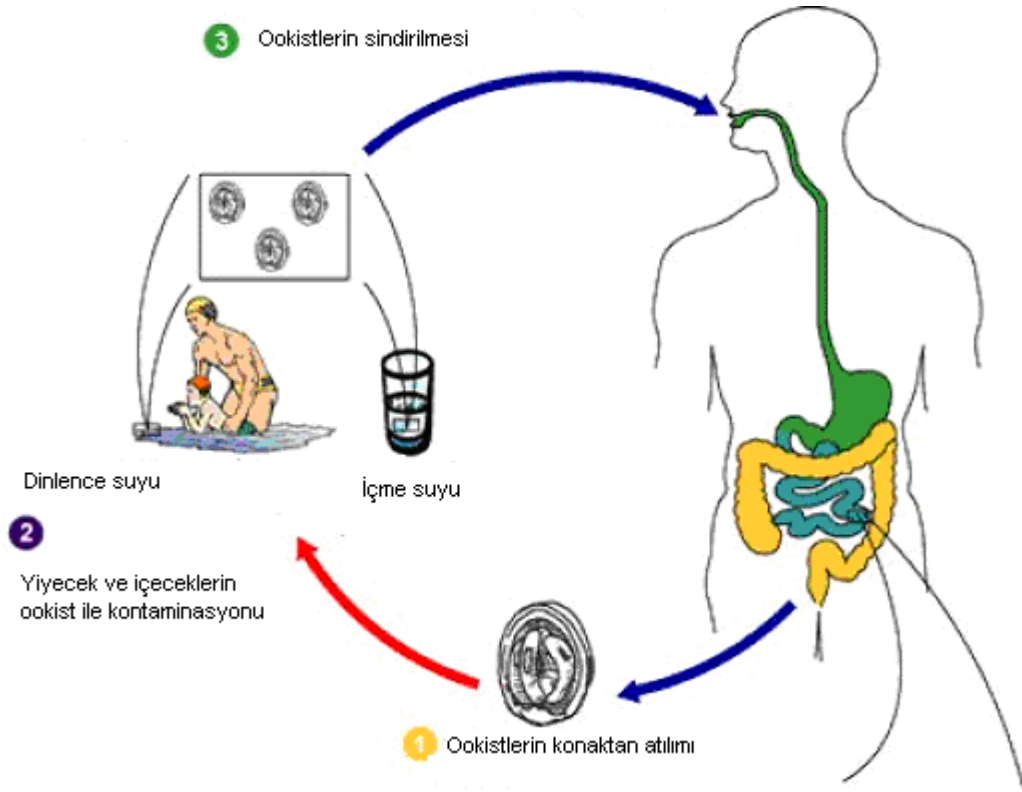
Bu dönemde zigotun etrafı iki veya üç farklı tabakanın birleşmesinden oluşan ookist duvarıyla çevrili hale gelmektedir. Parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayacak olan ookistleri oluşturmak için zigotun etrafındaki duvar kalınlaşmaktadır (Ok ve ark., 1995). *C. parvum*'un ookist duvarı üzerinde, ookistin yarısını veya üçte birini saran şerit şeklinde bir yapının mevcut olması, ookistin elektron mikroskopunda ayırt edilmesini sağlayan en önemli özelliklerinden birisi olduğu bilinmektedir. Ookist duvarı kimyasal ve mekanik etkilere karşı dirençli bir yapıdadır. Duvarın dış tabakası asidik özellikte glikoprotein filamentleriyle kaplıdır. Orta kısımda mikobakteriyel lipidler ve balmumu benzeri sert yapılı kompleks lipit tabakası içermektedir. İç tabakası ise yine glikoproteinlerden oluşmaktadır. Hücre duvarında yüksek oranda lipid olması, karbol fuksin ile boyandıktan sonra asit-alkol dekolorizasyon işleminden etkilenmemesini sağlamaktadır (Robin ve Petry, 1999; Mark ve ark., 1999).

2.4.6. Sporogoni

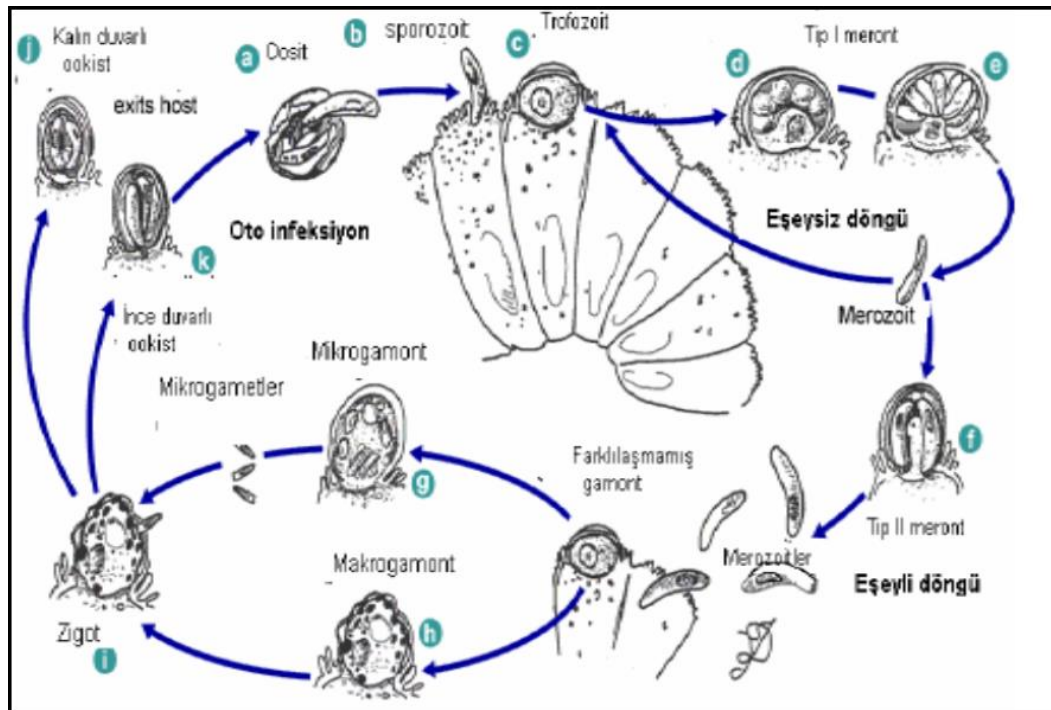
Ookist dönemini takip eden süreçte konağın gastrointestinal sisteminde olgunlaşan ookistlerin içinde sporlanma ile enfekte özelliği kazanmış sporozoitler oluşmaktadır. *C. parvum*'un eseyli üremesi sonucunda yaklaşık %80'i kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlı bir yapı gösteren 2 farklı tip ookist oluşumu gözlenmektedir (Dubey ve ark., 1990; Ok ve ark., 1995). İnce çeperli ookistler içinde 4 sporozoit bulunur ve konak vücudu dışına çıkmadan, bağırsak boşluğuna atılıp bağırsak içinde açılmaktadır. Bu ookistlerin içlerinde bulunan sporozoitler serbest kalarak yeni epitel hücrelerine girerek konakta enfeksiyonun devamını sağlamaktadırlar. Bu tip bulaş şekli yuvarlak solucanlardan *Strongyloides stercoralis*'in evriminde görülen duruma benzetilerek "iç oto enfeksiyon" adını almaktadır (Saygı, 1998; Topçu ve ark., 2002; Köktürk, 2002).

Kalın çeperli yapıya sahip 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışkı ile dışarıya atılarak enfeksiyonun bir konaktan diğerine bulaşmasında rol almaktadırlar (Dubey ve ark., 1990; Starling ve Arrowood, 1993; Unat ve ark., 1995). Bulaşma fekal-oral yolla, ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir. Bu kistler çevre ve iklim koşullarına uzun süre dayanıklı yapıdadır (Saygı, 1998; Fayer ve ark., 2000; Köktürk, 2002; Terzi, 2005).

Vücuda ookist alındıktan sonra dışkıda ookistlerin görülmeye başlama süresi konağa göre değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalara göre enfeksiyonun görülme süresi insanlarda 5-21, sığırlarda 2-7, kedilerde 5-10, köpeklerde 2-14 gün, domuzlarda 3-6 gün ve kuzularda 2-5 gün kadar olduğu bildirilmiştir (Dubey ve ark., 1990, Unat ve ark.,1995). *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsü ve ookistlerine gelişim evreleri Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *Crptosporidium*'un yaşam döngüsü (Goldoft ve Todd, 2008)



Şekil 2.2. *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri (Delioğlu, 2011)

2.5. Kriptosporidiyoz

Cryptosporidium türlerinin etken olduğu kriptosporidiyoz, zoonoz bir hastalıktır. Bu enfeksiyon ile ilgili patolojik bilgiler, canlılarda biyopsi ve ölenlerde otopsi bulguları şeklinde elde edilmiştir. Yapılan histopatolojik çalışmalar, bu etkenin sindirim kanalının hemen her bölgesinde yerleşebileceğini, ancak en ağır enfeksiyonun ince bağırsağın distal kısmına (ileum) ve proksimal kısımlarına (jejunum ve duodenum) yerleşmesi durumunda görülebileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde mide, duodenum, kolon, bilier ve pankreatik kanallar ve solunum sisteminde yerleşmesi durumunda hastalığa sebep olmaktadır (Fayer ve Ungar, 1986; Ungar, 1995; Saygı, 1998; Topçu ve ark., 2002).

Hastalık bağırsaklarda diyare, akciğerlerde ise solunum sistemi bozuklukları halinde şekillenmektedir. Ağır enfeksiyona tutulan hastaların ince bağırsak villuslarında atrofi ve körleşme, kriptlerin boyunda uzama gözlenirken, plazma hücrelerinin ve lenfositlerin lamina propria infiltrasyonu söz konusudur (Clayton ve ark., 1994; Graaf ve ark., 1999).

Enfeksiyonun kan yoluyla yayılımı kanıtlanamamış, ancak mukoza boyunca yayılım olduğu düşünülmektedir. Otuzdan az sayıda ookistin bile sağlıklı gönüllülerde enfeksiyona neden olduğu bulunmuş olup, ortalama infeksiyöz doz 132 ookisttir (Özcan, 1998; Willson, 2004; Özcel ve ark., 2007; Tünger ve Tünger, 2007).

Cryptosporidium enfeksiyonlarında hastalığın oluşum mekanizması tam anlamıyla açıklanabilmiş değildir. *C. parvum* primer olarak intestinal sisteme yerleştiğinden, en sık rastlanan belirti diyaredir. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının patogenezi parazitlerin epitel hücrelerin mikrovilluslarının fırçası kenarlarına tutunarak bağırsak mukozasının fonksiyonlarını bozmasıyla başlamaktadır (Gül ve Özdemir, 1990; Ekinci, 2012). İnce bağırsak villuslarını kaplayan ve emilimi sağlayan enterositler; kalın ve ince cidarlı ookistlerden eksik olan sporozoitler ve sporogoni sonucu oluşan merozoitler tarafından istila edilmektedir (Clark, 1999; Fahey, 2003). Bunun sonucu hızlı bir epitel hücre ölümü ile sonuçlanan mukoza zedelenmesi meydana gelmektedir. Yıkılan epitel hücrelerin yenilenebilmesi

için kript hücre hiperplazisi ve lamina propriada yangı hücre infiltrasyonu uyarılmakta ve bu durum diyareye neden olmaktadır (Clark, 1999). Enfekte epitel hücrelerinden sitokinler (TNF- α , IL1, IL8) salgılanarak enflamatuvar ve bağışıklık sistemi hücreleri bu bölgede toplanmaktadır. Epitel hücrelerinden prostoglandinler (PGE2), enflamasyon hücrelerinden substance P gibi nöropeptidler salınması sonucunda Na⁺ emiliminde azalma, epitelyal permeabilitesinde ve Cl⁻ sekresyonunda artış nedeniyle diyare meydana gelmektedir. Enfeksiyon sonucunda patolojik olarak villus atrofi, villuslarda birleşme, kript hiperplazisi, mikrovilluslarda bozulma, yangısal hücre infiltrasyonu şekillenmektedir. Tüm bu değişiklikler bağırsak yüzey kısımlarında hasara, beslenme bozukluğuna, enzim kayıplarına ve elektrolit transportunda bozulmalara sonuç olarak da malabsorpsiyona (kötü emilim, barsakta emilimin iyi olmaması) ve sıvı sekresyonunda artışa neden olmaktadır (Tzipori ve Ward, 2002; O'Handley ve Olson, 2006; Fayer, 2008; Santin ve Trout, 2008; Wyatt ve ark., 2010). Sonuç olarak, *Cryptosporidium* enfeksiyonunda mukozal bariyer bozukluğu oluşmakta ve bunun sonucunda da makromoleküllerin permabilitesi artış göstermektedir. Permabilite artışına bağlı olarak bağırsak epiteli içerisinde bulunan iyonlar ve su tekrar bağırsak lümenine atılmakta ve lümen içi sıvı miktarında artış yaşanmaktadır. Bazı kriptosporidiyoz vakalarında, kolera ve diğer enterotoksijenik mikroorganizmalarda görülen ishale benzer bol miktarda sulu ishal tablosu gözlenmektedir (Clayton ve ark., 1994; Yetkin, 1998).

2.6. Klinik Bulgular

Kriptosporidiyozun dikkat çeken en önemli klinik semptomu, yeni doğanlarda ve immun yetmezlikli hastalarda görülen ishaldir. İnsanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun oluşması için 10 ookistin alımının yeterli olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyonun şiddetini belirleyen en önemli faktör hastanın immünesidir. Bu nedenle klinik olarak iki ana semptom çerçevesinde incelenmektedir (Laberger ve Griffiths, 1996; Usluca, 2009).

İmmün yeterli bireylerde ortalama 2-14 günlük inkübasyon periyodu ve hastalığın seyirinde kendi kendine iyileşen diyare gözlenmektedir. Semptomların süresi ve şiddeti ookist atılımının yoğunluğuna ve parazitin yerleşim yerine göre değişiklik

göstermektedir. İnce bağırsağın üst kısımlarında lokalize olması halinde daha şiddetli ve sulu ishal görülmektedir. Distal kısımda veya kalın bağırsaktaki tutulumlar aralıklı ve hafif ishale sebep olabilir ya da klinik belirti göstermeyebilir. Dışkının karakteristik olarak sulu, büyük miktarda, mukuslu olabilen ancak kan ve lökosit içermeyen bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. Olguların %60-96'sında karın ağrısı, %49-65'inde kusma, %36-59'unda 39°C'yi geçmeyen hafif ateş ve %35'inde bulantı şikayetlerinin saptandığı tespit edilmiştir (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

İmmün yetmezlikli hastalarda ise benzer gastrointestinal semptomlar bildirilmekte ve enfeksiyon kısa süreli ishalden, kronik, yaşamı tehdit eden kolera benzeri ishal tablosuna kadar değişebilmektedir. Özellikle AIDS, kızamık gibi viral hastalıklarda, lösemi, gamaglobulinemiler, insüline bağımlı diyabet, böbrek yetmezliği, karaciğer transplantasyonu ve kanser tedavisi gören hastalarda semptomlar şiddetlidir. Bu tip hastalarda, hayatı tehdit eden boyutlarda ishal görülebilmektedir (Sears ve Kirkpatrick, 2001; Fahey, 2003). Sıvı kaybı oldukça fazla olup, günde 3-6 litre arasında değişerek bazı hastalarda günde 17 litreye kadar çıkabilmektedir. Bu durumdaki hastalar günde 50 kez bile dışkılamaya çıkabilmektedir. Bu hastalarda ishal 2 aydan uzun sürmekte ve tüm enfeksiyon sürecinde önemli düzeyde kilo kaybı, şiddetli dehidrasyon, kolanjit, pankreatit, sklerozan kolanjit ve karaciğer sirozu gibi ağır klinik belirtiler görülebilmektedir. Ayrıca, AIDS'li hastalarda kan CD4 T lenfosit düzeyindeki aşırı düşmeye bağlı olarak, gastrointestinal sistem dışında solunum sistemine ve diğer sistemlere yönelik belirtilerde görülebilmekte ve hatta ölüme neden olabilmektedir (Dupont ve ark., 1996). Safra kesesi ve safra kanallarının tutulumunda sağ üst kadranda ağrısı, bulantı, kusma, ishal, ateş, sarılık görülmektedir. Pankreas kanalının tutulumu durumunda pankreatit, pankreasta büyüme ve asit bildirilmiştir. Solunum yollarının tutulması durumunda öksürük, hırıltılı solunum, akut laringotrakeit görülebilmektedir (Current ve Garcia, 1991).

AIDS hastalarında CD4 sayısı 180 hücre/mm³ üzerinde ise enfeksiyonun daha hafif seyrettiği, bu sayının altında olması durumunda enfeksiyonun daha şiddetli olduğu ve süresinin uzadığı bildirilmektedir. Bu hastalarda immün sistemi

baskılayan durumun ortadan kaldırılması ile tedavi sağlanabildiği bildirilmektedir (De-Graaf, 1999; Thompson ve ark., 2005).

2.7. İmmünolojik ve Antijenik Yapı

Cryptosporidium'un infektivitesi ve konağın immun cevabı parazitin patofiyolojisinin açıklanmasında rol oynamaktadır. Bu enfeksiyonlara karşı korunmada hem humoral, hem de hücrel immunitenin rol oynadığı bilinmektedir. *C. parvum*, yüzeysel epitel hücrelerine yerleştiği için “minimal invaziv mukozal patojen” olarak kabul edilmektedir. Doğal immun cevapta enterositler aktive olur, proinflamatuvar sitokinler ve defensinler gibi antimikrobiyal peptitler oluşmaktadır. Bu durum başlangıçta parazit sayısının azalmasını sağlasa da enfeksiyonun tamamen temizlenebilmesi için T hücre cevabı gerekmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

Enfeksiyona karşı oluşan ilk immun yanıt, T-lenfosit hücrelerinin artışına bağlı olarak ortaya çıkan bağırsak yangısı şeklindedir. Ayrıca enfeksiyonun önlenmesinde veya iyileşmesinde İnterlökün-12 (IL-12), ve İnterferon- γ (INF- γ) ve Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinlerin de bağırsaktaki miktarında artış gösterdiği bilinmektedir. Enfeksiyonun immünolojik kontrolünü açıklamak amacıyla fareler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. INF- γ parazitin temizlenmesinde önemli yeri olan, intestinal epitelyum ve lamina propriadaki makrofaj ve lenfositleri aktive eder. Bu nedenle öldürücü hücre cevabı için önem taşımaktadır. Ayrıca sitokinlerden interlökün-5 (IL-5) ve interlökün-12'nin (IL-12) azalması ise enfeksiyonun şiddetlenmesine sebep olmaktadır. Mukozal seviyede CD4+ lenfositler enfeksiyonun kontrolünün sağlanmasında görev alırken, INF- γ 'ı parazitin enterositlerde gelişimi sırasında direkt olarak yavaşlatıcı etki göstermektedir. Dolayısıyla CD4+ T-lenfosit hücre eksikliği olan konakçılarda hastalığa olan duyarlılık artar ve hayati tehlikelere varan ciddi komplikasyonlar meydana gelmektedir. Özellikle AIDS'li hastalarda CD4+ hücre sayısı immun sistemin mukoza yüzeyinde enfeksiyonu temizleme yeteneği için en iyi gösterge olduğu bilinmektedir. CD4+ hücre sayısı 180 hücre /mm³'ten yüksek olan kişilerde enfeksiyon spontan temizlenebilirken, 180'den az olanlarda %87

oranında persistan hastalık oluşmaktadır. CD4+ hücre sayısının 50 hücre/mm³'ün altında olduğu durumlarda ölüm riski vardır (Willson, 2004; Özcel ve ark., 2007).

İmmünitesi yeterli kişilerde enfeksiyon sırasında önce Immunglobulin M (IgM) ve sonra da IgG antikor yanıtı olduğu bildirilmiştir. IgG düzeyi birkaç ay içinde azalmakla birlikte yıllarca pozitif kalabilmektedir. Enfeksiyon sırasında IgA ve IgE antikorlarının artışının da gerçekleştiği belirlenmiştir. IgA'nın parazitin sporozoit ve merozoit formlarının bağırsak mikrovilluslarına tutunmasını engelleyici rol oynadığı belirtilmektedir (Current ve Bick, 1989; Mc Donald, 2000).

2.8. Bulaşma ve Korunma Yolları

Hayvan gübrelerinin yaygın bir biçimde toprağa bırakılması sonucu, aerosol yayılmayla direk olarak veya su kaynaklarının kontaminasyonu ile indirekt olarak enfeksiyon oluşabilmektedir (Fayer ve ark., 2000; Terzi, 2005).

Hasta bireylerle direk temas halinde olan insanlarda, umumi yüzme havuzlarını kullanan kişilerde, bu hastalığın yoğun olarak bulunduğu yerlere seyahat edenlerde kriptosporidiyoz riski büyüktür. Enfeksiyonun oluşabilmesi için ookistlerin kontamine yiyecek, içecek ve bazı diğer çevresel etmenlerle ağız yoluyla ya da enfekte konak tarafından solunumla veya konjunktiva aracılığıyla bulaşması gerekmektedir (Starling ve Arrowood, 1993).

Kriptosporidial ookist her tip suda bulunmaktadır. Dokunulmamış yüzey sularında, filtre edilmiş yüzme havuzu suyunda, hatta klorlanmış veya filtre edilmiş içme sularında dahi bulunabilmektedir (Chen ve ark., 2002). Depo ve musluk sularında mikrobiyolojik kirliliğin tespit edilmesi, klorlama işleminin yetersiz olduğunun göstergesidir. Bu sebeple klorlamaya karşı dirençli ve enfeksiyon dozu oldukça düşük olan bu parazitin kontamine yüzme havuzlarıyla temas halindeki insanlar ve kontamine derelerden su içen hayvanlar (özellikle buzağılar) için tehlike oluşturduğu bilinmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

Zayıf bağışıklık sistemi olan HIV/AIDS bulaşmış kişiler, organ transferi yapılanlar, kemoterapi tedavisi devam eden insanlar, böbrek hastaları, çocuk yuvaları veya çocukların bulunduğu günlük bakım merkezlerinde çalışanlar,

ülkeler arası yolculuk yapanlar (yolculuk ishali), izciler, kampçılar gibi işlenmemiş su kaynaklarından su içmek zorunda kalanlar bu parazitin bulaşmasındaki risk gruplarını oluşturmaktadır. Enfeksiyon açısından risk altında olan kişilerin, ishalleri hastalar, çiftlik hayvanları, özellikle 6 aydan küçük hayvanlarla temastan kaçınmaları gerekmektedir. Özellikle hastaneler, laboratuvarlar, gündüz bakım evleri başta olmak üzere toplu yaşanan alanlarda genel hijyenik önlemlere dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

C. parvum'un doğada yaygın olarak bulunması ve su yoluyla bulaşma potansiyeli; ookistlerin her zaman infektif olması, oldukça küçük olmaları (3.5-6.0 µm) ve düşük sedimentasyon oranına (0.5 m/s) sahip olmalarıyla nedeniyle oldukça yüksektir. İşlenmemiş atık sularda, filtre edilerek işlenen atık sularda, kanalizasyonda, yer altı sularında, yeryüzü sularında ve işlenmiş içme suyunda ookistlerin belirlenmesi; dışkıyla kontaminasyonu göstermektedir (Fayer, 2000).

Ookistler uygun şartlarda (nem oranı yüksek ve 20°C'nin üzerindeki sıcaklık), 6 ay canlı kalabilmekte ve daha sonra hızla patojenitesini kaybetmektedir. Enfeksiyona sebep olan bu ookistlerin, %10'luk formolde veya %50 derişik amonyak gibi kimyasal solüsyonlarda 30 dakika içinde, ayrıca 60 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda veya -20 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletmekle canlılığını kaybettikleri bildirilmiştir (Özcel, 1995).

Ayrıca yapılan çalışmalar ışığında, ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7.0'de iki saat içinde veya 1 ppm ozon konsantrasyonunda 10 dk sonra öldüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak sulardaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun, klor veya klordioksitten daha etkili bir dezenfektan olduğu tespit edilmiştir (Hazer, 2007).

Cryptosporidium enfeksiyonlarının kontrol altına tutulabilmesi için öncelikle ookistlerin çevreye yayılmasının önlenmesi gerekmektedir. Ookistlerin yok edilmesi enfeksiyonların önlenmesinde ve büyük çaplı salgınların engellenmesinde önemlidir. Hijyen koşullarının düzeltilmesi, el yıkama ve kontamine olmuş materyallerin uzaklaştırılması, insandan insana ve hayvandan insana ookistlerin bulaşmasını azaltmaktadır. Ayrıca ookistleri -20°C'de 72 saat

dondurma, 45-55°C'de 20 dakika ısıtma işlemleri, ookistin enfeksiyon yeteneğini azaltır veya yok eder. Bu nedenle özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyona yakalanma riskini azaltmak için kaynatılmış ve şişelenmiş suların kullanması ve sebzeleri iyice yıkadıktan sonra pişirerek tüketmesi gerekmektedir (Aysal, 2004). Tuvalete gidildikten sonra ve ishali hayvanlara dokunduktan ve toprakla (bahçe işleri dahi) temas ettikten sonra eller iyice yıkanmalı ve ishali kişilerin herhangi bir rekreasyonel amaçlı kullanılan suyla temas etmemesi gerekmektedir. Yüzme havuzları güvenlik için sürekli kontrol edilmeli ve kontamine suların yutulmamasına dikkat edilmelidir. Pastörize olmayan süt ve süt ürünleri veya meyve sularının içilmesinden kaçınılmalıdır (Murray ve ark., 2007).

2.9. Kriptosporidiyozda Tanı

Cryptosporidium türlerinin tanısı dışkı, balgam ve safra örneklerinde çeşitli yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. İlk teşhis bağırsak biyopsilerinde *C. parvum*'un gelişim evrelerinin gösterilmesiyle konulmuş olsa da ookistleri saptamaya yönelik daha gelişmiş yöntemlerin ortaya çıkmasıyla pahalı ve uzun sürede sonuç veren biyopsi yöntemlerinin tanıda kullanımı tercih edilmemektedir (Casemore, 1991; Clark, 1999; Topçu ve ark., 2002).

Cryptosporidium türlerinin günümüzdeki tanısında en çok dışkıda ookist varlığı açısından boyalı ve boyasız preparatların ışık mikroskobu ile incelenmesi şeklinde değerlendirme yapılmaktadır. Buna ek olarak immun floresan yöntemlerle floresan mikroskop altında ookistlerin görüntülenmesi, ELISA tekniği ile parazite ait antijen varlığının belirlenmesi ve parazitin DNA'sının gösterilmesini hedefleyen moleküler metotlar da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Cryptosporidium enfeksiyonunun teşhisi amacıyla tanıda kullanılan yöntemler aşağıda belirtilmiştir. Kriptosporidiyoz tanısında kullanılan yöntemler, bu yöntemlerin duyarlılıkları, avantaj ve dez avantajları Çizelge 2.5.'de gösterilmiştir (Al, 2011).

a) Direkt mikroskopi yöntemleri

- Basit boyama yöntemi
- Faz kontrast ve karanlık alan mikroskobisi
- Floresan mikroskobisi

b) Serolojik yöntemler

- IFA (İndirekt immunfloresan antikor)
- ELISA (enzyme linked immunosorbent assay testi)
- DFA (Direkt immunfloresan antikor)
- Hızlı immunokromatografik yöntem

c) Moleküler yöntemleri

- PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu)
- Nested PZR
- PZR-RFLP
- LAMP (İlmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi)

d) Histopatolojik inceleme

e) Kültür yöntemleri

Çizelge 2.5. Kriptosporidiyoz tanısında kullanılan yöntemler (Al, 2011).

Yöntem	Prensibi	Duyarlılık	Avantaj/Dezavantaj
Aside dirençli boyama	Ookistlerin modifiye, Kinyoun veya Ziehl-Neelsen yöntemleriyle boyanması	IFA yönteminden on kat daha az	Kolay ve diğer coccidian parazitlerde belirlenebilir. Nonspesifik
IFA	Floresan işaretli anti- <i>Cryptosporidium</i> antikoları ile boyama	10 000-50 000 ookist/g dışkı	Özgüllüğü yüksek Morfolojik olarak doğrulama Canlılık belirlenemez
ELISA	<i>Cryptosporidium</i> antijen yakalama ELISA	IFA'dan daha az	Özgül ve hızlı Tüm gelişim evrelerinin antijenleri belirlenebilir Morfolojik doğrulama yapılamaz
İmmüno-kromatografi	Kolorimetrik yöntemle <i>Cryptosporidium</i> antijen yakalama	IFA'dan daha az	Hızlı Kalite kontrolü ve kalite güvencesi konusunda sorunlar
FISH	Floresan işaretli tamamlayıcı oligonükleotid DNA problrarı ile in situ hibridizasyon		Yüksek özgüllük Canlılık testi olarak kullanılabilir
Nested (İççe) PZR	İki primer seti kullanılarak iki basamaklı PZR yapılması	Tek ookist	Yüksek duyarlılık ve <i>Cryptosporidium</i> türleri özgül olarak belirlenmesi Tür/genotip ayrımı için dizi analizi veya RFLP gereklidir. Gerçek zamanlı PZR yöntemine göre göreceli uzun zaman alır.
PZR-RFLP	Genomik DNA'nın çoğaltılması sonrasında PZR ürününün enzimlerle kesilerek incelenmesi	Tek ookist	<i>Cryptosporidium</i> türleri izolatlarının çoğunun tür veya genotip ayrımını yapabilir Gerçek zamanlı PZR yöntemine göre göreceli uzun zaman alır.
Gerçek zamanlı (Real time) PZR	Hibridizasyon problrarı kullanılarak DNA'nın gerçek zamanlı olarak belirlenmesi	Tek ookist	Hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllük Rutin olarak kullanılabilir Tür ayrımında kullanılabilir Yüksek maliyet
Mikrosatellit analiz	Polimorfik belirteçler olarak kullanılan mikrosatellitlerin PZR ile çoğaltılması	İleri çalışmalara ihtiyaç duyulmakta	Aynı türdeki izolatlar arasındaki farklılıkları belirleyebilir İleri analiz gerektirmez
Gerçek zamanlı ters transkriptaz PZR	mRNA'nın gerçek zamanlı olarak belirlenmesi	Genin kopya sayısına bağlı	Hızlı, duyarlılık yüksek Canlılık testi olarak kullanılabilir Henüz rutin tanı aracı olarak kullanım için yeterince veri yoktur.
NASBA (Nükleik asit dizisine dayalı çoğaltma)	Kalıp olarak tek zincirli RNA'nın kullanıldığı, tamamlayıcı RNA'nın reaksiyon sürecince sentezlendiği izotermal bir çoğaltma yöntemi	Beş ookist	Sadece RNA örneklerinden amplifikasyonla ookist canlılığı belirlenebilir. Isı döngü cihazı gerektirmez Tanı aracı olarak kullanımı için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

2.9.1. Direkt Mikroskopik Boyama Yöntemleri

Kriptosporidiyoz enfeksiyonlarının teşhisi için en uygun ve kolay tekniğin günümüzdeki klinik kullanım alanı göz önüne alındığında dışkı taraması olduğu tespit edilmiştir (Emre ve ark., 1997).

Dışkının makroskopik bakışı hastalıkta şüphe uyandırıcı nitelikte olsa bile önemli spesifik bir görünüm söz konusu değildir. Dışkıda kan ve irin bulunması hastalık için çok ender bir bulgu olup genellikle birlikte seyreden başka bir enteropatojen ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Toplanan dışkı örneklerinde mukusa sık olarak rastlanılmakta ve inceleme amaçlı alınan örneğin mukuslu kısımlardan seçilmesinin daha uygun olduğu düşünülmektedir (Erman ve ark., 2000; Sears ve Kirkpatrick, 2001).

Enfeksiyon sırasında ookist atılımı çoğunlukla intermittent bir özellik taşıdığından teşhis için farklı zamanlarda, çok sayıda dışkı örneğinin alınıp incelenmesi gerekmektedir (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Ayrıca etken atımının bol olduğu sulu dışkılarda ookistlerin çoğu mukus içinde saklı kalabilmekte şekilli ve az mukuslu dışkılarda ise etken atımı düzensiz veya yetersiz olmaktadır. Bu nedenle hastadan alınan tek dışkı örneğinde yapılan mikroskopik inceleme yetersiz olup, birbirini izleyen günlerde üç farklı dışkı örneğinin incelenmesi tanı oranını önemli derecede arttırmaktadır (Erdoğan, 2003).

2.9.1.1. Dışkı Örneklerinin Saklama Yöntemleri

Cryptosporidium türlerinin tanısında dışkı ve balgam gibi örnekler taze olarak incelenebileceği gibi %10'luk formal, %2.5'lik potasyum dikromat (KCr_2O_7), sodyum asetoasetik asit-formol (SAF) gibi fiksatiflerin içerisine alınıp çalışılıncaya kadar taze olarak saklanabilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Bu fiksatifler içerisinde saklanan ookistlerin, 12 aydan fazla bir süre DNA ekstrasyonu amacı ile kullanılabilmesi bildirilmiştir. Ancak %2.5'lik KCr_2O_7 solüsyonu içerisinde $+4^{\circ}C$ 'de saklanan ookistlerin önemli bir kısmı canlı kalabildiği için rutin parazitoloji laboratuvarlarında kullanılmaları enfeksiyon riski açısından önerilmemektedir. Toplanan dışkıların %10 formol solüsyonunda ise $+4^{\circ}C$ 'de veya $-30^{\circ}C$ 'de uzun süre saklanabilmeleri mümkündür. Fakat bu durum

PZR yöntemiyle etken tanısını olumsuz yönde etkilemektedir (Dubey ve ark., 1990; Starling ve Arrowood, 1993; Suresh ve Rehg, 1996; Limor ve ark., 2002).

2.9.1.2. Dışkı Örneklerini Çoklaştırma (Konsantrasyon) Yöntemleri

Enfekte konakların dışkıları ile genelde yeterli miktarda ookist atılımı olmaması sebebiyle, teşhis için konsantrasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Örnekten hastalık etkenini konsantre etmek amacıyla geliştirilen yöntemler arasında; formol-eter ve formol-etil asetat sedimantasyon yöntemleri, Sheather'in yüzdürme yöntemi, percoll-sükroz yöntemi, doymuş çinko sülfat ve doymuş sodyum klorür yüzdürme teknikleri, demir III sülfat flotasyonu, dializ ile prüfikasyon, cam çubuk sütun prüfikasyonu ve immunomagnetik separasyon (IMS) yöntemi sayılabilir (Weber ve ark., 1992; Di Giovanni ve ark., 1999; Carey ve ark., 2004).

Bu teknikler sayesinde incelenen materyalde bulunan PZR antagonistlerinin kısmen uzaklaştırılması da sağlamaktadır (Sears ve Kirckpatrick, 2001; Carey ve ark., 2004). Formal-eter ve formal-etil asetat sedimantasyon teknikleri ile Sheather'in yüzdürme yöntemi en çok kullanılan konsantrasyon yöntemleri arasındadır. Dışkı incelemesinde bu yoğunlaştırma yöntemlerinin en önemli avantajı direkt yaymadan hazırlanan kalıcı boyalı preparatlarda gözden kaçabilecek seyrek miktardaki ookistleri bile ortaya çıkarmasıdır. Alınan örneklere çöktürme yöntemi uygulanırken diğer parazitler için kullanılan santrifüj hızı, *Cryptosporidium*'un küçük yapılı ookistleri için yeterli olmayabilir. Bu nedenle *Cryptosporidium* tanısı koymak için yapılan çalışmalarda örneklerin 1 000-1 500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmesi gerekmektedir (Casemore, 1991; Starling ve Arrowood, 1993; Suresh ve Rehg, 1996; Ok ve ark., 1997; Sears ve Kirckpatrick, 2001).

2.9.1.3. Basit Boya Yöntemleri

Epidemiyolojik araştırmalarda genellikle ookist morfolojisinin belirlenmesine yönelik bilinen boyama teknikleri kullanılmaktadır.

Soğuk boyama tekniği olan iodin ile yapılan boyamanın basit ve kolay bir yöntem olması açısından mantar sporu ve ookistlerin faz kontrast (ve/veya differensiyel interferens kontrast) mikroskobu ile yapılacak ayırımında bir ön teşhis yöntemi

olarak kullanılabileceğini belirtilmiş olup preparatlarda ookistlerin iyi bir şekilde tespit edilemeyeceği bildirilmektedir. Bundan dolayı tespit için ayıt edici bazı boya yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir (Starling ve Arrowood,1993; Silva ve ark., 2003). Ookistlerin saptanmasında kullanılan ayıt edici boya yöntemleri arasında Kinyoun asit-fast boyama yöntemi, Modifiye Asit Fast (MAF) sıcak boyama yöntemi, floresan boyama (Auramin-rhodamine (AR), Acridine orange (AO), Auramin-fenol floresans, Auramin-karbol fuksin), giemsa ve safranin-metilen mavisi, nigrosin, karbol fuksin boyama yöntemleri sayılabilir (Dubey ve ark., 1990; Starling, ve Arrowood, 1993; Aksehirli, 1995; Leng ve ark., 1996; Sears ve Kirkpatrick, 2001). Ancak, diğer pek çok parazitin boyanması amacı ile kullanılan hematoxylin (Reisner ve Spring, 2000), trikrom demir hematoxylin (Dubey ve ark., 1990), polyvinyl alkol gibi boyama teknikleri bu parazitin tanısında önem taşımamaktadır (Sears ve Kirkpatrick, 2001).

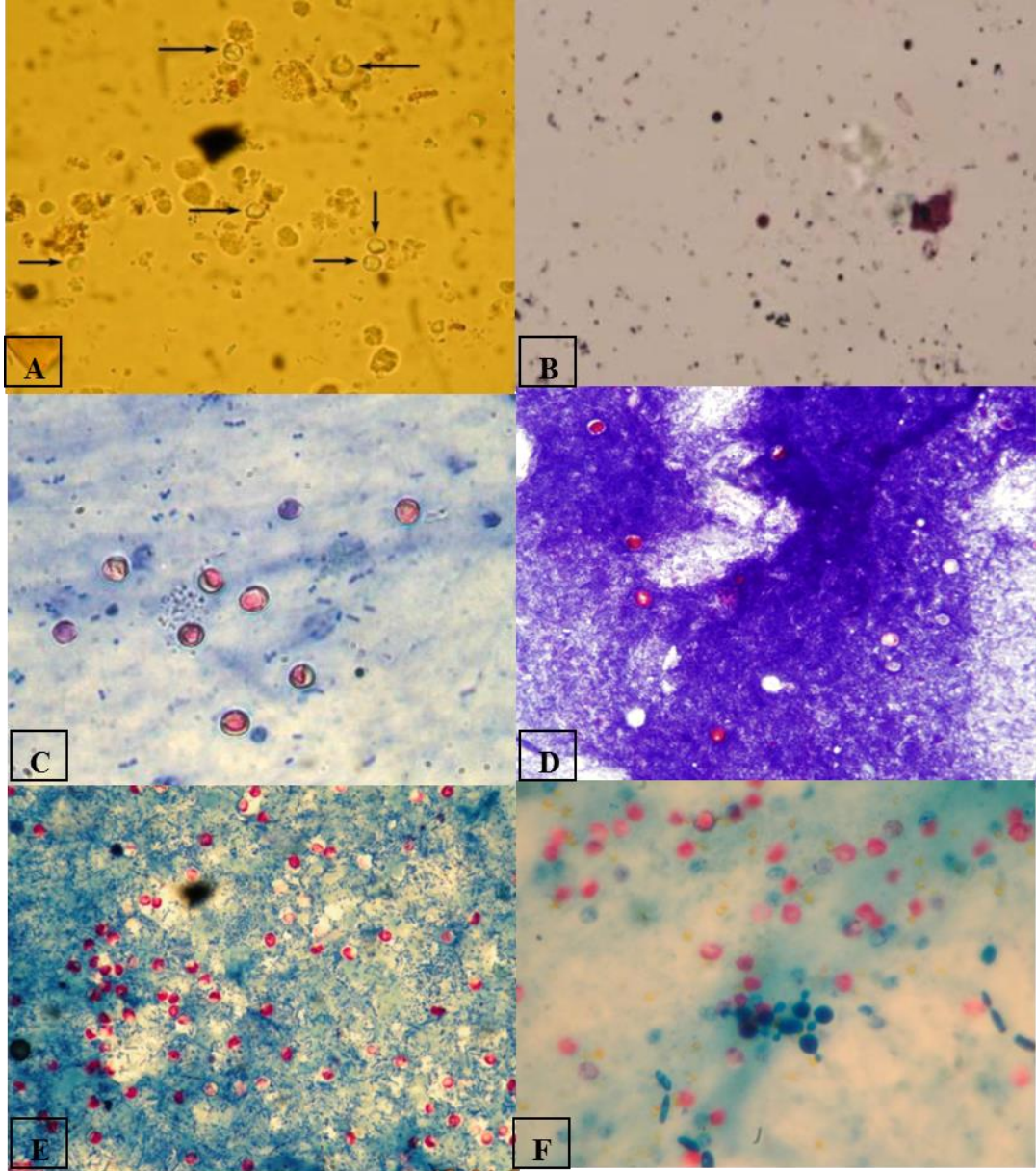
Ookistler, hacim yapıları ve morfolojik özellikleri açısından maya hücreleri, fungal ve küf sporları ve yağ globülleriyle benzerlik göstermektedir. Ookistleri bu yapılardan ayırt etmek amacıyla en sık kullanılan, güvenilir, spesifik ve tanısal değeri yüksek olan metot asit-fast boyama yöntemidir. Bu yöntem ile ookistler pembe veya kırmızı renkte, mayalar ve dışkı artıkları ise yeşil veya mavi renkte boyanmaktadır. İrritan madde içermesi nedeniyle havalandırma sisteminin yeterli olmadığı laboratuvarlarda MAF yerine kinyoun asit-fast yöntemi tavsiye edilmektedir (Current ve Garcia,1991; Ungar, 1995; Gilles, 1999; Mandel ve ark., 2005). Ayrıca asit-fast boyalarının kullanımının kolay olması, %2.5 potasyum bikarbonat veya %10'luk formal eklenerek oda ısısında saklanmış dışkıları boyaması, ucuz olması, kırmızı boyanan ookistleri mavi zemin üzerinde kolay bir şekilde göstermesi, ookistlerin içyapısının ayrıntılı olarak görülmesi ve kalıcı bir boya olması nedeniyle *Cryptosporidium* ookistlerinin teshisinde bu boyama yönteminin kullanılması uygun bulunmuştur (Kehl ve ark., 1995; Ok ve ark., 1997). Bu nedenle günümüzde tanı amaçlı Kinyoun MAF ve Modifiye Ziehl Neelsen (MZN) boyama teknikleri daha çok tercih edilmektedir (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Bu teknikler her ne kadar sık kullanım düzeyine sahip olsalar da sensitivite ve spesifiteleri düşüktür (Clark, 1999).

MZN boyama tekniği ile boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yeşil zemin üstünde, kırmızı-pembe bir renkte gözlenebilmektedir. Bu boyalarla boyanan preparat incelemelerinde ookistin seçilemeyen kısmı, etkenin yüzeyine göre daha koyu boyanırken, mantar sporları, bakteriler, fekal kalıntılar ve diğer asit fast özellik taşımayan yapılar mavi renkte görölmektedir (Emre ve ark., 1997; Gün ve ark., 1997).

Boyama sonrasında mikroskopik incelemede 10 farklı sahada <1 ookist +, 1-10 ookist ++, 11-25 ookist +++ ve >25 ookist ++++ olarak değerlendirilmekte ve ookist yoğunluğuna göre enfeksiyon derecesi hafif (+ veya ++), orta (+++) ve şiddetli (++++) olarak ifade edilmektedir. Farklı boyama yöntemleriyle boyanan parazit ookistlerinin mikroskopik görünümü Çizelge 2.6 ve Şekil 2.3'de gösterilmektedir (MacPherson ve McQueen, 1993).

Çizelge 2.6. Farklı boyama yöntemleriyle boyanan parazit ookistlerinin mikroskopik görünümü (MacPherson ve McQueen, 1993; Hazer, 2007)

Boyama yöntemi	Ookist	Maya
Modifiye asit fast sıcak	Parlak kırmızı	Mavi-yeşil
Kinyoun asit fast soguk	Kırmızı-mor	Mavi-yeşil
Giemsa	Eflatun	Eflatun
Acridine-orange	Yeşil-sarı	Kırmızı-turuncu
Auramin -Rhodamin	Portakal rengi	Görölmez



Şekil 2.3. Boyanmış *Cryptosporidium* spp. ookistleri A: Taze preparat (Ekinci, 2012), B: Modifiye Ziehl-Neelsen boyama (Aysal, 2004), C-D: Kinyoun asit-fast boyama (Elgün, 2009; Dağ, 2010), E-F: Modifiye asit fast boyama (Ekinci, 2012; Eren, 2011)

2.9.2. Serolojik Yöntemler

Cryptosporidium ookistlerinin teşhisinde indirek tanı yöntemlerinden DFA, IFA, Western-blot ve ELISA yöntemleri ile antikorların varlığı araştırılmaktadır (Siddons ve ark., 1992; Garcia ve Shimizu, 1997; Silva ve ark., 2003). Söz konusu teknikler genel olarak, klasik boyama tekniklerine göre daha duyarlıdır (Starling ve Arrowood, 1993). Özellikle incelecek materyalin formalin ile tespit edildiği

veya stoklamanın uygunsuz yapıldığı durumlarda ELISA, IFA gibi testler önemli bir teşhis alternatifi konumundadır (Gasser ve O'Danoghue, 1999).

Dışkı örneklerindeki organizmaların yüzeyindeki antijenlerin immünojenik olarak saptanmasında kullanılan monoklonal antikor temeline dayalı DFA yöntemi ise günümüzde kriptosporidyozun tanısında referans test olarak kabul görmektedir. Floresan mikroskop ile ookistlerin varlığının araştırıldığı bu yöntemde hem konsantre hem de konsantre edilmemiş dışkı örneklerine kolaylıkla uygulanabilmektedir (Dağ, 2010).

IFA yönteminde, ookist yapısında bulunan antijenik yapılara, floresan boya ile işaretli monoklonal antikorların bağlanması prensibine dayanmaktadır (Carey ve ark., 2004). Bu yöntemin diğer protozoon, helmint ve enterik bakterilerle çapraz reaksiyon vermemesi ve dışkının yoğunlaştırılmasına gerek duyulmaması açısından önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. IFA testinin özgüllüğü oldukça yüksek olup, asit-fast tekniklerinden daha duyarlı özelliktedir (Casemore, 1991; Kehl ve ark., 1995). Floresan boyama teknikleriyle boyanan preparatların floresan mikroskopunda x100 objektif taramasında, ookistler siyah zemin üzerinde sferik, yuvarlak-oval yapıda ve boyaya göre sarımsı elma yeşili veya turuncu renkte kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Ancak uygulanması için floresan mikroskoba gereksinimin olması, ookistlerin çoğunun yeteri kadar boya almaması ve yapısının bozulmuş olması gibi nedenlerle içyapının seçilememesi ve tekniğin kalite kontrolünün zorluğu yöntemin dezavantajlarından (Mtombo ve ark., 1992; MacPherson ve McQueen, 1993) *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisi için hazırlanmış birçok ticari IFA kiti aynı zamanda *Giardia* kistlerini de saptayabilmektedir.

1980'den sonra kullanılmaya başlanan ELISA yönteminde ise, bir hemaglutinasyon plağı çukuru içinde oluşturulan antijen antikor kompleksi üzerine, enzim ile işaretli anti insan IgG, IgM ve diğer antikorların konması ve substratın eklenmesiyle pozitif olgularda renk oluşmasının gözlenmesi esasına dayanan ve parazit hastalıklarının tanısında güvenilir bir yöntemdir. Kimyasal bir olay olan renk oluşumu enzimin aktivitesi ile ilgilidir. ELISA testinin duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %100 olarak bilinmektedir. Ancak antijenlerin çapraz

reaksiyon vermesi ELISA yönteminde yalancı pozitifliğe neden olabilmektedir. ELISA diğer bazı yöntemlere nazaran hem hızlı, hem de kolay uygulanabilir bir yöntemdir. ELISA kitleri taze, donmuş, formolde ya da SAF ile fiske edilmiş dışkılarına da uygulanabilmesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak günümüz teknolojisini gerektirmesi ve masraflı olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Kehl ve ark., 1995).

Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan bu serolojik yöntemler değerlendirilmesinde deneyime gerek duyulmaması, uygulama kolaylığı, çok sayıda örneğin aynı anda çalışılmasına olanak sağlaması ve sonuçlarının tekrar edilebilir olması sebebiyle tercih edilmektedir. Ancak DFA ve IFA yöntemlerin maliyeti yüksek olan floresan mikroskopu, ELISA yönteminin ise spektrofotometre gibi ek donanım gerektirmesi gibi nedenler ise bu testlerin kullanımını kısıtlamaktadır (Al, 2011).

2.9.3. Moleküler Yöntemler

Cryptosporidium türlerinin klinik olgulardan ve çevresel kaynaklardan izole edilmesi amacıyla günümüzde PZR tekniği yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Morgan ve Thompson, 1998; Wu ve ark., 2004). Parazit DNA'sının saptanması temeline dayanan bu yöntem sayesinde numunede bulunan bir ookist bile saptanabildiği için mikroskopik incelemelere göre çok daha hassas ve kesin sonuçlar vermektedir. Bu nedenle PZR tekniği kötü koşullarda muhafaza edilmiş, donmuş veya içerisinde çok az etken bulunan numunelerin tanısında dahi kolaylıkla kullanılacak en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir (Leng ve ark., 1996; Özlem ve ark., 1997; Morgan ve Thomson, 1998; Jenkins ve ark., 2000; Sears ve Kirckpatrick, 2001). Oldukça hızlı, yüksek düzeyde duyarlı ve hassas sonuçlar veren bir test olmasına rağmen bu yöntemin kullanımını sınırlayıcı pek çok faktörden bahsedilebilmektedir. Rutinde yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyonu, dışkıda yer alan safra tuzları, bilirubin, kompleks polisakkaritler ve bazı diğer komponentler PZR tekniğinde inhibitör özellik gösterebilen yapılardır. Bu nedenle dışkı ve su kökenli çalışmalarda PZR tekniğini rutin bir şekilde kullanabilmek için kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması ve numuneden ookistlerin titizlikle izole edilmesi gerekmektedir

(Fayer ve ark., 2000). Aynı zamanda testin güvenilirliği açısından, uygun bir ekstraksiyon yönteminin ve en uygun primerlerin seçilip kullanılması da çalışmanın hassasiyeti için oldukça önemli bir basamaktır. Son zamanlarda moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmaların artmasıyla gelişen PZR teknolojisi sayesinde ve DNA izolasyon kitlerinin üretilmesiyle gerek çevresel gerekse klinik örneklerdeki inhibitörler ortadan kaldırılmıştır (Xiao ve ark., 2000; McOrist ve ark., 2002; Carey ve ark., 2004).

Günümüzde *Cryptosporidium* türlerinin belirlenmesi, epidemiyolojik verilerin elde edilmesi ve su kaynaklarının paraziter açıdan incelenmesi amacıyla kullanılan farklı PZR yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında en sık kullanılan metot, PZR amplifikasyon tekniği ile çoğaltılan bir gen bölgesinin uygun enzimlerle kesildikten sonra, elde edilen küçük parçaların jelde yürütülerek gen bölgelerinin uzunluklarının kıyaslanması ve etkenin ayrıntılı genetik analizinin yapılmasında kullanılan PZR-RFLP yöntemidir. Ayrıca hedef bir gen bölgesinin PZR yöntemiyle çoğaltılmasıyla elde edilen amplifikasyon ürünündeki dizilerin iç bölgelerine yönelik primerler eklenerek tekrar PZR işleminin uygulandığı ve bu bölgelerin çoğaltıldığı, klasik PZR'a göre 4-5 kat daha hassas olan Nested-PZR (Balatbat ve ark., 1996), özel işaretli probalar kullanılarak hedef DNA miktarını dolayısıyla ortamdaki etken miktarını belirleyebilen real-time PZR (Limor ve ark., 2002), özel TaqMan probaların kullanıldığı ve esas itibarıyla Real-Time PZR'a benzeyen TaqMan PZR (Carey ve ark., 2004), özellikle, izolatların ayırımını yapmada kullanılan AP-PZR (arbitrary primed PZR) gibi moleküler yöntemlerde *Cryptosporidium*'un moleküler tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Awad El Kariem ve ark., 1998).

Son zamanlarda giderek önemini artıran ve yeni bir metot olan LAMP tekniği de *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır (Notomi ve ark., 2000). Altı adet primerle sekiz farklı bölgenin tanındığı kapalı bir sistem olduğu için özgüllük ve duyarlılık PZR tekniğinde daha yüksektir. Ayrıca sabit sıcaklıkta (60-70°C) 1 saatte tek bir kopyadan 102 kopya çoğaltılabilen LAMP yönteminde yüksek teknik ve becerilere gerek duyulmamaktadır (Paris ve ark., 2008). Sıcaklık değişimleri için zaman kaybı yaşanmadığı içinde diğer

amplifikasyon yöntemlerine göre daha hızlı sonuç vermektedir (Notomi ve ark., 2000; Nagamine ve ark., 2002).

2.9.4. Histopatolojik İnceleme

Parazit bağırsak mukoza epitel hücrelerinin mikrovillus yüzeyinde yerleştiği için biyopsi materyalinin ışık ve elektron mikroskobu ile incelenmesi tanıda önemlidir. Bu yöntemde hematoksilin eozin ile parazit mor renkte boyanarak çeşitli gelişim safhasındaki parazitin teşhisinin yapılmasını sağlamaktadır. Ancak biyopsi yöntemleri dokulara yerleşen parazitin tanısında yararlı olmasına rağmen, hastadan örnek alınan bölgede parazitin bulunmaması yalancı negatif sonuçlara neden olabilmektedir (Casemore, 1991; Gilles, 1999; Garcia ve Bruckner, 1997; Fahey, 2003).

2.9.5. Kültür Yöntemleri

Canlılık tayini amacıyla *Cryptosporidium*'un konak hücre ortamındaki gelişimi ilk olarak 2004 yılında tanımlanmıştır. Bu da *Cryptosporidium* araştırmalarında birçok görüşü kolaylaştırabilecek önemli bir adım olmuştur. Mevcut konak hücre kültürlerinde parazitin tüm evrim dönemlerini görmek mümkündür; ancak çok küçük boyutlarda olduğu için yapısının tanımlanması oldukça zordur (Boxell, 2008).

Çalışmalarda kullanılacak en uygun kültürü HCT-8 olup, ekimi takiben 24-72. saatlerde kültür tarandığında etkenin değişik üreme formları fark edilebilmektedir. HCT-8'de, 2-3 gün ara ile yapılan pasajlar sayesinde kültürü 25 gün kadar uzatabilmek mümkündür (Carey ve ark., 2004). Bu uzun süre sayesinde ilgili dönemde yapılabilecek çalışmalar rahatlıkla yürütülebilmektedir. Hücre kültürünün en büyük dezavantajı, henüz süregen olarak devam ettirilebilen bir kültürün ortaya konamamış olması ve doğal etken biyolojik siklusunda otoenfeksiyonu sağlayan ince duvarlı ookistlerin in vitro ortamda oluşmamasıdır ki bu durum, kültürde sağlanabilecek yoğun bir enfeksiyon tablosunun oluşumunu da engellemektedir (Gasser ve O'Danoghue, 1999; Hijjawi, 2003). Bu tip ookistlerin kültürde oluşabildiği ifade edilse de ilgili etkenlerin açıldığına dair bir kanıt ortaya konamamıştır. Yine hücre kültürlerinde üretilebilen etken düzeyinin,

çoğu kez ekilenden daha az olduğu da ifade edilmiştir (Gasser ve O'Danoghue, 1999).

2.10. Tedavi

Hastalığa ait uygun bir kültür ortamının olmamasından dolayı parazitin biyokimyasal ve metabolik özellikleri tam olarak açıklanamamış ve sonuçta *Cryptosporidium* ookistlerine karşı etkili bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. İmmun sistemi sağlam veya geçici olarak baskılanmış kişilerde enfeksiyonun genellikle 20 günden az bir sürede kendiliğinden geçmesi nedeniyle bu tür olguların dehidratasyon tablosu durumunda sıvı ve elektrolit kaybını karşılamak tedavi için yeterli olup başka bir tedaviye gerek duyulmamıştır (Fayer ve Ungar, 1986; Markell ve ark., 1992; Ungar, 1995; Topçu ve ark., 2002).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda ise uzun süreli enfeksiyona neden olan kriptosporidiyoz tedavisi için daha fazla oranda sıvı, elektrolit, kalori, yağ, karbonhidrat ve aminoasit replasmin yanı sıra ilaç tedavisine de ihtiyaç vardır. İmmüsupresif ilaç uygulanan hastalarda (kanser, transplantasyon tedavileri) bu tedavilere ara verilmelidir. Özellikle AIDS'li hastalarda CD4 hücre sayısı $200/\text{mm}^3$ 'ün altına düştüğünde kriptosporidiyoz yaşamı tehdit edebilmektedir. Bu nedenle bu tür olgularda kriptosporidiyoz için tedavi uygulanmadan önce antiretroviral tedavilerle CD4 sayısının yükseltilmesi gerekmektedir (Akısu ve Korkmaz, 2005).

İmmüsupresif hasta grubunda temelde kullanılabilir ilaçlar şunlardır: İmmun sistemi düzenleyiciler (İnterlökin 2, bovin transfer faktör, hiperimmün kolostrum), antimikrobikler (paramomisin, spiramisin, nitazoksanid, roksitromisin, letrazuril, mazitromycin, lasalocid, maduramycin, aprinocid) ve antidiyareikler (morfin sülfat, somostain analogları, difenoksilat). Tedavi amaçlı kullanılan bu ilaçlar arasında aminoglikozid grubundan olan paramomisin en fazla kullanılan ajandır. Nitazoksanid (NTZ) kronik ve şiddetli ishal yakınması olan tüm hastalarda önerilmektedir (Xio ve ark., 2002; Tzipori ve Ward, 2002; Ramirez ve ark., 2004).

3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

3.1. Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Mata ve ark., (1984) tarafından Kosta Rika'da yapılan bir çalışmada ishal şikayeti olan 278 hastada *Cryptosporidium* spp. ookistleri, giemsa boyama tekniğiyle araştırılmıştır. Elde edilen bilgilere göre diyareli 278 hastanın 12'sinde (%4.3) kriptosporidiyoz enfeksiyonu görülmüş olup yılın sıcak, yağmurlu ve nemli aylarında olgu sayısının giderek artış gösterdiği bildirilmiştir.

Shadid ve ark., (1985) tarafından Bangladeş'de yapılan bir araştırmada gastrointestinal şikayeti bulunan 578 hastanın %4.3'ünde *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptanmış olup bu parazitin meydana getirdiği enfeksiyon oranında yılın sıcak ve nemli ayı olan Mart ayında artış gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Ungar'ın 1990 yılında ELISA yönteminin duyarlılığını tespit etmek amacıyla yaptığı bir çalışmada kriptosporidyozlu 62 hastanın 51'inde pozitiflik saptanırken *Cryptosporidium* enfeksiyonu belirgin olmayan kontrol gurubu 182 örneğin 176'sı negatif olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak ELISA yönteminin duyarlılığının %89.5, özgüllüğünün ise %96.7 olduğu gösterilmiştir.

Rosenblatt ve Sloan (1993), tarafından gaita numunelerinde *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada Mayo Kliniği'ne başvuran hastalardan elde edilen taze (4 örnek), dondurulmuş (49 örnek) ve %10'luk formolde (243 örnek) korunmuş örnekleri IFA ve ELISA yöntemleriyle incelemişlerdir. Çalışmada temin edilen 296 diyareli dışkı örneğinin 100 tanesinde ELISA ve IFA yöntemleriyle *Cryptosporidium* spp. olduğu belirlenmiş olup, ELISA testinin duyarlılığının %93, özgüllüğünün ise %99 olduğu tespit edilmiştir.

Kehl ve ark.,'nin (1995) yaptıkları çalışmada, *Cryptosporidium* ookistlerini saptamak amacıyla ELISA, DFA ve asit-fast boyama yöntemlerini uygulamışlardır. Çalışmada 129 dışkı örneği incelenerek, 55 örnekte pozitif sonuç elde edilirken, 74 örnekte ookist saptanamamıştır. ELISA yönteminin duyarlılığının %94.5, asit-fast boyama ve DFA yöntemi birlikte kullanıldığında ise duyarlılığın %96.4 olduğu tespit edilmiştir.

El Shazly ve ark., (2007) tarafından Mısır'da ishali çocuklarda *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin varlığını belirlemek için 1 050 dışkı örneği MAF ve ELISA yöntemleriyle araştırılmıştır. Çalışmada incelenen diyareli 90 çocukta MAF ile parazite ait oookistler saptanırken, ELISA yöntemiyle 100 çocukta *Cryptosporidium* antijeninin varlığı tespit edilmiştir.

Kusnierz ve ark., (2007) Warsaw'da seçilmiş primer immun yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun varlığını araştırmışlardır. Çalışmada 1980-2006 yılları arasında primer immun yetmezlikli 987 hastadan 5 XHIM ve 1 CD4 lenfopenili hasta *Cryptosporidium* spp. varlığı açısından MZN boyama tekniği, DFA ve PZR yöntemleriyle incelenmiştir. Dışkı ve/veya safra örnekleri incelenen 6 hastanın 4'ünde *Cryptosporidium* varlığı belirlenmiş olup, enfekteli 4 olguda üç farklı parazit türü; *C. meleagridis*, *C. hominis* ve *C. parvum*'un tanımlandığı bildirilmiştir.

Jayalakshmi ve ark., (2008) tarafından Hindistan'da yapılan bir çalışmada, ishali olan HIV seropozitif toplam 89 hastanın gaita örnekleri ELISA ve MAF boyama yöntemleri ile araştırılmıştır. İncelenen 89 örneğin 11'i (%12.4) mikroskobi yöntemiyle pozitifken, ELISA yöntemiyle 10'unda (%11.2) pozitif sonuç elde edilmiştir. ELISA ile pozitif sonuç veren 10 gaita örneği mikroskobi ile de pozitif olarak bulunmuştur. Elde edilen bilgilere göre ELISA testinin duyarlılığını %99.9, özgülüğünü de %98.7 olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak kriptosporidiyoz enfeksiyonu üzerine yapılan çalışmalarda basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren ELISA tekniğinin rutin çalışmalarda kullanılmasının yararlı olabileceği belirlenmiştir.

Tuli ve ark., (2008) tarafından yapılan çalışmada, Hindistan'da ishali 336 HIV pozitif hastanın ve 200 ishali HIV seronegatif hastanın gaita numuneleri enterik protozoonların varlığı açısından araştırılmıştır. 200 HIV seronegatif kontrol hastası HIV pozitif hastaların aile bireylerinden seçilmiştir. Elde edilen dışkı örnekleri MAF, modifiye safranin ve calcoflour white boyama yöntemleriyle boyanarak incelenmiştir. Sonuç olarak HIV pozitif hastalarda en sık *Cryptosporidium* spp. (%39.8) ardından da *Microsporidia* spp. (%26.7) parazitleri belirlenmiştir. Ayrıca HIV pozitif hastaların %17.5'inde ise *Cryptosporidium*

spp., *Cyclospora* spp. ve *Mikrosporidia* spp. parazitleri birlikte görülmüştür. Elde edilen bilgilere göre CD4 seviyeleri ishaliin sürekliliği ile ters orantılı olup kronik ishaller hastaların akut ishaller hastalardan daha düşük CD4 miktarlarına sahip olduğu bildirilmiştir.

Moğalistan Tuv-aimak bölgesinde *Cryptosporidium* oöistleri varlığı açısından 460 örnek IFT metodu ile incelenmiştir. Sığırlarda 116 *Cryptosporidium* oöisti bulunmuştur. IFT ile pozitif bulunan 116 örneğin, 47'si IMS yöntemiyle saflaştırılmış ve 11 tanesi PZR ile pozitif olarak bulunmuştur. SSU rRNA gen bölgesinde Nested PZR ile çoğaltılmış ve elde edilen PZR ürünleri *VspI*, *SspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Örneklerin sekans analizinde iki örnekte yaygın enfeksiyon *C. bovis* ve *C. andersoni* varlığını göstermiştir. Araştırmacılar koyun ve keçilerden toplanan dışkı örneklerinin hiçbirinde *Cryptosporidium* oöisti bulamamışlardır (Burenbaatar ve ark., 2008).

Nago ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada gaita örnekleri *C. parvum* ve *G. intestinalis* parazitleri duyarlı bir metod olan LAMP yöntemiyle incelenmiştir. Sonuç olarak hastalardan alınan 39 diyareli dışkı örneğinin 14'ünün (%70) *C. parvum* ve 16'sının (%84) *G. intestinalis* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir.

Güneybatı Nijerya'daki 4 beyaz Fulani sürüsünde rastgele seçilmiş 12-24 haftalık ishalleri sığırlarda *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını tespit etmek için SSU rRNA gen bölgesine PZR ve RFLP analizleri yapılmıştır. Örneklerin 34 (%52.3) tanesi *Cryptosporidium* için pozitif sonuç vermiştir. PZR ürünlerinin RFLP analizleri sonucunda, *SspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak 18 örnek (%27.7) *C. bovis*, 5 örnek *C. ryanae* için pozitif sonuç vermiştir (Ayinmode ve ark., 2010).

İran'da yapılan bir çalışmada, çocuklarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun varlığını belirlemek için 12 yaşından küçük diyareli çocuklardan toplanan dışkı örnekleri asit- fast boyama yöntemiyle incelenmiş ve pozitif örneklere DNA izolasyonu uygulanmıştır. Daha sonra *TRAP-C2* geni türe özgül primerler kullanılarak Nested PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Sonuç olarak 12 örnek *Cryptosporidium* açısından pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ürünlere (266-366 bp) *BstEII* ve *HaeIII* enzimleri kullanılarak RFLP tekniği uygulanmıştır. Nested-PZR amplifikasyonu sonucunda pozitif bulunan 12 örneğinin 10 tanesi *C.*

parvum (%83.3), 1 tanesi *C. hominis* (%8.3) ve 1 izolatta karışık enfeksiyon olduğu görülmüştür (Majorad ve ark., 2011).

Batı Fransa'da henüz süttten kesilmemiş 2-21 aylık buzağılardan *Cryptosporidium* türlerini genetik karakterizasyonu belirlemek için 182 fekal örnek toplanmıştır. DNA izolasyonları yapıldıktan sonra 18S rRNA geni PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. PZR ürünleri *SspI* ve *MboII* enzimleri ile kesilerek *Cryptosporidium* türlerini genetik karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 84 pozitif örnekten 61'i RFLP analizi ile başarılı bir şekilde genotiplendirilmiştir. Bunlardan 14 tanesi *C. parvum*, 15 örnek *C. bovis*, 22 örnek *C. ryanae*, 10 örnekte ise *C. bovis* ve *C. parvum* karışık kombinasyonlarda tespit edilmiştir (Rieux ve ark., 2013).

Suudi Arabistan'da *Cryptosporidium* sıklığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 10 yaş altındaki çocuklardan alınan dışkı örnekleri MZN boyama ve RAPD-PZR tekniği ile incelenmiş %11 pozitiflik bulunmuştur (Shalaby ve ark., 2014).

3.1.1. Yurtdışında Yapılan Su Kökenli Çalışmalar

Mayer ve Palmer (1996) atık sularda *Giardia* ve *Cryptosporidium* parazitlerinin varlığını belirlemek amacıyla IFA ve PZR metodlarını karşılaştırmalı olarak uygulamışlardır. Elde edilen bilgilere göre *Giardia* sp. IFA ve PZR yöntemi ile %100 uyumlu olarak tespit edilirken; *Cryptosporidium* IFA tekniği ile %63.7 duyarlılık göstermiştir.

Lowery ve ark., (2001) tarafından Kuzey İrlanda'da 1996-1999 yılları arasında yapılan bir çalışmada, içme suyu kaynaklarında *Cryptosporidium* ookistlerinin insidansını ve genotiplerini belirlemek amacıyla konvansiyonel ve moleküler tespit yöntemleri karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Çalışmada toplanan 474 su örneğinin 380 tanesi IFA tekniğiyle, 94 tanesi IMS-IFA yöntemiyle incelenmiş ve her iki yöntemle de toplamda 14 (%3) örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 214 örnekte 18S rRNA ve TRAP-C2 gen bölgeleri PZR tekniğiyle incelenmiş ve bunların 11'i (%5.1) pozitif bulunmuştur.

Ryan ve ark., (2005) tarafından Sdney’de yapılan bir çalışmada, Waragamba’daki su toplama havzasında *Cryptosporidium* spp’nin kaynaklarını araştırmak amacıyla toplanan gaita ve su numunelerini IMS ve IFA yöntemleriyle incelemişlerdir. Daha sonra ookist içerdiği tespit edilen örnekler 18S rRNA ve HSP-70 genine ait gen bölgelerinde filogenetik analizler yapılmıştır. Analiz sonucunda *C. parvum*, *C. suis*, domuz genotipi-2, geyik genotipi ve keçi genotiplerini içeren 5 farklı tür bulunduğu tespit edilmiştir.

Coupe ve ark., (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Cryptosporidium* ve *Giardia* parazitlerinin rekreasyonel amaçlı kullanılan sulardan bulaşma risklerini değerlendirmek amacıyla bir yıl boyunca rekreasyonel göllerden ve Paris yakınındaki 3 nehirden her ay düzenli olarak su örneği alınmıştır. Toplanan su numunelerinde IMS-IF yöntemiyle parazitler tespit edilmiş olup PZR ve RFLP yöntemleri uygunlanmıştır. Aynı zamanda PZR yöntemiyle *Enterocytozoon bieneusi* bakterisinin tanımlanması da yapılmıştır. Sonuç olarak IMS-IF yöntemiyle *Giardia* kistleri ve *Cryptosporidium* ookistlerine rekreasyonel göllerde yıl boyunca düşük sayılarda rastlanılmış fakat arasıra artış gösterdiği gözlenmiştir. Nehir bölgelerinde bu durumun tam tersi olarak yıl boyunca sürekli ve bazen şiddetli bir şekilde artış olduğu bildirilmiştir. PZR-RFLP analizi sonucunda ise *C. hominis* ve *C. parvum* türleri saptanmıştır. Araştırmacılar ayrıca parazitlerin varlığı ve miktarı ile bakteriler arasında bir ilişki saptamadıklarını belirtmişlerdir.

Karanis ve ark.’nın (2006) Rusya ve Bulgaristan’da yaptıkları çalışmada farklı kaynaklardan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* ve *Giardia* parazitlerinin varlığını belirlemek amacıyla toplam 166 su örneğini incelemişlerdir. Toplanan su örneklerine filtrasyon, flokülasyon ve sukroz gradiyent saflaştırma yöntemlerini uygulayarak kist ve ookistleri immunofloresans test yöntemiyle belirlemişlerdir. Çalışmada incelenen su örneklerinin %18.1’inin *Cryptosporidium* ookisti ve %9.6’sının da *Giardia* kistleriyle enfekte olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta her iki parazit de içme ve kuyu suyunda, nehirden alınan çevresel sularda ve lağım sularında bulunmuş olup, şişelenmiş sularda da *Giardia* kistlerinin varlığına rastlanmıştır.

Lobo ve ark., (2008) tarafından Portekiz’de yüzey ve yeraltı kaynaklarından alınan ham ve işlenmiş sularda *Cryptosporidium* ve *Giardia* parazitlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla toplanan 175 su örneğinde ookist ve kistler USEPA 1623 protokolüne göre IMS, IFA ve PZR temelli yöntemler ile incelenmiştir. Sonuç olarak IFA yöntemiyle incelenen 175 örneğin 81’inde *Cryptosporidium* pozitifken, 67’sinde *Giardia* pozitif olarak tespit edilmiştir. PZR ile ise 37 örnekte *Cryptosporidium*, 9 örnekte *Giardia* pozitif sonuç vermiştir. En yaygın tür olarak *C. parvum* bulunmuş olup, bunu *C. hominis*, *C. andersoni* ve *C. muris* takip etmektedir. Ayrıca tüm pozitif *C. hominis* örneklerinde alt-tip IdA15 teşhis edilmiştir. Tiplendirme sonucunda *C. parvum*’un IIAA15G2R1, IIAA16G2R1 ve IIAA17G1 alt-tipleri ortaya çıkmıştır. *Giardia duodenalis* için ise alp-tip A1 tanımlanmıştır.

Castro-Hermida ve ark., (2009) tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada, İspanya’nın Tambre Irmağı üzerindeki eğlence amaçlı kullanılan 5 farklı bölgeden ilkbahar-yaz-sonbahar-kış döneminde 22 noktadan, kaynaktan, orta büyüklükte bir ırmaktan ve 3 önemli ırmak ağzından 50 L’lik su örnekleri alınmıştır. Ayrıca çalışmada su örnekleriyle aynı dönemde Tambre Irmağı havzasındaki 18 mandıra sürüsünden 697 inek, 480 düve ve 139 yeni doğmuş buzağıdan da gaita numuneleri toplanmıştır. Toplanan tüm örnekler *Cryptosporidium* spp. (18S rRNA gen bölgesi) ve *Giardia* spp. (β -giardin gen bölgesi) parazitleri varlığı açısından PZR tekniğiyle incelenmiştir. Sonuç olarak Tambre Irmağı havzası *Cryptosporidium* ookist ve *G. intestinalis* kisti ile yüksek miktarda kontamine olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çiftlikteki *Cryptosporidium* türleri ve *G. intestinalis*’in ortalama değerlerine göre bahar mevsimi verileri kış döneminden farklı bulunmuş olup, su örneklerindeki ookist miktarı ise sonbahar ve kış aylarına göre bahar ve yaz aylarında çok yüksek çıkmıştır.

Mons ve ark., (2009), Paris ve çevresinde içme suyu kaynağı olarak kullanılmakta olan Seine ve Marne Irmağı’nın sularının protozoonlar ile kontaminasyonu açısından değerlendirmiştir. Çalışmada 30 ay boyunca 20 L’lik su örnekleri toplanmıştır. Ayrıca indikatör bakteriler de tespit edilerek yağış miktarıyla ilişkisine bakılmıştır. Toplam 162 ırmak suyu örneğinde *Cryptosporidium* ookisti %45.70 *Giardia* kistleri ise %93.80 oranında tespit edilmiştir. Mevsimsel olarak

Cryptosporidium için pozitif örnekler özellikle sonbaharda, *Giardia* için daha az sıklıkta yazın gözlenmiştir. Enterokok sayımı ve yağmur miktarı özellikle *Giardia* konsantrasyonu ile ilişkililikten, enterokok miktarının *Cryptosporidium* miktarıyla ilişkililik olmadığı saptanmış olup, diğerk fekal bakterilerin incelenen protozoonlarla ilişkililik olmadığı belirlenmiştir.

Plutzer ve ark., (2010), içme sularını 2 µm çaplı ARAD mikrofiltreden geçirek filtrenin üzerinde kalan örnekleri *Cryptosporidium* ve *G. intestinalis* parazitleri yönünden LAMP tekniğıyle inceleyerek bu iki yöntemin birlikte kullanımının paraziter etkenlerin saptanmasında daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Castro-Hermida ve ark. (2010), çalışmalarında Galicia'da (İspanya) atık su arıtma tesisleri (50 tane), içme suyu arıtma tesisleri (52 tane) ve rekreasyonel nehir alanlarında (28 tane) *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistlerinin litre başına ortalama konsantrasyonları IFAT yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada farklı istasyonlardan alınan toplam 232 su numunesi Filta-Max filtreleri kullanılarak filtre edilmiş ve daha sonra (oo)kistler konsantre edilerek IFAT tekniğıyle incelenmiştir. Rekreasyonel alanlar içinde, *Cryptosporidium* ve *Giardia*'nın bulaşıcı formları sırasıyla 16 (%57.1; litre başına 1-60 ookist) ve 17 (%60.7; litre başına 1-160 kist) örnekte saptanmıştır. Su arıtma tesislerine doğru akan sular içinde, ookistler 21 içme suyu arıtma tesisinde (%40.4; litre başına 1-13 ookist) ve kistler 22 içme suyu arıtma tesisinde (%42.3; litre başına 1-7 kist) belirlenmiştir. Arıtma tesislerinden çıkan atık su içinde, *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistleri sırasıyla 17 (%32.7; litre başına 1- 4 ookist) ve 19 (%36.5; litre başına 1-5 kist) içme suyu arıtma tesisinde gözlenmiştir. Atık su arıtma tesislerinde bulunmuş ookistin en yüksek konsantrasyonu, özellikle, atık su arıtma tesislerindeki son çıkan su (atıksu) içinde 29 ookist (%58.0; litre başına 1-80 ookist) ve 49 (%98.0; litre başına 2-14 400 kist) belirlenmiştir. *Cryptosporidium* ve *Giardia* atık su arıtma tesislerinden çıkan atık su içinde, sırasıyla, 32 (%64.0; litre başına 1-120 ookist) ve 48 (%96.0; litre başına 2-6 000) örneğin içinde saptanmıştır.

Mahmoudi ve ark., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, su kökenli *Cryptosporidium* ve *Giardia* parazitlerini tespit etmek amacıyla LAMP, PZR ve

IFA metotları kullanılmıştır. Çalışmada İran'ın kuzeyindeki iki nehirde 10 L yüzey suyu örnekleri alınmıştır. Toplam 40 örnek IFA, PZR ve LAMP yöntemiyle incelenmiş ve 15 örnekte ookist tespit edilmiştir. IFA yöntemiyle ookist tespit edilemeyen 5 örnek LAMP yöntemiyle pozitif olarak belirlenmiştir. Ayrıca IFA yöntemiyle incelenen 13 örneğin 10'u *Giardia* kistleri açısından pozitifken, PZR tekniğiyle de pozitif sonuç vermiştir. Sonuç olarak LAMP yönteminin diğer yöntemlere göre daha hassas çalıştığı bildirilmiştir.

Adamska (2015), Kuzey Polonya'daki doğal su kaynaklarından elde edilen su örneklerinde *Giardi* ve *Cryptosporidium* parazitlerinin varlığını TaqMan real-time PZR ve RLB yöntemlerini kullanarak araştırmıştır. Hayvanların içme suyu ve yıkanma amaçlı kullandıkları su kaynaklarından 3 yıl boyunca 600 numune toplanmıştır. Sonuç olarak PZR yönteminin RLP yönteminden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm PZR ürünlerine sekans analizi yapılarak 3 (%0.05) *C. parvum* ve 4 (%0.06) *G. intestinalis* teşhis edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında bu patojen parazitlerin enfeksiyon riskinin Polonya'da az olduğu gözlenmiştir.

3.2. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde kriptosporidiyoz enfeksiyonu ile ilgili ilk çalışma 1987 yılında Özcan ve arkadaşları tarafından Adana'da yapılmış olup ishali çocuklarda %8.2, ishali olmayan çocuklarda %4.10 oranında *Cryptosporidium* spp. ookistleri tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda ise bağışıklık sistemi baskılanmış olguların artması ve yeni laboratuvar tanı yöntemlerinin uygulanmaya başlanmasıyla bu enfeksiyona yönelik çalışmaların hızlanmasına sebep olmuştur (Dağ, 2010).

Doğan ve ark.,'nın (1998) Eskişehir'de yaptıkları çalışmada, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Polikliniği'ne başvuran 0-6 yaş arası ishali 540 çocuk ile yetiştirme yurdunda bir gastroenterit salgını sırasında aynı yaş grubu 67 çocuktan alınan dışkı örneklerini incelemişlerdir. Çalışmada Sheather'in flotasyon tekniğine göre hazırlanan dışkı örnekleri doğrudan taze inceleme, gram, giemsa, MAF yöntemleri kullanılarak *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin varlığı ve mevsimsel periyodu yönünden araştırmışlardır. Yapılan

çalışma sonucunda ise toplam 607 örneğin %3.6'sında *Cryptosporidium* spp. oookistleri belirlenmiştir.

Akyön ve ark.,'nın (1999) Ankara'da 12 yaşın altındaki çocuklarda kriptosporidyoz yaygınlığını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, diyareli 200 çocuktan ve sağlıklı 50 çocuktan aldıkları toplam 250 dışkı örneğini IFA, DFA, Giemsa boyama ve MAF boyama yöntemleri ile incelemişlerdir. Çalışmada elde edilen bilgilere göre diyareli 7 çocukta (%3.5) *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin varlığı belirlemiş olup, kontrol grubundaki çocukların hiçbirinde parazite rastlanmamıştır.

Doğancı ve ark.,'nın (2002) Ankara'da yaptığı çalışmada, 2-18 yaşları arasında rastgele seçilen 37 kız ve 13 erkek olmak üzere toplam 50 çocuktan alınan dışkı ve biyopsi örneklerinde çeşitli yöntemlerle (direkt mikroskopi, MAF, Kinyoun'un asit-fast boyama ve korbol-fuksin boyama) *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin varlığını araştırmış ve 2 (%4) gaita numunesinde pozitif sonuç elde edilmiştir.

Yazar ve ark., (2005) tarafından 2000-2004 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran 34883 hastanın dışkı numunelerine nativ-lügol ve flotasyon/sedimentasyon yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca *Cryptosporidium* oookistleri yönünden şüpheli görülen dışkı numuneleri de asit-fast boyama yöntemi ile incelenmiş ve yalnız 1 (%0.003) hastada *Cryptosporidium* spp. oookistlerine rastlanmıştır.

Börekçi ve ark.,'nın (2005) Mersin'de yaptıkları çalışmada, bir gecekondu mahallesinde yaşayan ve rastgele örnekleme yöntemi ile seçilen ailelerde *Cryptosporidium* prevalansını belirlemek amacıyla ishal şikayeti bulunmayan toplam 76 aileyi (466 kişi) incelemişlerdir. Örnek vermeyi kabul eden 361 kişinin dışkı örneklerini MAF yöntemi ile boyayarak ışık mikroskobunda incelemişler ve 76 ailenin 9'unda (%11.8), en az bir kişide *Cryptosporidium* oookistleri kaydetmişlerdir.

Afyonkarahisar bölgesinde risk gruplarında *C. parvum* araştırılması amacıyla yapılan çalışmada, 2006-2007 tarihleri arasında Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin farklı birimlerine başvuran 136 hasta ve Afyonkarahisar Çocuk Esirgeme Kurumunda kalan 114 çocuktan alınan

toplam 250 dışkı örneğini incelenmiştir. Toplanan örneklerin 10'unda Kinyoun'un asit-fast boyama yöntemiyle *C. parvum* ookistleri saptanmış olup, parazit oranı %4 olarak bulunmuştur. Elde edilen bilgilere göre özellikle bakım evlerinde kalan çocuklarda ve diğer risk grupları için, ishale seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*'un enterik patojen olarak önemsenmesi ve ayırt edici tanıya gidilmesi gerektiği düşünülmektedir (Hazer, 2007).

Sungur ve ark., (2008), çalışmalarını hastanelere ishal şikayeti ile başvuran 18 çocuk ve yine ishal tablosuna sahip olan 27 buzağı dışkısı olmak üzere toplam 45 örnek üzerinde yürütmüşlerdir. İncelenen örneklerin seçilmesinde, kriptosporidiyoz açısından yüksek risk taşıyan yaş grubu ve ishal tipi dikkate alınmış, böylece kullanılacak teşhis tekniklerini değerlendirmeyi sağlayacak düzeyde pozitif sonuçlara ulaşılması hedeflenmiştir. Karbol fuksin boyama yöntemine göre taranan 27 buzağı dışkısından 3'ünde (%11.20), 18 çocuk dışkısının ise 1'inde (%5.60) olmak üzere, incelenen 45 numunenin toplam 4'ünde (%8.90) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır. Nested PZR sonucunda, buzağı dışkılarının 8'inde (%29.70) ve çocuk dışkılarının ise 1'inde (%5.60) olmak üzere, toplam 9 (%20) numuneden *Cryptosporidium* türleri tespit edilmiştir. Karbol fuksin boyamada pozitif çıkan örneklerin tamamı aynı zamanda Nested PZR yöntemiyle de pozitif bulunmuştur. Yapılan bu çalışma ile kriptosporidiyozun gerek çocuk dışkısından gerekse de buzağı dışkısından teşhis edilmesi amacıyla pratik olarak karbol fuksin boyama yönteminden yararlanılabileceği, ancak Nested PZR yönteminin çok daha etkili sonuçlar verebildiği belirlenmiştir.

Ülçay ve ark., (2008), ishal şikayeti olan immün yetmezlikli hastalarda, gastroenterit etkeni olabilecek bağırsak protozoonların tespiti için hangi laboratuvar yöntemlerinden yararlanılması gerektiğini belirlemeye çalışmıştır. Kasım 2004 ile Ağustos 2006 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde immün yetmezliği olup 10 günden daha uzun süreli ishali olan 36 hasta ile immün yetmezlikli ishali olmayan 44 hasta çalışılmıştır. Alınan dışkı örneklerinin tespitinde nativ-lugol, trikrom, MAF, ELISA, DFA ve PZR teknikleri kullanılmıştır. İmmün yetmezlikli hastalarda kronik ishallerin sorumlusu olarak en

sık saptanan etkenlerin *G. intestinalis* ve *C. parvum* gibi bağırsak protozoonlarının olduğunu belirtmişlerdir.

Direkel ve ark., (2008) yaptıkları çalışmalarında, Malatya Huzurevi sakinleri ile İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'ne başvuran ishali toplam 92 kişiden aldıkları dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. varlığını belirlemek amacıyla iki yöntemin duyarlılığını karşılaştırmışlardır. ELISA yöntemi ile *C. parvum* koproantijenlerini ve MAF boyama yöntemi ile ookistlerini araştırmışlardır. Toplam 5 örnekte hem ELISA hem de boyama yöntemi ile pozitiflik saptamışlardır. ELISA yönteminin duyarlılığını ve özgüllüğünü bu çalışmada %100 olarak saptamışlardır

Tamer ve ark., (2008) Hemotoloji-onkoloji servisinde yatan lösemi ve lenfoma tanısı almış ve ishali olan toplam 89 çocukta kriptosporidiyoz prevalansını belirlemek amacıyla, Kinyoun asit-fast boyama ve ELISA yöntemlerini kullanmışlardır. Elde edilen bilgilere göre ELISA ile 89 hastanın 11'i (%12.3), boyama ile 7'si (%7.8) kriptosporidiyoz tanısı konulmuş olup, boyama ile pozitif olan 7 hastanın tamamının ELISA yöntemi ile de pozitif olduğu bildirilmiştir.

Tamer ve Gülenç (2008), rastlantısal olarak ishal, karın ağrısı, bulantı kusma gibi gastrointestinal yakınma ile başvuran 80 olgunun ve kontrol grubu olarak sağlıklı 65 kişinin dışkı örneklerini kriptosporidiyoz yönünden MAF boyama yöntemiyle ve dışkıda *Cryptosporidium* türlerine ait antijenlerini aramaya yönelik hazırlanmış ELISA kiti ile incelemiştir. İncelenen 80 dışkı örneğinden MAF boyama yöntemi ile 3 (%3.75) örnekte *Cryptosporidium* ookistleri, monoklonal ELISA ile yapılan değerlendirmelerde ise 5 (%6.25) örnekte *Cryptosporidium* spesifik antijenlerini saptamıştır. Kinyoun asit-fast yöntemiyle boyanan 3 örnek ELISA ile de pozitif olarak bulunmuştur.

Van'da kriptosporidiyoz varlığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada yaşları 0-15 arasında değişen 870'i kız, 1 130'u erkek olan ishal şikayeti olan toplam 2 000 çocuğa ait dışkı örneklerini araştırılmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak rastgele seçilen 100 çocuğa ait dışkı örneklerini kullanılmıştır. Çocuklardan toplanan dışkı örnekleri MAF ve ELISA yöntemiyle incelenmiştir. Sonuç olarak ELISA ile 2 000 çocuğun 97'sinde (%4.9), boyama ile sadece 39'unda (%1.95)

Cryptosporidium spp. ookistlerinin varlığını belirlenmiştir. Kontrol grubunda her iki yöntemle de parazit saptanamadığı bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2008).

Çiçek ve ark.,'nın (2008) Van belediye mezbahasının farklı birimlerinde çalışan işçilerde ve kesimi yapılan hayvanlarda *Cryptosporidium* türlerinin varlığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, kesimi yapılan toplam 309 (167 koyun, 56 keçi ve 86 sığır) hayvanın ve 87 işçinin dışkı örneklerini incelemiştir. Sonuç olarak dışkı örnekleri incelenen 87 işçinin 34'ünde (%34.08) flotasyon yöntemiyle bağırsak parazitleri saptanmış olup 1 (%1.14) işçide *Cryptosporidium*, 17 (%19.54) işçide ise *G. intestinalis* parazitlerinin varlığı tespit edilmiştir.

Doğan ve ark.,'nın (2008) çalışmasında, Şubat 2003-Aralık 2007 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin çeşitli kliniklerinden gastrointestinal sistem yakınmaları ile başvuran hastaları bağırsak parazitleri varlığı açısından değerlendirmişlerdir. İncelenen toplam 34 733 dışkı örneği formol-etil asetat çoklaştırma işleminden sonra tuzlu su ve iyot preparasyonları hazırlanarak incelenmiştir. Amip yönünden şüpheli olgular trikrom boyalı ve *Cryptosporidium* spp. için modifiye Erlich Ziehl Nelsen boyalı preparasyonlar hazırlanarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, incelenen dışkı örneklerinin 1 252'sinde bir veya daha fazla parazit varlığı tespit edilmiştir. Parazit saptanan olguların %52.5'i kadın, %47.5'i erkek olarak saptanmıştır. Parazit olguları içinde en çok görülen *E. histolytica/dispar* grubu amipler olup; %31 (397/1 252), bunu sırasıyla *G. intestinalis* %19 (236/1 252) ve *B. hominis* %7 (108/1 252), *C. parvum* %4.5 (56/1 252) parazitleri izlemiştir.

Şanlıurfa yöresinde *Cryptosporidium* spp.'ye yönelik ilk kez yapılan retrospektif bir çalışmada, Ağustos 2006-Ağustos 2009 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'na dışkıının parazitolojik incelenmesi için gönderilen toplam 16 050 gaita numunesinin 18'inde (%0.46) Kinyoun'un asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin varlığı tespit edilmiştir (Tümer ve ark., 2009).

İzmir'de kriptosporidiyoz tanısında taze ve formaldehitte saklanmış dışkı örneklerinde PZR tekniğinin etkinliğini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniği'nde

Cryptosporidium spp. ookistlerinin saptandığı 22 hastaya ait 23 taze ve 10 tanesi de %10 formaldehit solüsyonunda saklanmış toplam 33 dışkı örneği Nested PZR yöntemiyle incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda taze dışkılarda duyarlılık ve özgüllük %100, formaldehitte saklanan dışkı örneklerinde duyarlılık %50 olarak tespit edilmiştir (Dirim ve ark., 2009).

Adana Numune Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'ne bağlı kliniklerden Parazitoloji Anabilim Dalı'na ishal şikayeti ile başvuran yaşları 0-86 arasında değişen hastalardan alınan 154 dışkı örnekleri ELISA yöntemi ve MAF boyama yöntemiyle araştırılmıştır. MAF yöntemiyle 8 örnekte pozitiflik saptanırken, ELISA ile 37 örnekte pozitiflik belirlenmiştir. Araştırmacılar dışkıda özgül antijen arayan ELISA'nın maliyeti yüksek olmasına rağmen etkensel tanı yöntemlerindeki zorluklara yardımcı olduğunu belirtmişlerdir (Elgün, 2009).

Sakarya ve ark., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, Ankara'nın değişik hastanelerine ishal şikayeti ile başvuran 98 hastadan ve yine Ankara'da bulunan değişik sığırcılık işletmelerindeki 32 buzağıdan alınan toplam 130 dışkı örneğinde karbol fuksin boyama yöntemi ve Nested PZR tekniği ile *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar Nested PZR yöntemiyle taranan örneklerin 13'ünde (%10.0) *Cryptosporidium* spp. varlığını tespit etmişlerdir. pozitiflerin 12'si (%37.5) buzağılardan, 1'i (%1.02) ise insan dışkılarından elde etmişler. Karbol fuksin boyama yöntemi ile yapılan taramalarda ise insan dışkılarının 1'inde (%1.02) ve buzağı dışkılarının 7'sinde (%21.88) olmak üzere, toplam 8 (%6.15) dışkı örneğinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerine rastlanmışlar. Kullanılan tekniklerden Nested PZR yönteminin karbol fuksin boyama yöntemine göre tanıda daha etkili olduğu sonucunu bildirmişlerdir.

İzmir'de Tıp Fakültesine başvuran hastalarda *Cryptosporidium* spp.'nin belirlenmesi ve tür ayrımının yapılması için 162 ishalleri dışkı örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle pozitif olarak belirlenen 18 örneğin 15'i PZR yöntemi ile de pozitif olarak bulunmuştur. Boyama yöntemiyle pozitif saptanamayan 144 örneğin 6'sı ise PZR ile pozitif sonuç vermiştir. Daha sonra COWP gen bölgesine ait PZR ürünlerinin *RsaI*

enzimiyle kesimi sonucunda 1 örnek *C. meleagridis*, 20 örnek ise *C. parvum* olarak tespit edilmiştir (Usluca ve Aksoy, 2011).

Elgün ve Koltaş'ın (2011) Ekim 2008 ile Temmuz 2009 tarihleri arasında Adana'da yaptıkları çalışmada, toplanan 154 dışkı örneğinin 8'inde (%5.19) MAF boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* spp. ookistleri görülmüş olup, ELISA (Microwell ELISA) yöntemi ile örneklerin 37'sinde (%24) *Cryptosporidium* spp. antijenini saptamışlardır.

Şimşek ve ark., (2012) Nevşehir yöresindeki ishallerde buzağılarda kriptosporidiyoz enfeksiyonunun varlığını belirlemek amacıyla 2010-2011 yılları arasında farklı ilçe ve köylerden 150 ishallerde buzağıdan dışkı örneği toplamışlardır. DNA ekstraksiyonundan sonra edilen genomik DNA'lar *Cryptosporidium* soy spesifik 18S rRNA parsiyel gen bölgesini amplifiye eden JVAF, JVAR primerleri ve JVAP TaqMan probuyla, *C. parvum* spesifik JVAGF, JVAGR primerleri ve JVAGP2 probu ile real time PZR analizine ve *Cryptosporidium* türlerinin 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile de Nested PZR analizine tabii tutulmuşlardır. Real time PZR analizleri sonucu 23'ü (%15.3) *C. parvum*, 8'i (%5.3) ise *Cryptosporidium* spp. olmak üzere toplam 31 (%20.7) örnekte; Nested PZR analizleri sonucunda ise 29'u (%19.3) *Cryptosporidium* spp. pozitif bulunmuştur. Real time PZR tekniği altın standart test kabul edilerek nested PZR tekniğinin duyarlılığı %93.5 ve özgüllüğü ise %100 olarak belirlenmiş, iki teknik arasında %95.8 uyum saptanmıştır. Ayrıca bu çalışma Türkiye'de sığırlarda kriptosporidiyozun real time PZR tekniği ile araştırıldığı ilk çalışma olup ilk kez *Cryptosporidium* soy ve *C. parvum* pozitifliği eşzamanlı olarak ortaya konmuştur.

Özçelik ve ark., (2012) tarafından Sivas'ta Eylül 2009-Eylül 2010 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada zoonotik özelliği nedeniyle hayvancılıkla uğraşan kişilerde, şehir merkezinde yaşayan kontrol grubunda ve sığırlarda kriptosporidiyoz yaygınlığı araştırılmıştır. Çalışmada *Cryptosporidium* Stool Antigen Microwell ELISA Kiti kullanarak Sivas'a bağlı farklı köylerde yaşayan 50 çiftçiden, şehir merkezinde yaşayan, ishal vb. yakınmaları olmayan 65 kişiden ve bu yörelerde yetiştirilen 200 sığır ve buzağıdan alınan dışkı örnekleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda köylerde yaşayıp hayvancılık yapan 50 kişinin

9'unda (%18), ve şehirde yaşayan 65 kişinin 4'ünde (%6.2) *Cryptosporidium* spp. antijeni saptanmıştır. Ayrıca sığırlardan toplanan 200 dışkı örneğinin 15'inde (%7.5) *Cryptosporidium* pozitifliği belirlenmiştir.

Kars yöresinde *C. parvum*'un alt türlerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, sığırlardan elde edilen 13 adet (10'u buzağı, 3'ü inek) *C. parvum* izolatına DNA izolasyonu yapılmıştır. Primer ve sekonder PZR ile GP60 gen bölgesi çoğaltılmış ve sekonder PZR ürünleri *SspI*, *VspI* ve *MboII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek RFLP analizi uygulanmıştır. Daha sonra sekans analizi yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre; *Cryptosporidium parvum*'un Ila (12/13) ve IId (1/13) subtip familyası ile IlaA15G2R1 (10/13), IlaA16G3R1 (2/13) ve IIdA15G1 (1/13) subtipleri tespit edilmiştir. Buzağılarda *C. parvum* IlaA15G2R1 (9/10), IlaA16G3R1 (1/10), ineklerde *C. parvum* IlaA16G3R1 (2/3) ve IIdA15G1 (1/3) subtipleri belirlenmiştir. İshalli buzağılarda *C. parvum* Ila subtip familyası (8/8) ve IlaA15G2R1 (7/8) subtipi yaygın olarak saptanmıştır. Sonuç olarak Türkiye'de sığırlarda *C. parvum* subtipleri ilk defa bu çalışma ile bildirilmiştir (Arslan ve Ekinci, 2012).

Bayramoğlu ve ark., (2013) gıda çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* parazitlerinin tanısında kullanılan farklı yöntemleri kıyaslayarak portör muayenelerinde kullanılacak en uygun yöntemi tespit amacıyla, Adana ilinin farklı bölgelerinde portör taraması amacıyla gelen 500 kişinin dışkı örneklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda *Giardia* spp. nativ-lugol inceleme yöntemi ile örneklerin 13'ünde (%2.6), immunokromatografik test ile 8'inde (%1.6) ve DFA tekniği ile 24'ünde (%4.8) pozitif olarak saptanırken, alınan örneklerde *Cryptosporidium* spp. ookistlerine rastlanmamıştır.

Karaman ve ark., (2015) tarafından Malatya'da yapılan bir çalışmada *Cryptosporidium* spp.'nin epidemiyolojisini belirlemek amacıyla 2 281 dışkı örneği MAF yöntemiyle incelenmiş ve 161 (%7.1) örnek pozitif olarak tespit edilmiştir.

3.2.1. Türkiye’de Yapılan Su Kökenli Çalışmalar

Aysal’ın (2004) yüksek lisans tezi amacıyla yaptığı çalışmasında, Isparta il sınırları içindeki göl, dere ve çeşme olmak üzere çeşitli su kaynaklarından toplanan örneklerde *C. parvum* ve *G. intestinalis* parazitlerinin varlığını araştırmıştır. Membran filtrasyon sistemi kullanılarak filtre edilen örneklerin santrifüjünden sonra direkt mikroskopi yöntemi ile *G. intestinalis*, MZN boyama yöntemi ile *C. parvum* araştırılmış olup *C. parvum*’un varlığının doğrulanması amacıyla ayrıca IFA tekniği de kullanılmıştır. Toplanan 40 su örneğinin 13’ünde (%32.5) direkt mikroskopi ve MZN boyama sonrası *C. parvum* olabileceği tahmin edilmiştir. Ancak IFA tekniğinin uygulanması sonucu 6’sında (%15) *C. parvum*’un varlığı kesin olarak tespit edilmiştir. Ayrıca direkt mikroskopi sonrası 8 örnekte (%20) *G. intestinalis* kistlerine de rastlanmıştır.

Çeber ve ark., (2005) tarafından Mersin ilinde yapılan bir çalışmada, içme suyu (44), kullanma suyu (2), atık su (19) ve deniz (35) sularında *Cryptosporidium* spp. oocistlerinin varlığını tespit etmek amacıyla toplanan 100 su örneği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre içme suyunda 5 (%11.36), kullanma sularında 1 (%21), atık sularda 4 (%21) ve deniz suyu örneklerinde 1 (%2.85) oranında *Cryptosporidium* oocistlerine rastlanmıştır. Yine Mersin il merkezi ve semtlerinde dört ilköğretim okulunda öğrenim gören çocuklarda yapılan başka bir çalışmada ise, 8-12 yaş gurubu çocuklardan alınan toplam 72 dışkı örnekleri MKSA yöntemi ve Auramin-O ile boyama yöntemi ile boyanarak *Cryptosporidium* oocistleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, suları kirli olan okuldaki 4 (%5.5) öğrencide enfeksiyona rastlanırken, suları temiz olan okullardaki çocuklarda enfeksiyon belirlenmemiştir (Otağ ve ark., 2007).

Kolören ve Kaya (2010), Ordu ilindeki çevresel sularda MAF ve native-lugol yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada *Giardia* ve *Cryptosporidium* parazitlerinin yaygınlığını araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre *Giardia*’nın yaygınlığı sırasıyla; Mesudiye %61.3; Ünye %52; Korgan %40.7; Fatsa %31.8; Ulubey; %30; Perşembe %29.4 olarak tespit edilirken; *Cryptosporidium*’un yaygınlığı sırasıyla; Ünye %63.15; Fatsa %54.3; Mesudiye %37.5; Perşembe %36.8; Ulubey %33.3; Korgan %31 olarak tespit

etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda nüfusu kalabalık yerleşim yerlerinde kist ve ookist sayısının fazla olabileceği kanısına varılmıştır.

Çiçek ve ark., (2011) tarafından Van ilinde içme sularında *Cryptosporidium* spp. ookistlerini belirlemeye yönelik çalışmada, 440 farklı istasyondan 5 L'lik su örneği toplanmış ve MAF boyama yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmada toplanan 440 su örneğinin %1.13'ünde *Cryptosporidium* spp. ookistleri görülmüştür. İçme suyu olarak kullanılan 191 yüzeysel kaynak suyunun %1.57'sinde, şehir merkezi ve ilçelerden temin edilen 241 şebeke içme suyunun %0.82'sinde *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı tespit edilmiştir. İncelenen su örneklerinin 193'ü kırsal alanlardan elde edilen içme suları olup bunların %1.55'inde, şehir ve ilçe merkezlerinde içme suyu olarak kullanılan 247 suyun ise %0.80'inde pozitif olduğu belirlenmiştir.

Kaya'nın (2011) Ordu il merkezi ve ilçelerinden alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını tespit etmeye yönelik çalışmasında MAF yöntemini kullanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yerleşim merkezlerinde bulunan yüzeysel sularda *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca örnek alınan beş istasyonda *Cryptosporidium* ookistlerinin en yüksek değerlerine ilkbahar mevsiminde (%17.37) rastlanmıştır.

Kolören ve ark.,'nın (2011) Ordu bölgesinde yapmış oldukları çalışmada, farklı su kaynaklarından alınan toplam 70 su örneğinde IFT, LAMP ve Nested PZR yöntemlerini kıyaslayarak *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını tespit etmişlerdir. İncelenen bu 70 su örneğinden 18'i (%25.70) IFT yöntemiyle; 19'u (%27.10) LAMP yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Uygulamanın güvenilirliğini test etmek için rastgele seçilen 16 örnek 10 adet *Cryptosporidium* ookistleri ile kontamine edilmiştir. Bu örneklerin hepsi LAMP tekniğinde pozitif bulunurken, Nested PZR yöntemiyle sadece 7 örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Buna dayanarak, LAMP tekniğiyle Nested PZR ve IFT yöntemine göre daha hassas sonuçlar alınabileceği gösterilmiştir.

Yine, Kolören ve Demirel (2013), Ordu ili Melet Irmağı'nın farklı noktalarından alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin varlığını göstermek amacıyla LAMP metodunu kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, LAMP yöntemiyle

Melet Irmağı'nın tüm noktaları pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu durumun buzağılar tarafından Melet Irmağı'nın içme suyu olarak kullanılması ve buzağuların ırmak içine dışkılamalarının neden olabileceği düşünülmektedir.

Aslan ve ark., (2012) tarafından, Mersin ilindeki farklı su kaynaklarında *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığının belirlenmesi ve bunların tiplendirilmesini amaçlamışlardır. Mart 2007-Mayıs 2009 tarihleri arasında Mersin şehir merkezi ve ilçelerinden alınan toplam 135 farklı su kaynağına ait örnekler Modifiye Kinyoun'un aside dirençli (soğuk) boyama yöntemi (MKSA) ve PZR ile saptanmış, ayrıca RFLP yöntemiyle de tiplendirilmiştir. Yapılan çalışmada MKSA yöntemiyle üç, PZR ile yedi örnekte *Cryptosporidium*'un varlığı tespit edilmiş olup tüm suşlar *C. parvum* olarak tanımlanmıştır. MKSA boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistlerinin saptandığı üç örneğin hepsi PZR ile de pozitif sonuç vermiş, buna karşın PZR-RFLP ile *C. parvum* olarak tiplendirilen dört örnek MKSA ile negatif bulunmuştur. Araştırmada, PZR-RFLP yönteminin duyarlılığının MKSA yöntemine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

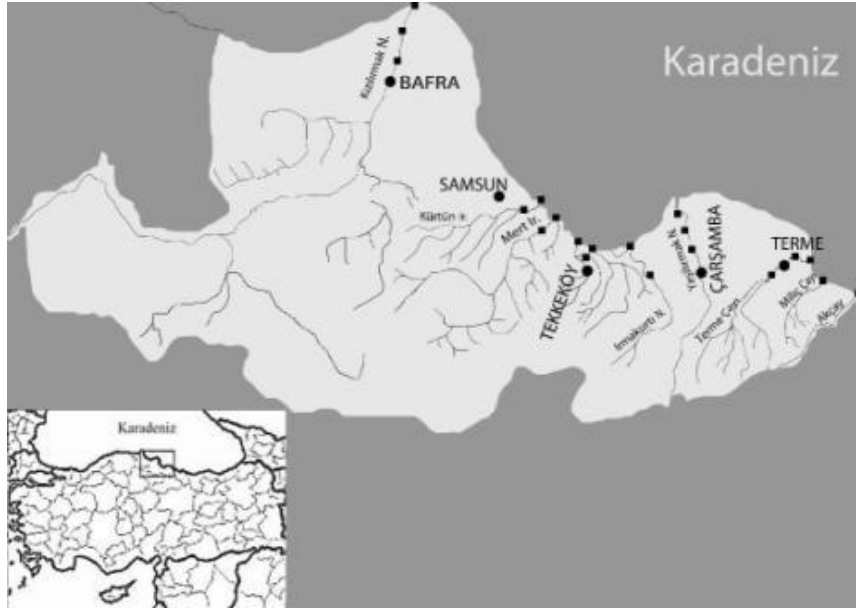
Akdemir (2013), çalışmasında Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne gastrointestinal sistem şikâyetleriyle başvuran hastalarda kriptosporidiyoz varlığını belirlemek amacıyla, 146 hastaya ait dışkı örneklerini ve şehir şebekesinden aldığı su örneklerini MKSA ve ELISA yöntemleriyle incelemiştir. MKSA boyama ile incelenen dışkı örneklerinin 4'ünde (%2.7) ookist varlığını belirlemiş olup, ELISA yöntemiyle ise 5 (%3.4) örnekte pozitiflik saptamıştır. İncelenen içme suyu örneklerinin ise sadece 1'inde (%3.3) ookist görülmüştür. Sonuç olarak Kütahya'da kriptosporidiyoz yaygınlığı %3.4 olarak bildirilmiştir.

Ayaz ve Kolören (2014), tarafından Giresun'da yapılan bir çalışmada çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium parvum*'un varlığını Nested PZR yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışmada Giresun ili ve ilçelerinden alınan içme suyu örneklerinde *C. parvum* negatif olduğu halde, 180 çevresel su örneğinin 63 tanesinde (%35) bu parazit pozitif olarak tespit edilmiştir.

4.1.2. Samsun

Samsun coğrafi konum olarak 40° 50' - 41° 51' kuzey enlemleri, 37° 08' ve 34° 25' doğu boylamları arasındadır. Genellikle ılıman bir iklime sahiptir. Ancak sahil şeridi ve iç kesimlerinde iklim iki ayrı özellik gösterir. Sahil şeridinde (Merkez ilçe, Terme, Çarşamba, Bafra, Alaçam,19 Mayıs, Tekkeköy ve Yakakent) Karadeniz ikliminin etkileri görülür. Bunun için sahil şeridinde yazlar sıcak, kışlar ılık ve yağışlı geçer. İç kesimler (Vezirköprü, Havza, Ladik, Kavak, Asarcık ve Salıpazarı) yüksekliği 2 000 metreyi bulan Akdağ ve 1 500 metreyi bulan Canik Dağları'nın etkisi altında kalır. Buradaki dağların etkisinden dolayı kışlar soğuk, yağmur ve kar yağışlı, yazlar ise serin geçer. Yıllık ortalama sıcaklık 15°C'dir.

Samsun ili sınırları içerisinde yer alan önemli akarsular; Kızılırmak Nehri, Yeşilirmak Nehri, Terme Çayı, Abdal Irmağı, Mert Irmağı, Kürtün Irmağı, Engiz Deresi, Tersakan Çayı ve bunların yan kollarından oluşmaktadır (Delioğlu, 2012). Araştırma alanını oluşturan Samsun iline ait istasyonlar ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Araştırma alanını oluşturan Samsun ilindeki istasyonların haritası (Seferoğlu, 2014)

4.2. Giresun ve Samsun İllerinde Örnekleme Yapılacak İstasyonlar

Bu çalışma, 2012 ve 2013 yılları sonbahar ayları ile 2013 ve 2014 yılları bahar aylarında Samsun ve Giresun illerinden alınan çevresel ve içme suyu örneklerinde yapılmıştır. Samsun ilinde 25, Giresun ilinde ise 20 istasyon belirlenmiştir. Bu istasyonlar; Samsun ili Terme ilçesinde; Akçay (OS1), Miliç Çayı (OS2), Terme Çayı-I denizle birleşme noktası (OS3), Terme Çayı-II köprüaltı (OS4), Terme Çayı-III alt geçit (OS5) ve içme suyu (OSİ-1) (Şekil 4.3), Çarşamba ilçesinde; Yeşilirmak-I köprüaltı (OS6), Yeşilirmak-II Yeni Köseli Köyü (OS7), Yeşilirmak-III denizle birleşme noktası (OS8), Irmaksırtı Çayı-I köprü altı (OS9), Irmaksırtı Çayı-II havaalanı yanı (OS10) ve içme suyu (OSİ-2) (Şekil 4.4), Tekkeköy ilçesinde; Gelemen Deresi (OS11), Selyeri Deresi (OS12), Kirazlık Deresi (OS13) ve içme suyu (OSİ-3) (Şekil 4.5), Samsun il Merkezinde; Mert Irmağı-I denizle birleşme noktası (OS14), Mert Irmağı-II köprü altı (OS15), Kürtün Irmağı-I köprü altı (OS16), Kürtün Irmağı-II (OS17) ve içme suyu (OSİ 4) (Şekil 4.6), Bafra ilçesinde; Kızılırmak-I Karadiken mah. (OS18), Kızılırmak-II köprü altı (OS19), Kızılırmak-III Bafra atık saha yanı (OS20) ve içme suyudur (OSİ-5) (Şekil 4.7).

Giresun il merkezinde ise; Aksu (G6), Boğacık (G7), Batlama (G8), Büyükgüre (G9) dereleri ve içme suyu (Şekil 4.8); Piraziz ilçesinde; Piraziz (G13), Çayırağzı (G14), Keloğlu (G15) dereleri ve içme suyu (Şekil 4.9); Bulancak ilçesinde; Bulancak (G10), Karadere (G11), İncivez (G12) dereleri ve içme suyu (Şekil 4.10); Espiye ilçesinde ise; Gelivera (G1) ve Yağlıdere (G2) dereleri ve içme suyu (Şekil 4.11); Keşap ilçesinde; Yolağzı (G3), Keşap (G4), Keşap Giriş Köprüsü (G5) dereleri ve içme suyudur (Şekil 4.12).



Akçay



Miliç



Terme Çayı

Şekil 4.3. Samsun ili Terme ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Irmaksırtı Çayı



Yeşilirmak Nehri

Şekil 4.4. Samsun ili Çarşamba ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Gelemen



Kirazlık



Selyeri

Şekil 4.5. Samsun ili Tekkeköy ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Kürtün Irmağı



Mert Irmağı

Şekil 4.6. Samsun il Merkezinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Kızılırmak



Şekil 4.7. Samsun ili Bafra ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Batlama

Büyükgüre



Aksu

Boğacık

Şekil 4.8. Giresun ili merkezinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Piraziz



Keloğlu

Çayırağzı

Şekil 4.9. Giresun ili Piraziz ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Bulancak

Karadere

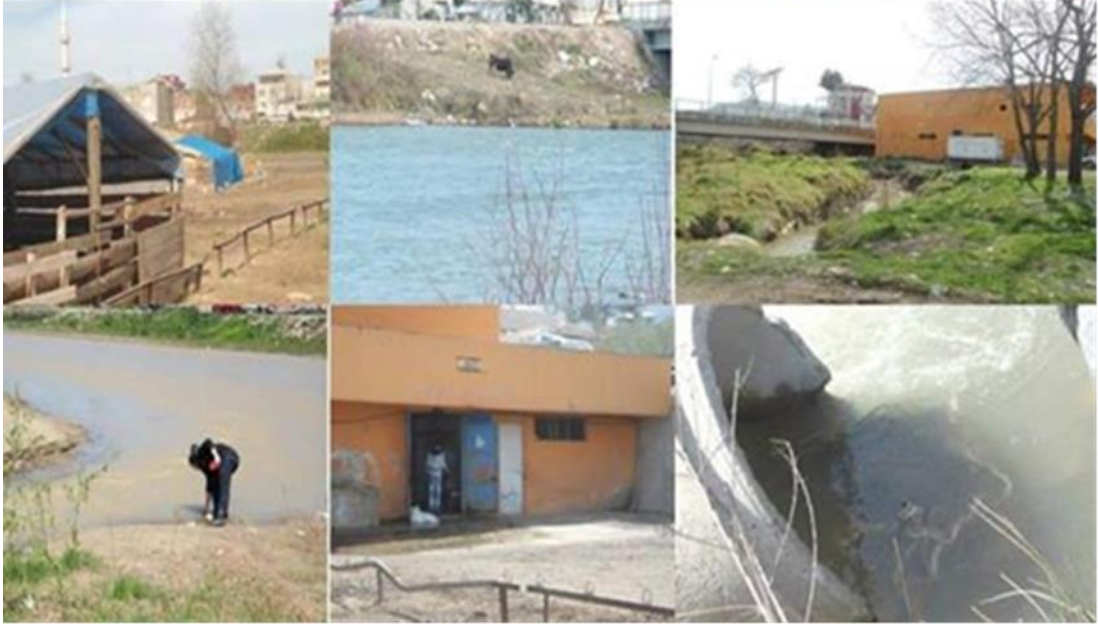


İncivez

Şekil 4.10. Giresun ili Bulancak ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Yağlıdere



Gelivera

Şekil 4.11. Giresun ili Espiye ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)



Yolağzı



Keşap giriş köprüsü



Keşap

Şekil 4.12. Giresun ili Keşap ilçesinden alınan su örneklerine ait istasyonlar (Seferoğlu, 2014)

4.3. Örneklerin Toplanması ve Alüminyum Sülfat ile Çöktürme

Giresun ve Samsun illerinin merkez ve ilçelerinden içme suyu ve çevresel sulardan 5 L'lik su örnekleri toplanmıştır. Su içindeki materyalin çöktürülmesi için örneklere 10 ml alüminyum sülfat ($Al_2(SO_4)_3$) eklenerek pH 5.4-5.8 olarak ayarlanmıştır. Çökeltmenin gerçekleşmesi için örnekler 24 saat karanlık koşulda bekletilmiştir. Üstteki sıvı kısım atıldıktan sonra elde edilen yaklaşık 200 ml'lik çökelti 50 ml'lik falkon santrifüj tüplerine homojen ve eşit şekilde konularak ve 2 100 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerde 5 ml örnek kalacak şekilde üstteki süpernatant atılıp, vortekslenerek üzeri distile su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve 2100 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Yine tüplerde 5 ml'lik pellet bırakılarak vortekslendikten sonra üzerine 10 ml lizis tamponu eklenip son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. 15 dk'da bir çalkalamak suretiyle örnekler bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak örnekler iki kez 2100 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiş ve yine tüplerde 5 ml örnek bırakılarak son hacim 10 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Örnekler daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

4.4. Örneklerin Saflaştırılması (Sükroz Gradient Yöntemi)

0.1 M PBS (pH: 7.2) ve sükroz çözeltisi (500 g sükroz, 6.5 g-fenol, 320 ml saf su) hazırlanıp, sükroz/PBS oranı farklı iki çözelti (solüsyon A:1/2, solüsyon B:1/4) elde edilmiştir. Bu çözeltilere maximum 4 damla %1'lik tween 80 damlatılmıştır. 50 ml'lik steril poliprolen falkon tüpünün içine önce 15 ml solüsyon A konulup üzerine 15 ml solüsyon B eklenerek gözle görülebilir bir faz elde edilmiştir ve bu fazın üstüne 10 ml su örneği dikkatli bir şekilde konulup ikinci bir tabakanın oluşması beklenilmiştir. 1200 x g'de 30 dk 4°C de santrifüj edildikten sonra en üstte yaklaşık 10 ml'lik ilk görünen üst tabaka atılmıştır. Atılan tabakanın altında mevcut olan yaklaşık 5-10 ml'lik ikinci tabaka temiz bir falkon tüpüne alınmıştır. Üzeri saf su ile 50 ml'ye tamamlanıp 2100 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra yaklaşık 2 ml'lik pellet tüpün dibinde kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Tekrar üzeri saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır ve 2100 x g'de 10 dk-santrifüj edilmiştir. Yaklaşık 2 ml'lik pellet tüpün dibinde kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Bu pellet DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

4.5. Örneklerin IFA Yöntemiyle Boyanması

IFA tekniği için cellabs kiti kullanılarak preparat üzerindeki kist ve ookistlerin fluoressan işaretli monoklonal antibadilerle boyanması sağlanmıştır. Kitte belirtilen protokol uygulanarak pozitif ve doğadan alınan su örneklerine ait preparatlar hazırlanmıştır. Daha sonra preparatların üzerine 25 µl RR2 (monoklonal antikor) eklenerek kurumaya bırakılmıştır. Son olarak preparat üzerine mounting fluid eklenerek floresan mikroskop altında bu preparatlar incelenmiştir.

4.6. DNA İzolasyonu

Sükroz gradient yöntemiyle saflaştırılan örneklerden DNA izolasyonu yapabilmek için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) protokolü Karanis ve ark.,'na (2006) göre modifiye edilerek uygulanmıştır. Öncelikle örneklerin üzerine lizis tamponu eklenerek peş peşe 15 kez sıvı azot içinde dondurup-çözme işlemi yapılmıştır. Dondurma işlemi örnekler sıvı azot içerisinde 1 dk bekletilerek, çözme işlemi ise kaynama sıcaklığında olan su banyosunda 1 dk bekletilerek yapılmıştır. Bu sayede ookist duvarlarının tamamen kırılması sağlanmıştır. Bu işlemden sonra kit protokolü sırayla takip edilmiştir. Son olarak DNA 50 µl TE tampon içinde toplanmıştır ve moleküler tekniklerde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

4.7. LAMP Tekniği

LAMP reaksiyon karışımı 25 µl son hacimde hazırlanmıştır. 12.5 µl 2 X LAMP reaksiyon tamponu [40 mM Tris-HCL (pH: 8.8), 20 mM KCL, 16 mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, %0.2 Tween 20, 4M Betaine, 2.8 mM dNTP'ler], 1.3 µl primer karışımı [FIB, BIP (100 pmol), F3, B3 (100 pmol), LB, LF (100 pmol)], 8U Bst DNA Polimeraz'dan (Biolabs) 1 µl eklendikten sonra nükleaz free water (Hyclone) ile reaksiyon karışımı 25 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı vortekslenip PEQlab PZR cihazında 63°C'de 1 saat, 85°C'de 5 dk DNA inkübasyona bırakılmıştır. Her bir test için pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Oluşan ürünler ethidium bromidle boyanmış %1'lik agara yüklenmiştir. Jel elektroforezde 100 V'da 60 dk yürütüldükten sonra UV altında (Prizma/Quantum ST4) bantlar görüntülenmiştir. *Cryptosporidium* spp. için kullanılan LAMP primeri SAM-1 geni olup gen dizilimi Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 4.1. *Cryptosporidium* spp.'nin amplifikasyonunda kullanılan LAMP primerleri

LAMP tekniği	Primer tipi	Dizi (5'-3')	Uzunluk	Hedef
	F3	ATTTGATRGACAAAGAACTAG	22	
	B3	CGATTGACTTTGCAACAAG	19	<i>C.parvum, C. hominis, C. meleagridis</i>
SAM-1	FIB (F1c-F2)	TTGCGCCCTGTTAATCCAGCAT-TAATTAATCCATCTGGCAGR ^{TTT}	45	
	BIP (B1-B2c)	TTGTAGATACATACGGAGGATGGG-TCTACTTTAGTTGCATCTTTCC	46	
	LF	CTGCTGGCCCMCCAATTG	18	
	LB	CATGGRGGTGGTGCATTTAG	20	

4.8. Nested PZR Tekniği

Nested PZR için Hot Start Taq DNA Polimeraz kiti (10X PZR tamponu, 5X Q solution, 25 mM MgCl₂, 5U hotstart taq DNA Polimeraz) (Qiagen), 25 mM dNTP mix, 10 pmol CPBDIAGF, CPBDIAGR, NDIAGF2 ve NDIAGR2 primerleri (CPBDIAGF: AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG, CPBDIAGR: TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG, NDIAGF2: CAATTGGAGGGCAAGTCTGGT, NDIAGR2: CCTTCCTATGTCTGGACCTGG) ve 1 µl DNA kullanılmıştır. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde nükleazsız su (Hyclone, katalog no:5H3053802) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı vortekslenip PEQlab PZR cihazında inkübasyona bırakılmıştır. *Cryptosporidium* spp. için elde edilen karışımda kullanılan Nested PZR koşulu Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *Cryptosporidium* spp. için Nested PZR Koşulları

Birinci PZR koşulu			
Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı	İşlem
95	15 dk	1	ilk denatürasyon
94	45 sn		Denatürasyon
66	1 dk		Annealing (yapışma)
72	30 sn	40	extention (uzama)
72	10 dk	1	final extention (son uzama)
İkinci PZR koşulu			
95	15 dk	1	ilk denatürasyon
94	45 sn		Denatürasyon
55	1 dk	40	Annealing (yapışma)
72	1 dk		extention (uzama)
72	10 dk	1	final extention (son uzama)

4.9. RFLP Tekniği

Amplifike edilen Nested PZR ürünleri, *RsaI* restriksiyon enzimi ile 3 saat 37°C’de PEQ lab PZR cihazında kesime tabi tutulmuştur. RFLP reaksiyon karışımı 20 µl son hacimde hazırlanmıştır ve reaksiyon karışımında 1X Reaction Buffer, 5U *RsaI* (Promega), 10 µl Nested PZR ürünü ve nükleazsız su kullanılmıştır. Elde edilen RFLP ürünleri -20°C’de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Her bir test için pozitif ve negatif kontroller kullanılmış ve oluşan ürünler %3’lük LMP (Low Melting Preparative) agaroz jele yüklenip ethidium bromidle boyanmıştır. Jel elektroforezde 100V da 120 dk yürütüldükten sonra UV ışığı altında (Prizma/Quantum ST4) bantlar görüntülenmiştir.

4.12. PZR Ürünlerinin Dizi Reaksiyonu, Dizilerin Elde Edilmesi ve Hizalanması

SSU rRNA gen bölgesini kodlayan PZR ürünleri ve primerler dizi analizi yapılması için düzgünce paketlenerek Güney Kore'deki Macrogen firmasına gönderilmiştir. Ürünlerin saflaştırılma ve okunma işlemi burada yapılmıştır. Verilerin elde edilmesinde BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, dizi ürünleri ABI 3730XL kapillar otomatik sekans aletinde yürütülmüş ve ham veriler bize internet ortamından ulaştırılmıştır. BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak SSU rRNA gen bölgesi için elde edilen ham diziler ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.13. Genetik Verilerin Analizi

SSU rRNA gen bölgesi için hizalanma işlemi yapılmış ve elde edilen dizi dosyaları BioEdit (Hall, 1999) programıyla açılmıştır. Daha sonra SSU rRNA gen bölgesi için GenBank'tan temin edilen veriler (AF108865, AF108864, AF115378, AF112574, AF115377, AF108862, AF112576, AF112573, AY741305, L19068, AF151376, AF316624, AF093496, AB089284, AY524773) eklenmiş ve hizalama işlemi BioEdit (Hall, 1999) içindeki ClustalW (Thompson ve ark., 1994) modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hizalanmış baz dizileri MEGA 5.05 paket programı kullanılarak maksimum olasılık analizleri, genetik uzaklık Kimura-2 parametre modeli ve seç bağla testi (Bootstrapping) 1 000 tekrarla hesaplanmıştır. Filogeni ağacı Neighbour Joining (NJ) algoritmasıyla oluşturulmuştur.

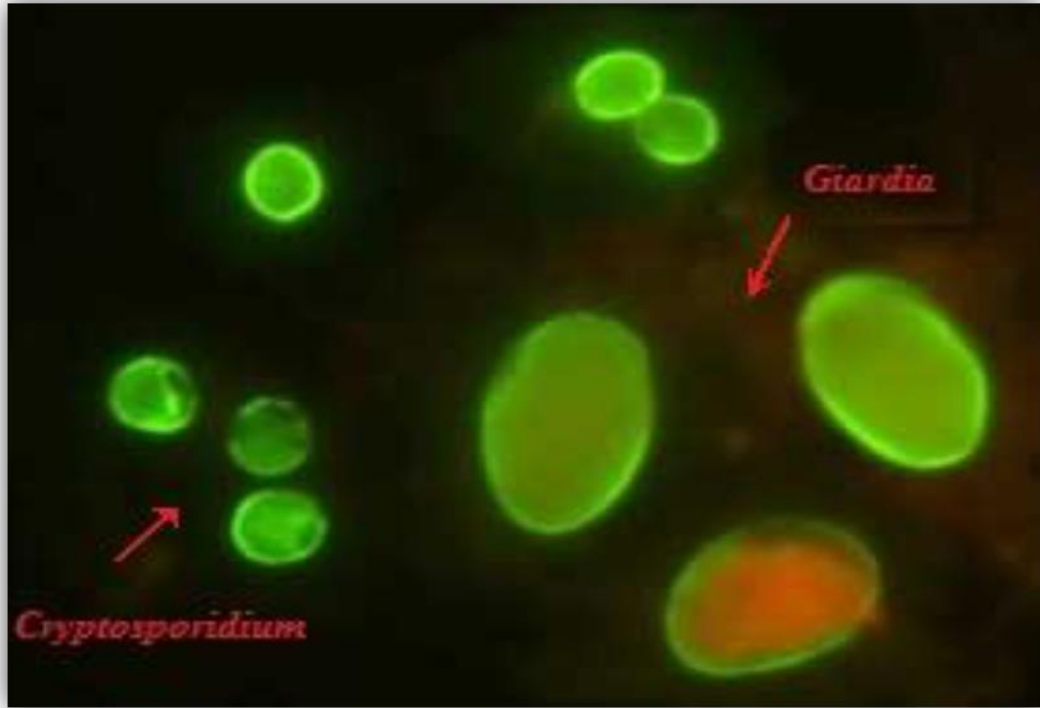
4.13. İstatiksel Analiz

Tanımlayıcı veri analizi mikrossoft excel ve hipotez testi SPSS 18 kullanılarak yapılmış ve "p" değeri ("probability" yani "olasılık"), %5 hatayı kabul edilerek karşılaştırma yapılmıştır. $p < 0.05$ (yani p değeri %5'ten küçük olduğunda) karşılaştırılan istasyonlar ve aylar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuş ve %95 olasılıkla (yani %5 hata ile) güven aralıkları belirlenmiştir. Protozoonların sayım sonuçları SPSS 18 kullanılarak Post-Hock, Tukey analizi ile karşılaştırılmıştır.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. *C. parvum*'un IFA Yöntemiyle Tespit Edilmesi

Çalışmada 2012 Eylül, Ekim, Kasım; 2013 Mart, Nisan, Mayıs; 2013 Eylül, Ekim, Kasım; 2014 Mart, Nisan, Mayıs aylarında Giresun ve Samsun illerinde belirlenen toplam 45 istasyondan 420 çevresel, 120 içme suyu örneklerinde *Cryptosporidium* parazitinin tespiti yapılmak üzere hazırlanan preparatlar IFA yöntemiyle floresan mikroskop altında incelenmiştir. *Cryptosporidium* ookistleri siyah zemin üzerinde yeşil 4-6 µm çapında yeşil renkleriyle görüntülenmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *Cryptosporidium parvum* ookistlerinin IFA yöntemiyle floresan mikroskopunda x1 000 büyütme görüntüsü (Delioğlu, 2012)

Giresun ilinden 20, Samsun ilinden 25 olmak üzere toplamda 45 istasyondan 2 yıl içerisinde 12 ay boyunca toplanan örnekler için IFA tekniği ile *Cryptosporidium* ookistlerinin sayım sonuçları Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2’de verildiği gibidir.

Çizelge 5.1 incelendiğinde, Giresun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde en yüksek değerlere İncivez Deresi'nde 2014 yılı bahar aylarında (Mayıs-45; Nisan-38; Mart-41), 2013 Mayıs ayında Yağlıdere (41) ve Kasım ayında Keşap giriş köprüsü (39) istasyonlarında; en düşük değerlere ise 2013 Mayıs ayında Çayırağzı (0) ve Aksu (0), Eylül ayında Keşap giriş köprüsü (1), 2014 Mayıs ayında Çayırağzı (0) ve Aksu (0) istasyonlarında tespit edilmiştir.

Çizelge 5.2 incelendiğinde, Samsun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde en yüksek değerlere 2014 Mayıs ayında Miliç (85), Akçay (55), Yeşilirmak-II (48) ve Irmaksırtı-I (48), 2013 Mayıs ayında Miliç (57) ve 2014 Nisan ayında Miliç (50) istasyonlarında; en düşük değerlere ise 2014 Mayıs ayında Kürtün Irmağı-I (1) ve Kızılırmak-III (1), 2014 Nisan ayında Kızılırmak-III (1), 2014 Mart ayında Kızılırmak-III (2) ve 2013 Mayıs ayında Mert Irmağı-II (2) istasyonlarında tespit edilmiştir.

Çizelge 5.1. Giresun il ve ilçelerine ait örneklerin IFA tekniğiyle *Cryptosporidium* sayım sonuçları

GİRESUN	2012			2013			2013			2014		
	Eylül	Ekim	Kasım	Mart	Nisan	Mayıs	Eylül	Ekim	Kasım	Mart	Nisan	Mayıs
GELİVERA	8	12	16	13	15	18	13	19	22	5	8	9
YAĞLIDERE	13	20	29	19	29	41	14	21	31	9	14	20
YOLAĞZI	20	17	15	11	7	4	8	5	5	4	3	2
KEŞAP	5	8	12	12	8	5	3	4	6	6	4	2
KEŞAP GİRİŞ KÖPRÜSÜ	1	8	18	11	11	12	3	24	39	10	10	11
AKSU	4	6	7	8	3	0	5	8	9	7	3	0
BOĞACIK	5	5	6	9	6	4	4	6	7	5	4	2
BATLAMA	11	13	18	7	5	3	4	4	6	12	9	5
BÜYÜKGÜRE	6	5	5	21	16	13	12	11	10	9	6	4
BULANCAK	13	7	2	14	12	11	25	12	4	37	21	20
KARADERE	13	10	8	29	20	13	28	27	19	14	10	7
İNCİVEZ	8	7	7	10	10	11	12	11	11	41	38	45
PİRAZİZ	12	11	10	6	5	2	14	13	11	8	7	3
*ÇAYIRAĞZI	8	9	10	14	8	0	4	4	5	5	3	0
*KELOĞLU	5	8	7	7	6	4	8	7	9	18	17	8
*ÇAYIRAĞZI	2	3	4	3	2	2	1	1	2	0	1	1
*BULANCAK	1	1	2	3	2	3	1	3	3	2	1	2
*BATLAMA	1	2	4	0	0	0	1	0	2	4	1	1
*KEŞAP	1	1	2	2	2	1	2	2	3	1	1	0
*GELİVERA	2	2	2	6	4	3	2	2	2	3	2	2

*İşlem görmemiş içme ve kullanma suyu

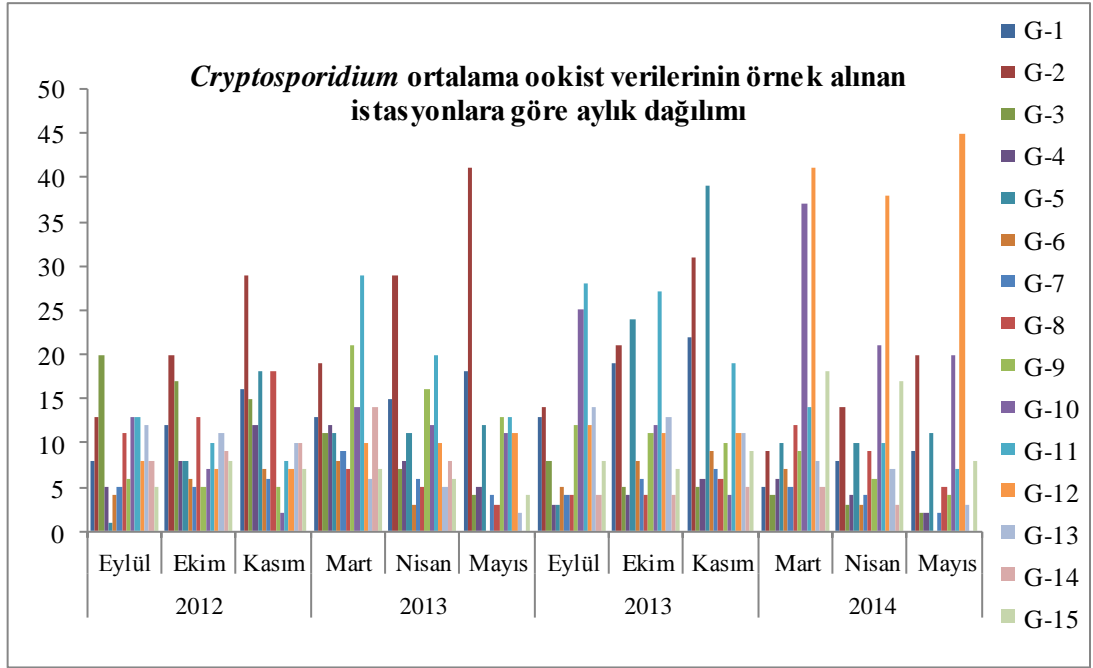
Çizelge 5.2. Samsun il ve ilçelerine ait örneklerin IFA tekniğiyle *Cryptosporidium* sayım sonuçları

SAMSUN	2012			2013			2013			2014		
	Eylül	Ekim	Kasım	Mart	Nisan	Mayıs	Eylül	Ekim	Kasım	Mart	Nisan	Mayıs
AKÇAY	21	16	11	5	11	18	5	4	3	20	44	55
MİLİÇ	19	14	9	7	30	57	15	10	5	12	50	85
TERME Ç. I	30	21	13	8	19	30	10	7	4	14	25	36
TERME Ç. II	27	22	17	11	17	24	7	6	3	11	18	25
TERME Ç. III	20	18	16	4	12	21	10	8	7	9	24	40
YEŞİLIRMAK I	19	15	10	14	16	19	7	6	4	18	20	24
YEŞİLIRMAK II	26	18	15	10	19	28	20	14	10	27	38	48
YEŞİLIRMAKIII	19	16	13	11	16	22	16	13	11	12	17	23
IRMAKSIRTI I	24	20	14	12	15	19	14	12	9	40	44	48
IRMAKSIRTI II	18	13	11	13	15	17	31	17	13	11	13	15
GELEMEN	5	7	9	3	9	15	4	7	8	5	11	17
SELYERİ	15	10	6	6	9	13	14	10	7	6	8	12
KIRAZLIK	18	14	10	6	8	12	27	21	15	9	10	14
MERT IRMAĞI I	9	8	8	9	7	6	10	8	8	11	9	8
MERT IRMAĞI II	14	13	12	12	7	2	14	12	10	8	6	3
KÜRTÜN IRMAĞI I	9	10	11	14	9	4	25	28	30	4	3	1
KÜRTÜN IRMAĞI II	9	11	12	11	8	6	8	9	10	9	6	4
KIZILIRMAK I	12	13	14	13	11	9	14	16	17	11	9	6
KIZILIRMAK II	11	11	12	8	6	5	10	10	11	8	7	4
KIZILIRMAK III	18	11	4	5	4	4	6	4	3	2	1	1
*MERKEZ	1	0	0	0	1	1	1	3	2	3	2	3
*TERME	2	1	0	0	0	0	2	1	1	2	1	1
*ÇARŞAMBA	0	1	1	0	1	1	1	2	2	1	2	0
*TEKKEKÖY	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0	2
*BAFRA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

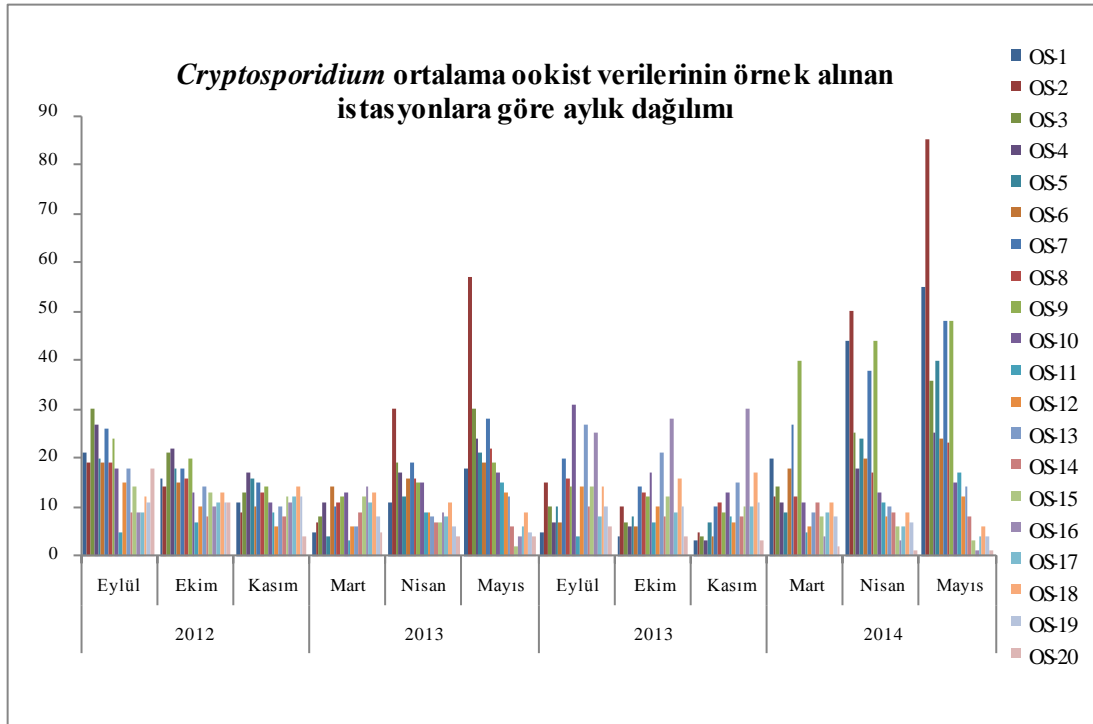
* İşlem görmemiş içme ve kullanma suyu

Giresun ilinden alınan örneklerde *Cryptosporidium* ookist sayımları aylara göre ayrıntılı olarak incelendiğinde (Şekil 5.2); 2013 Mayıs ve 2014 Mayıs aylarında en yüksek değerde olduğu ve bu durumun 2013 Mayıs ayında Yağlıdere (G2) ve 2014 Mayıs İncivez (G12) istasyon verilerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Samsun ilinden alınan örneklerde *Cryptosporidium* ookist sayımları aylara göre ayrıntılı olarak incelendiğinde (Şekil 5.3); Giresun iline paralel olarak 2013 Mayıs ve 2014 Mayıs aylarında en yüksek değerde olduğu ve bu durumun Miliç (OS-2) istasyon verilerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.



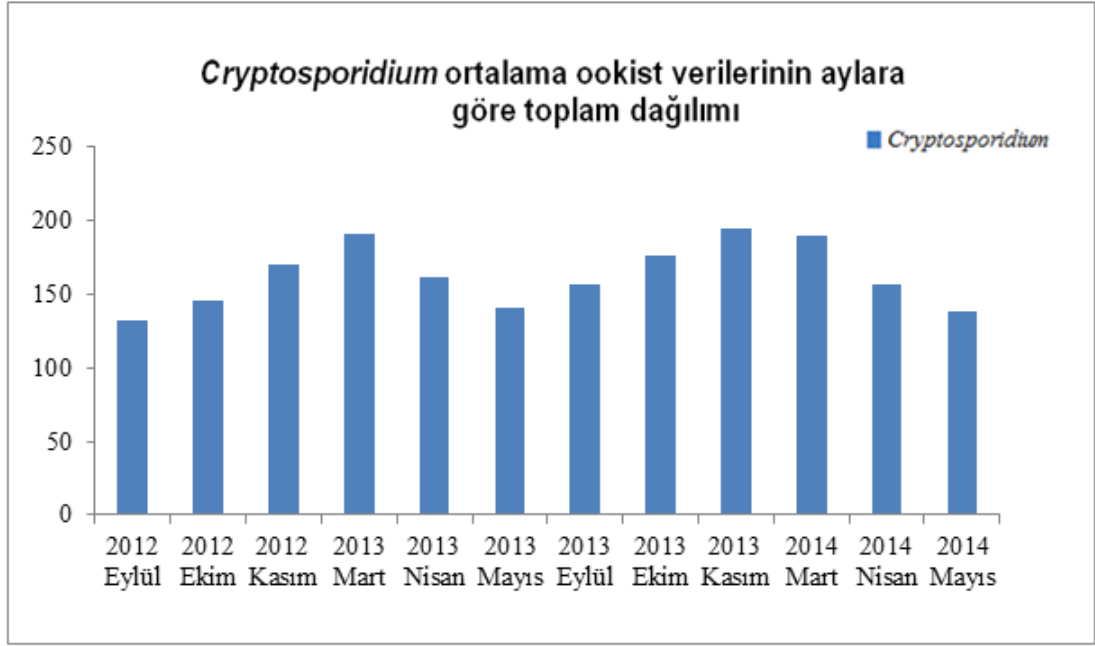
Şekil 5.2. Giresun ili çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* ortalama ookist dağılımı



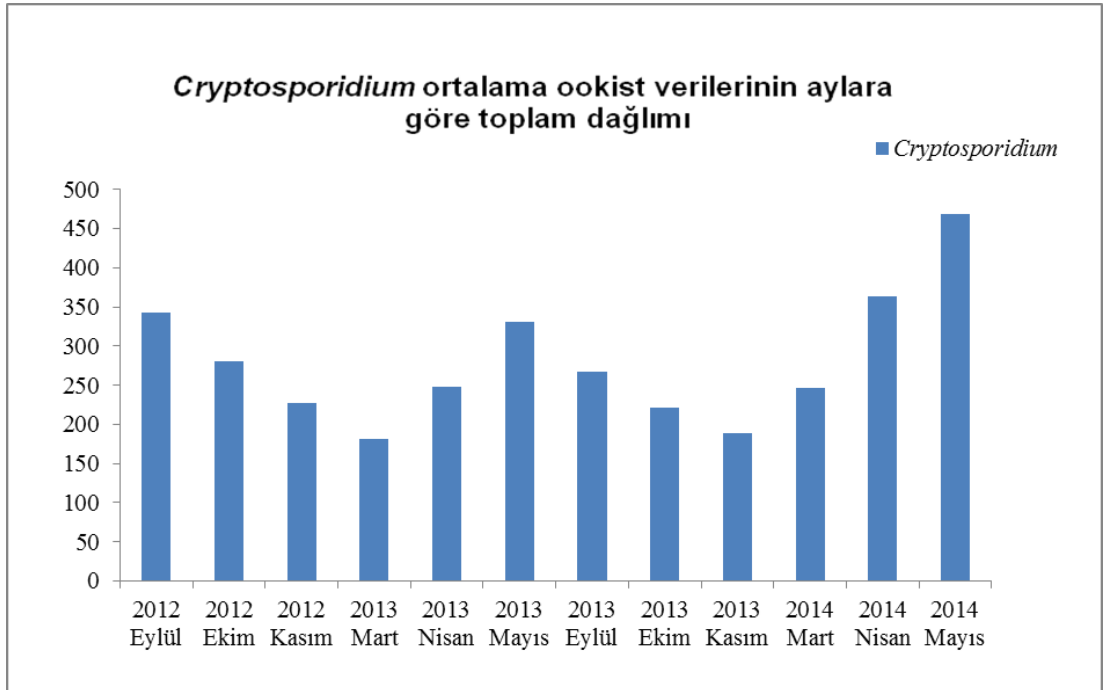
Şekil 5.3. Samsun ili çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* ortalama ookist dağılımı

Giresun ilinde belirlenen 15 farklı istasyondan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* ookisti sayım sonuçlarının aylara göre dağılımı Şekil 5.4’de gösterilmiştir. Giresun ili ve ilçelerine ait örneklerde IFA tekniği ile boyanan *Cryptosporidium* ookist sayımları incelendiğinde, sonbahar mevsiminde ookist sayılarının giderek artış gösterdiği gözlenmiştir. 2013 Mart ve Kasım ayları ile 2014 Mart ayında *Cryptosporidium* ookistlerinin sayımları en yüksek seviyede, 2012 Eylül, 2013 Mayıs ve 2014 Mayıs aylarında en düşük değerler saptanmıştır.

Samsun ilinde belirlenen 20 farklı istasyondan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* ookisti sayım sonuçlarının aylara göre dağılımı Şekil 5.5’de gösterilmiştir. Samsun ili ve ilçelerine ait örneklerde IFA tekniği ile boyanan *Cryptosporidium* ookist sayımları incelendiğinde, ilkbahar mevsiminde ookist sayılarının giderek artış gösterdiği gözlenmiştir. 2012 Eylül, 2013 Mayıs ve 2014 Nisan ve Mayıs aylarında *Cryptosporidium* ookistlerinin sayımları en yüksek seviyede, 2013 Mart ve Kasım aylarında ise en düşük değerler saptanmıştır.



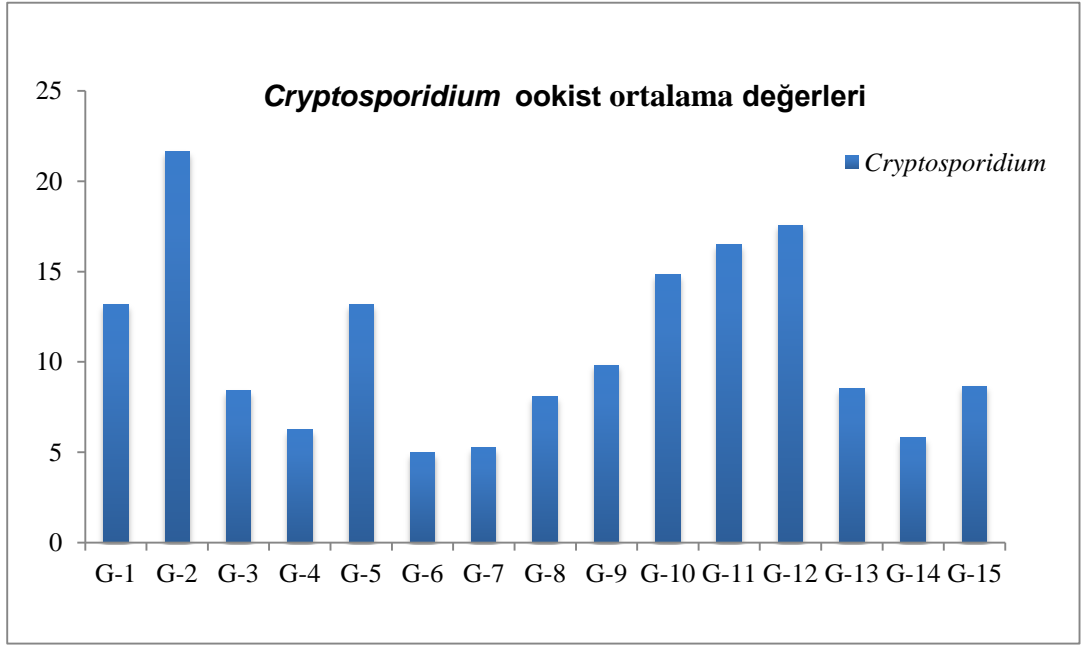
Şekil 5.4. Giresun ili çevresel su örneklerinde aylara göre *Cryptosporidium* ookist dağılımı



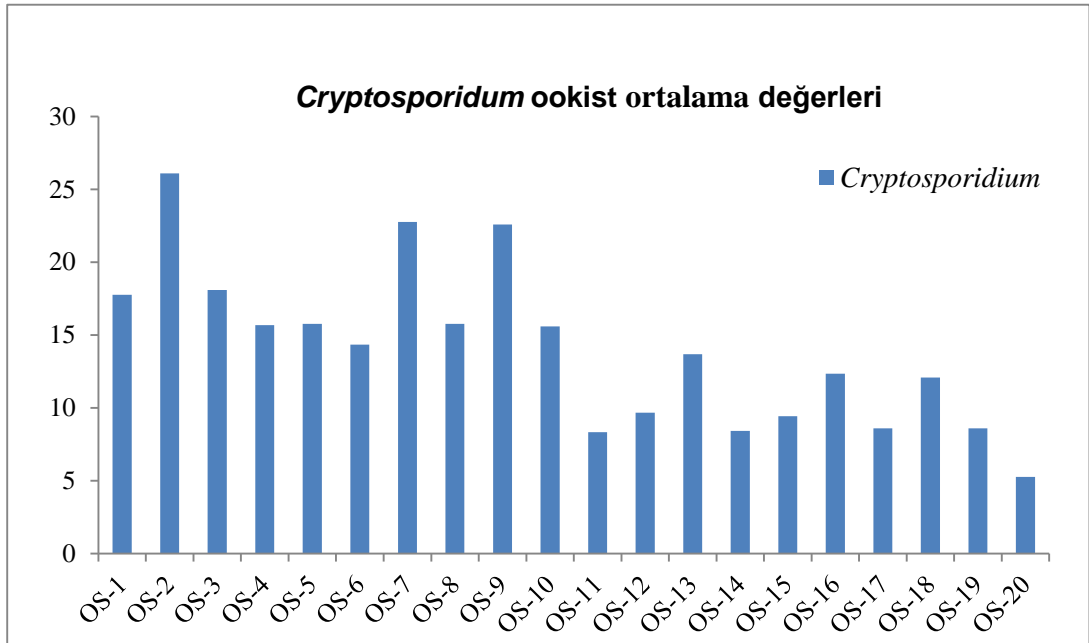
Şekil 5.5. Samsun ili çevresel su örneklerinde aylara göre *Cryptosporidium* ookist dağılımı

Giresun ilinde belirlenen 15 farklı istasyondan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* ookist sayım sonuçlarının dağılımı Şekil 5.6'da gösterilmiştir. *Cryptosporidium* ookisti en fazla Yağlıdere (G2), Karadere (G11) ve İncivez (G12)' de, en az ise Aksu (G6) ve Boğacık (G7) istasyonlarında görülmektedir.

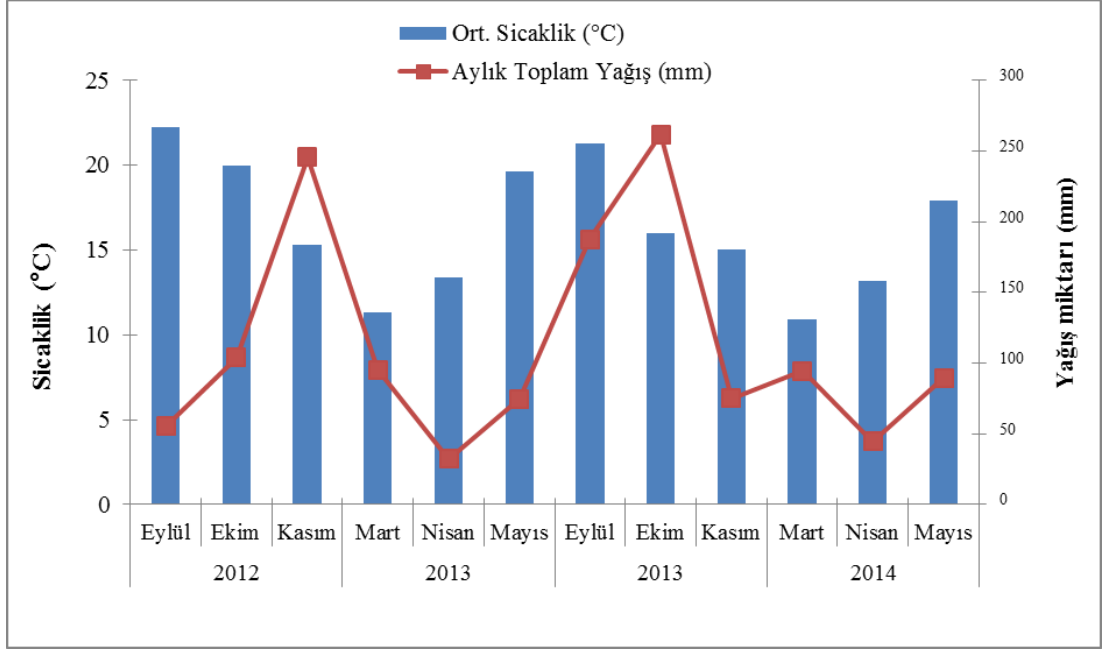
Samsun ilinde belirlenen 20 farklı istasyondan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* ookist kisti sayım sonuçlarının dağılımı Şekil 5.7'de gösterilmiştir. *Cryptosporidium* ookisti en fazla Miliç (OS-2), Yeşilirmak-II (OS-7) ve İrmaksırtı-I'de (OS-9) en az ise Kızılırmak-III (OS-20) istasyonlarında görülmektedir.



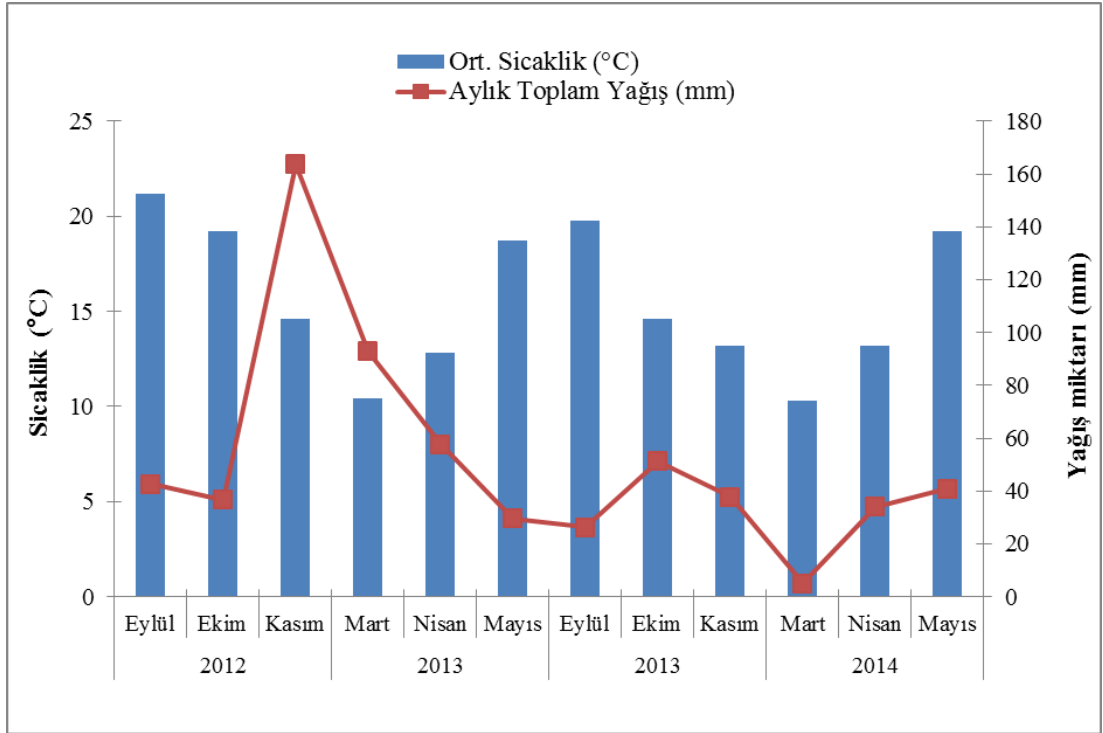
Şekil 5.6. Giresun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* ortalama ookistinin istasyonlara göre ortalama değerleri



Şekil 5.7. Samsun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* ortalama ookistinin istasyonlara göre ortalama değerleri



Şekil 5.8. Giresun ili 2012-2014 yılları arası çalışma dönemi sıcaklık-yağış grafiği



Şekil 5.9. Samsun ili 2012-2014 yılları arası çalışma dönemi sıcaklık-yağış grafiği

Giresun ilinde belirlenen 15 farklı istasyona ait örneklerde IFA tekniği ile sayılan *Cryptosporidium* ookisti sayım sonuçlarının istasyonlara göre ortalama değerlerine uygulanan tek yönlü varyans analizi sonuçları incelendiğinde; örnek alınan istasyonlardan Yağlıdere (G2) noktası ile Yolağzı (G3), Keşap (G4), Aksu (G6), Boğacık (G7), Batlama (G8), Büyükgüre (G9), Piraziz (G13), Çayırağzı (G14) ve Keloğlu (G15) arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 5.3). *Cryptosporidium* ookisti aylık sayım sonuçlarının ortalama değerlerine uygulanan tek yönlü varyans analizi sonuçlarında anlamlı bir farka rastlanılmamıştır (Çizelge 5.4).

Çizelge 5.3. Giresun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki *Cryptosporidium* ookisti değerlerinin istasyonlara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları

Ölçülen ortalama <i>Cryptosporidium</i> ookist değerleri	
İstasyonlar	<i>Cryptosporidium</i> (%95 güven aralığı) min.-max. değerler p değeri *
Gelivera	8.50 (1.35-18.35); p=0.177
Yolağzı	13.25*(3.39-23.10); p=0.001
Keşap	15.41*(5.55-25.27); p=0.000
Keşap Giriş Köprüsü	8.50 (1.35-18.35); p=0.177
Aksu	16.66*(6.80-26.52); p=0.000
Boğacık	16.41*(6.55-26.27); p=0.000
Batlama	13.58*(3.72-23.44); p=0.000
Büyükgüre	11.83*(1.97-21.69); p=0.005
Bulancak	6.83 (3.02-16.69); p=0.528
Karadere	5.16 (4.69-15.02); p=0.893
İncivez	4.08 (5.77-13.94); p=0.984
Piraziz	13.16*(3.30-23.02); p=0.001
Çayırağzı	15.83*(5.97-25.69); p=0.000
Keloğlu	13.00*(3.14-22.85); p=0.001

Çizelge 5.4. Giresun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki *Cryptosporidium* ookisti değerlerinin aylara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları

Ölçülen ortalama <i>Cryptosporidium</i> ookistdeğerleri	
Aylar	<i>Cryptosporidium</i> (%95 güven aralığı) min.-max. değerler p değeri *
Ekim 2012	0.93 (11.19-9.32); p=1.000
Kasım 2012	2.53 (12.79-7.72); p=1.000
Mart 2013	3.93 (14.19-6.32); p=0.982
Nisan 2013	1.93 (12.19-8.32); p=1.000
Mayıs 2013	0.60 (10.85-9.65); p=1.000
Eylül 2013	1.66 (11.92-8.59); p=1.000
Ekim 2013	2.93 (13.19-7.32); p=0.998
Kasım 2013	4.13 (14.39-6.12); p=0.973
Mart 2014	3.86 (14.12-6.39); p=0.984
Nisan 2014	1.66 (11.92-8.59); p=1.000
Mayıs 2014	0.40 (10.65-9.85); p=1.000

Samsun ilinde belirlenen 20 farklı istasyona ait örneklerde IFA tekniği ile sayılan *Cryptosporidium* ookisti sayım sonuçlarının istasyonlara göre ortalama değerlerine uygulanan tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre; örnek alınan istasyonlardan Miliç noktası (OS-2) ile Gelemen (OS-11), Selyeri (OS-12), Mert Irmağı-I (OS-14), Mert Irmağı-II (OS-15), Kürtün-II (OS-17), Kızılırmak-I (OS-18), Kızılırmak-II (OS-19), Kızılırmak-III (OS-20) arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 5.5). *Cryptosporidium* ookisti aylık sayım sonuçlarının ortalama değerlerine uygulanan tek yönlü varyans analizi sonuçlarında Mayıs 2014 ile Kasım 2012, Mart 2013, Nisan 2013, Ekim 2013, Kasım 2013, Mart 2014 ayları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 5.6).

Çizelge 5.5. Samsun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki *Cryptosporidium* ookisti değerlerinin istasyonlara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları

Ölçülen ortalama <i>Cryptosporidium</i> ookistdeğerleri	
İstasyonlar	<i>Cryptosporidium</i> (%95 güven aralığı) min.-max. değerler p değeri *
Akçay	8.33 (5.53-22.19); p=0.823
Terme Çayı-I	8,00(5,86 -21.86); p=0.868
Terme Çayı-II	10.41 (3.44-24.28); p=0.437
Terme Çayı-III	10.33 (3.53-24.19); p=0.453
Yeşilirmak-I	11.75 (2.11-25.61); p=0.220
Yeşilirmak-II	3.33 (10.53-17.19); p=1.000
Yeşilirmak-III	10.33 (3.53-24.19); p=0.453
Irmaksırtı-I	3.50 (10.36-17.36); p=1.000
Irmaksırtı-II	10.50 (3.36-24.36); p=0.421
Miğ Gelemen	17.75*(3.88-31.61); p=0.001
Selyeri	16.41*(2.55-30.28); p=0.005
Kirazlık	12.41 (1.44-26.28); p=0.145
Mert Irmağı-I	17.66*(3.80-31.53); p=0.001
Mert Irmağı-II	16.66*(2.80-30.53); p=0.004
Kürtün-I	13.75 (0.11-27.61); p=0.055
Kürtün-II	17.50*(3.63-31.36); p=0.002
Kızılırmak-I	14.00*(0.13-27.86); p=0.045
Kızılırmak-II	17.50*(3.63-31.36); p=0.002
Kızılırmak-III	20.83*(6.96-34.69); p=0.000

Çizelge 5.6. Samsun il ve ilçelerinden alınan örneklerdeki *Cryptosporidium* ookisti değerlerinin aylara göre tek yönlü varyans analizi sonuçları

Ölçülen ortalama <i>Cryptosporidium</i> ookistdeğerleri	
Aylar	<i>Cryptosporidium</i> (%95 güven aralığı) min.-max. değerler p değeri *
Eylül 2012	6.30 (4.17-16.77); p=0.702
Ekim 2012	9.40 (1.07-19.87); p=0.126
Kasım 2012	12.10*(1.62-22.57); p=0.009
Mart 2013	14.35*(3.87-24.82); p=0.001
Nisan 2013	11.05*(0.57-21.52); p=0.029
Mayıs 2013	6.90 (3.57-17.37); p=0.569
Eylül 2013	10.10 (0.37-20.57); p=0.070
Ekim 2013	12.35*(1.87-22.82); p=0.007
Kasım 2013	14.05*(3.57-24.52); p=0.001
Mart 2014	11.10*(0.62-21.57); p=0.027
Nisan 2014	5.30 (5.17-15.77); p=0.879

5.2. *C. parvum*'un Moleküler Yöntemlerle Tespit Edilmesi

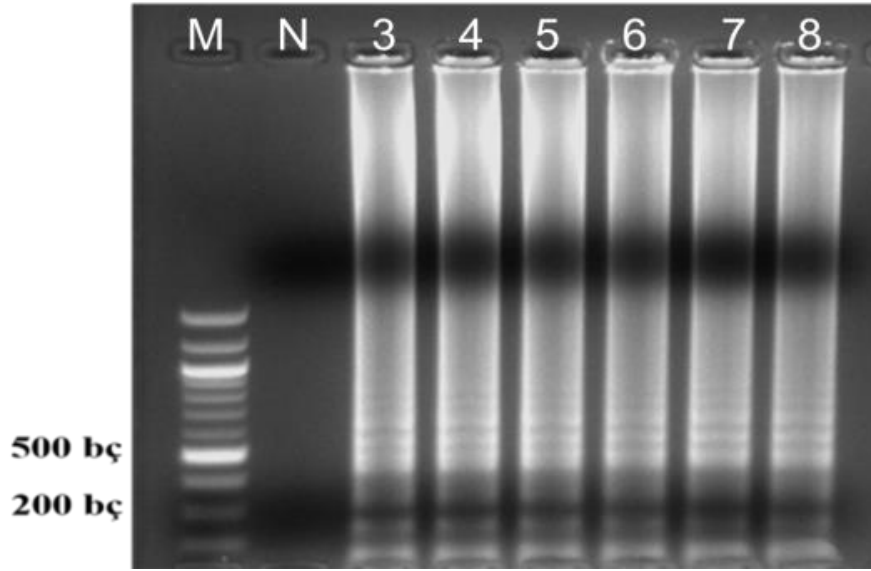
5.2.1. Kullanılan Moleküler Metotların Hassasiyeti ve Özgünlüğü

5.2.1.1. LAMP Metodunun Hassasiyeti ve Özgünlüğü

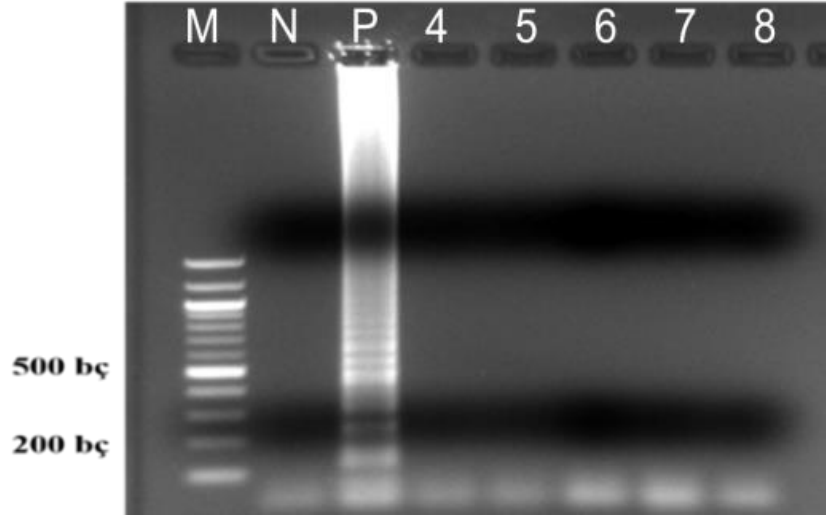
LAMP metodunun hassasiyet deneyi için önce pozitif olduğunu bildiğimiz *Cryptosporidium* IOWA DNA'sından (10 ng) seri sulandırma yapılarak en az hangi konsantrasyonda bu metotla çoğaltılabileceği tespit edilmiştir. Buna göre önce *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı nukleaz içermeyen su kullanılarak 10^{-1} den 10^{-6} 'e kadar seri olarak sulandırılmıştır. Elde edilen farklı konsantrasyonlardaki DNA'lara LAMP tekniği uygulanmış ve elde edilen ürün etidium bromidli

%1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütülen DNA'lar UV ışığı altında (Prizma/Quantum ST4) bantları görüntülenmiştir (Şekil 5.10).

LAMP deneyinin özgünlüğünü göstermek için hedef DNA olarak seçilen *Cryptosporidium*'un dışında hedef DNA olarak seçilmeyen *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*, *Babesia gibsoni*, *G. intestinalis* protozoonları kullanılmıştır. Çalışmada *Cryptosporidium* SAM-1 gen bölgesi hedef olarak seçilmiştir. Sonuç olarak LAMP tekniği ile *Cryptosporidium* DNA'sı çoğalırken diğer protozoa DNA'larında herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Şekil 5.11).



Şekil 5.10. LAMP tekniğiyle çoğaltılan seri sulandırılmış *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı kullanılarak yapılan hassasiyet deneyinin agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bç marker, N: distile su (negatif), 3-8: *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı (sırasıyla 10 ng'dan 100 fg'a kadar)



Şekil 5.11. LAMP tekniğinin özgünlüğünün agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bç marker, N: distile su (negatif), P: *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı, 4: *T. gondii* DNA, 5: *G. lamblia* DNA, 6: *N. caninum* DNA, 7: *B. gibsoni* DNA, 8: *H. hammondi* DNA

LAMP yönteminin hassasiyet çalışmasında *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı 10 ng'dan 100 fg'a kadar sulandırılmıştır. En son 100 fg/ μ l'de *C. parvum* pozitif sonuç vermiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Delioğlu, (2012), Kaya, (2011), Karanis ve ark., (2007), Kolören ve ark., (2011; 2013), tarafından yapılan çalışmalarda da LAMP metodunun hassasiyeti gösterilerek *C. parvum* IOWA DNA'sı 100 fg/ μ L olarak pozitiflik vermiştir.

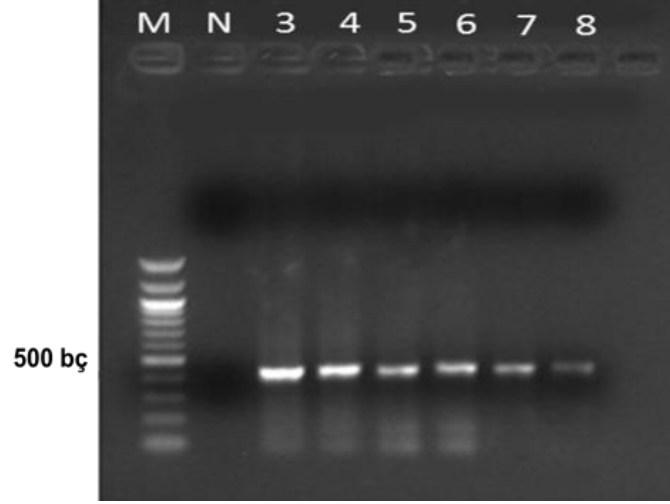
Karanis ve ark., (2007) LAMP deneyinin özgünlüğünü göstermek amacıyla, hedef DNA olarak seçilen *C. parvum*'a ilave olarak hedef DNA olmayan *Trypanosoma brucei*, *Babesia bovis*, *Theileria parva*, *T. gondii* protozoonlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *C. parvum* DNA'sı çoğalırken diğer protozoonlarda herhangi bir çoğalma olmamıştır. Bizim çalışmamızda da LAMP metodunun özgünlüğü gösterilmiş olup, Karanis ve ark.,'nın (2007) yapmış olduğu çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

5.2.1.2. Nested PZR Metotlarının Hassasiyeti ve Özgünlüğü

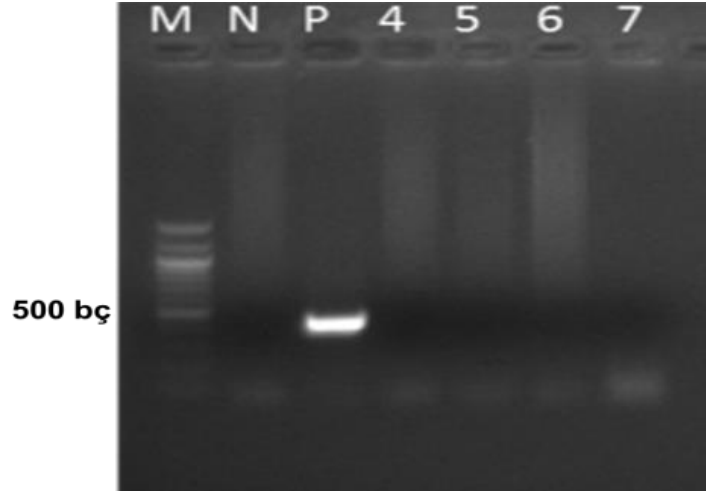
Nested PZR metodunun hassasiyet deneyi için, pozitif olduğu bilinen *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı (10 ng) nükleaz içermeyen su kullanılarak 10^1 'den 10^{-6} 'ya kadar seri olarak sulandırılmıştır. Elde edilen farklı konsantrasyonlardaki DNA'lara Nested PZR metodu uygulanmıştır. Nested PZR

ürünleri ethidium bromidli %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforezde yürütülen DNA'ların UV ışığı altında (Prizma/Quantum ST4) bantları görüntülenmiştir (Şekil 5.12).

C. parvum Nested PZR deneyinin özgünlüğünü göstermek için hedef DNA olarak seçilen *C. parvum*'un yanı sıra hedef DNA olarak seçilmeyen *G. lamblia*, *N. caninum*, *H. hammondi*, *B. gibsoni*, *T. gondii* protozoonları kullanılmıştır. *Cryptosporidium* DNA'sı Nested PZR ile 435 bç'de pozitif sonuç vermiştir. Çalışmanın sonucunda *C. parvum* DNA'sı çoğalırken diğer protozoonlarda herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Şekil 5.13).



Şekil 5.12. Nested PZR tekniği ile çoğaltılan seri sulandırılmış *Cryptosporidium* IOWA DNA'sının agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bç marker, N: distile su (negatif), 3-8: *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı [(sırasıyla 10 ng'dan 100 fg'a kadar) (pozitif)]



Şekil 5.13. Nested PZR tekniğinin özgünlüğünün agaroz jedeki görüntüsü. M: 100 bç marker, N: distile su (negatif), P: *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı, 4: *T. gondii* DNA, 5: *G. lamblia* DNA, 6: *N. caninum* DNA, 7: *B. gibsoni* DNA

Kolören ve ark.,'nın (2011) yaptığı çalışmada Nested PZR tekniğinin hassasiyeti *Cryptosporidium* DNA'sı için 10 ng'dan 100 fg'a kadar pozitif sonuç vermiştir. Bizim çalışmamızda da tıpkı bu çalışmaya benzer olarak *Cryptosporidium* DNA'sı ile Nested PZR tekniğinin hassasiyet deneyi yapılmış olup benzer sonuçlar bulunmuştur.

5.2.2. İstasyonlarımıza Ait Örneklere Uygulanan Moleküler Metodların (LAMP, Nested PZR, RFLP ve Sekans Analiz) Sonuçları

Giresun ve Samsun illerinden alınan 420 çevresel, 120 içme suyu örneklerinden DNA izole edilmiştir ve izole edilen DNA'lara LAMP ve Nested PZR metotları uygulanmıştır. İçme suyu örneklerinde hiçbir metot ile *Cryptosporidium* tespit edilmemiştir. Giresun il merkezi ve ilçelerinden alınan toplam 240 su örneğinde LAMP yöntemiyle 74 (%30.8) ve Nested PZR tekniğiyle 70 (%29.1) örnek pozitif olarak bulunmuştur (Çizelge 5.7).

Çizelge 5.7. Giresun ilinden alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'nin LAMP ve Nested PZR yöntemleriyle karşılaştırılması

Alınan su tipi	İstasyon	İncelenen örnek sayısı	LAMP ile pozitif örnek sayısı	Nested PZR ile pozitif örnek sayısı
İçme suyu		60	0	0
Ara toplam	Bütün istasyonlar	60	%0	%0
% pozitif				
	Giresun-Merkez	48	10	9
	Piraziz	36	10	10
İrmak suyu	Bulancak	36	20	18
	Keşap	36	14	13
	Espiye	24	20	20
Ara toplam		180	74 (%41.1)	70 (%38.8)
% pozitif				
Genel Toplam pozitif (%)		240	74 (%30.8)	70 (%29.1)

Tablo 5.7 incelendiğinde LAMP ve Nested PZR yöntemleriyle *C. parvum*'un pozitif olduğu istasyonlar; Giresun il merkezinde Aksu, Boğacık, Batlama; Piraziz ilçesinde Piraziz, Çayırağzı, Keloğlu; Bulancak ilçesinde Bulancak, Karadere, İncivez; Keşap ilçesinde Keşap, Yolağzı; Espiye ilçesinde Yağlıdere ve Gelivera dereleridir.

Buna göre, Giresun il merkezinden alınan 48 su örneğinin 10'u, Piraziz ilçesinden alınan 36 su örneğinin 10'u, Bulancak ilçesinden alınan 36 su örneğinin 20'si, Keşap ilçesinden alınan 36 su örneğinin 14'ü ve Espiye ilçesinden alınan 24 su örneğinin 20'si; içme suyu ve çevresel suların genel toplamı değerlendirildiğinde ise 240 su örneğinin 74'ü (%30.8) LAMP metoduyla *Cryptosporidium* DNA'sı açısından pozitif olarak tespit edilmiştir.

Giresun il merkezinden alınan 48 su örneğinin 9'u, Piraziz ilçesinden alınan 36 su örneğinin 10'u, Bulancak ilçesinden alınan 36 su örneğinin 18'i, Keşap ilçesinden alınan 36 su örneğinin 13'ü ve Espiye ilçesinden alınan 24 su örneğinin 20'si; içme suyu ve çevresel suların genel toplamı değerlendirildiğinde ise 240 su örneğinin 70'i (%29.1) nested PZR yöntemiyle *Cryptosporidium* DNA'sı açısından pozitif olarak tespit edilmiştir.

Samsun il merkezi ve ilçelerinden alınan toplam 300 su örneği incelenmiş olup LAMP yöntemiyle 101 (%33.6) ve Nested PZR tekniğiyle 92 (%30.6) örnek pozitif olarak bulunmuştur (Çizelge 5.8).

Çizelge 5.8 incelendiğinde LAMP, Nested PZR ve IFA teknikleriyle *C. parvum*'un pozitif tespit edildiği istasyonlar; Samsun il merkezinde Mert Irmağı, Kürtün Irmağı; Terme ilçesinde Miliç, Akçay ve Terme Çayı; Çarşamba ilçesinde Yeşilırmak ve İrmaksırtı; Tekkeköy ilçesinde Kirazlık ve Selyeri dereleri; Bafra ilçesinde-Kızılırmak Nehri'dir.

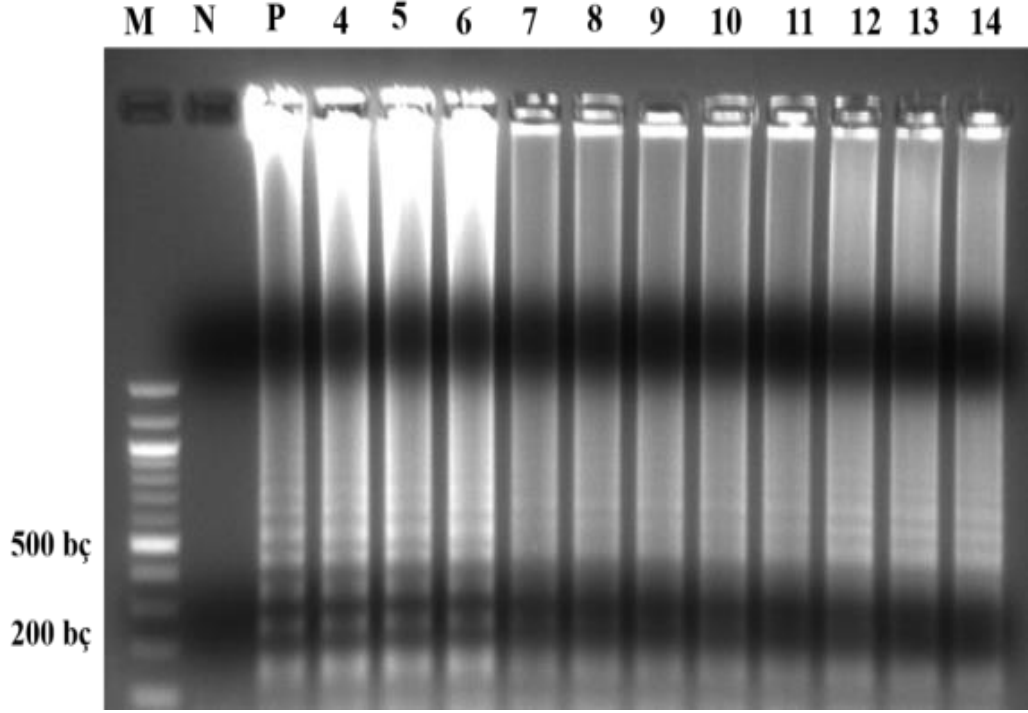
Çizelge 5.8. Samsun ilinden alınan çevresel su örneklerinde *C. parvum*'un LAMP ve Nested PZR yöntemlerinin karşılaştırılması

Alınan su tipi	İstasyon	İncelenen örnek sayısı	LAMP ile pozitif örnek sayısı	Nested PZR ile pozitif örnek sayısı
İçme suyu		60	0	0
Ara toplam	Bütün istasyonlar	60	0%	0%
% pozitif	Samsun-Merkez	48	16	14
	Terme	60	42	42
Irmak suyu	Çarşamba	60	20	17
	Tekkeköy	36	14	11
	Bafra	36	9	8
Ara toplam		240	101 (%42)	92 (%38.3)
% pozitif				
Genel Toplam pozitif (%)		300	101 (%33.6)	92 (%30.6)

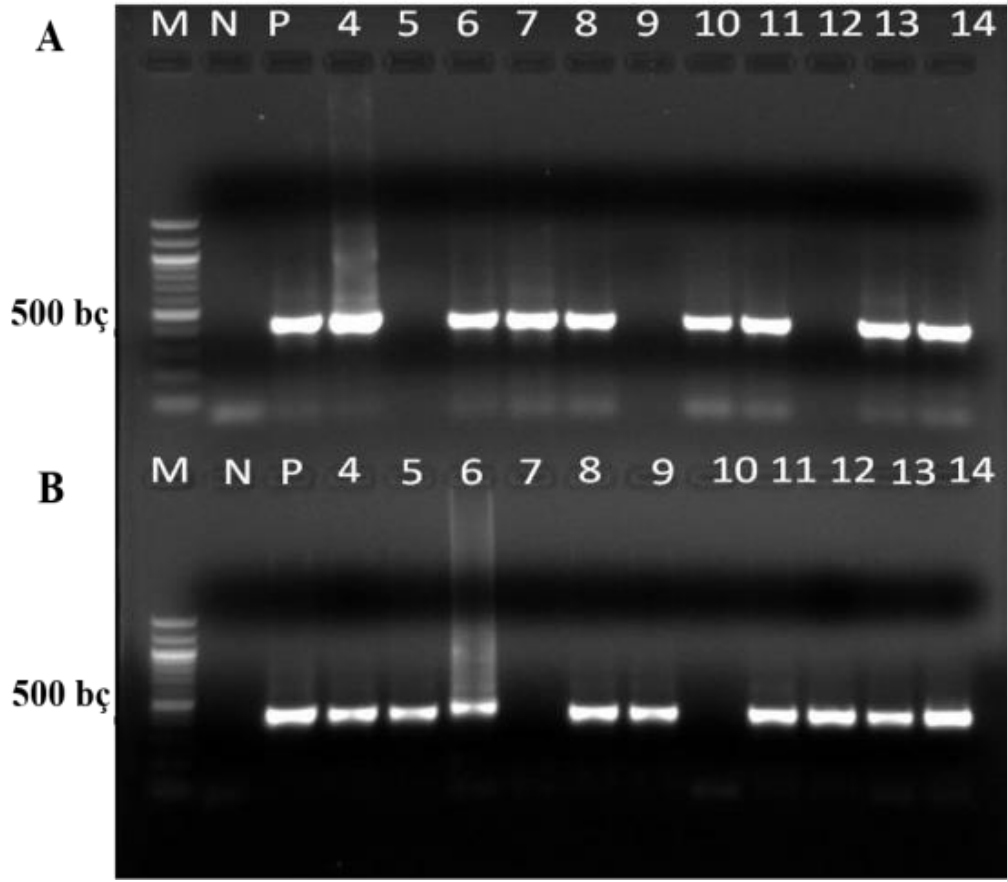
Buna göre, Samsun il merkezinden alınan 48 su örneğinin 16'sı, Terme ilçesinden alınan 60 su örneğinin 42'si, Çarşamba ilçesinden alınan 60 su örneğinin 20'si, Tekkeköy ilçesinden alınan 36 su örneğinin 14'ü, Bafra ilçesinden alınan 36 su örneğinin 9'u; içme suyu ve çevresel suların genel toplamı değerlendirildiğinde ise 300 su örneğinin 101'i (%33.6) LAMP metoduyla *Cryptosporidium* DNA'sı açısından pozitif olarak tespit edilmiştir.

Samsun il merkezinden alınan 48 su örneğinin 14'ü, Terme ilçesinden alınan 60 su örneğinin 42'si, Çarşamba ilçesinden alınan 60 su örneğinin 17'si, Tekkeköy ilçesinden alınan 36 su örneğinin 11'i, Bafra ilçesinden alınan 36 su örneğinin 8'i, içme suyu ve çevresel suların genel toplamı değerlendirildiğinde 300 su örneğinin 92'si (%30.6) Nested PZR yöntemiyle *Cryptosporidium* DNA'sı açısından pozitif

olarak tespit edilmiştir. Giresun ve Samsun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* DNA'sına uygulanan LAMP metodunun (Şekil 5.14) ve Nested PZR metodunun (Şekil 5.15) agaroz jeldeki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 5.14. Giresun ve Samsun illerindeki istasyonlardan alınan su örneklerine ait LAMP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100-bç DNA marker; N: distile su (negatif), P: *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı (pozitif), 4-14 çalışılan su örnekleri



Şekil 5.15. Samsun ve Giresun ili ve ilçelerinden alınan su örneklerine ait Nested PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. A ve B jeli; M: 100-bç DNA marker; N: distile su (negatif), P: *Cryptosporidium* IOWA DNA'sı (pozitif), 4-14 çalışılan su örnekleri

Samsun ve Giresun illerinden alınan çevresel su örneklerinin Nested PZR metodu kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin sekans analizi sonuçları Gen bankasından alınan (National Center for Biotechnology Information-NCBI) AF108865, AF108864, AF115378, AF112574, AF115377, AF108862, AF112576, AF112573, AY741305, L19068, AF151376, AF316624, AF093496, AB089284, AY524773 kodlu 18S rRNA *Cryptosporidium* gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen 18 Nested PZR ürününün sekansı başarılı bir şekilde alınmıştır. Çizelge 5.9 ve Çizelge 5.10'da sekans ve LAMP yöntemlerinin sonuçları gösterilmiştir.

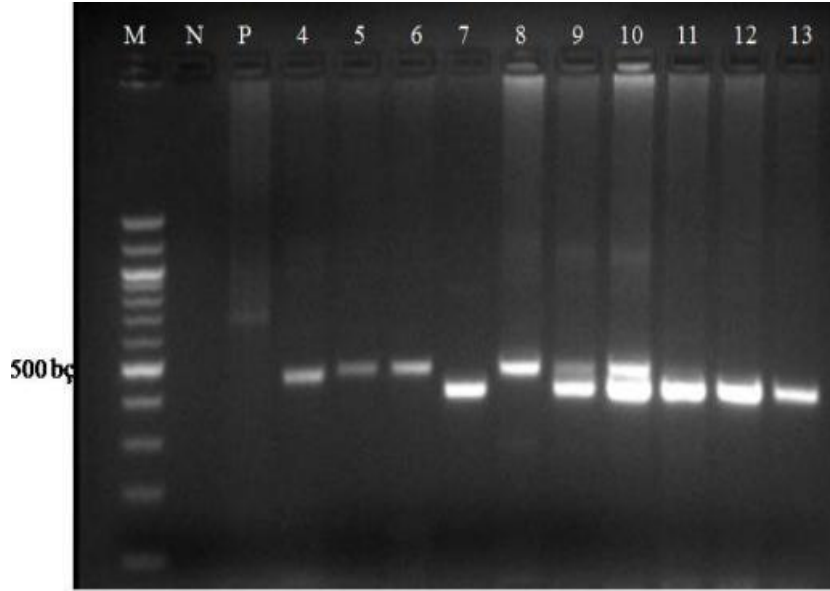
Çizelge 5. 9. Gziresun ili çevresel ve içme sularına uygulanan LAMP ve Nested PZR ürünlerinin sekans sonuçları

İstasyonlar	18S rRNA Nested PZR ve sekans sonuçları <i>Cryptosporidium</i>	SAM-1 LAMP <i>Cryptosporidium</i>
Giresun İl Merkezi		
Aksu	-	-
Boğacık	-	-
Batlama	-	+
Büyükgüre	-	+
Piraziz		
Piraziz	-	-
Çayrağzı	-	-
Keloğlu	+	+
Bulancak		
Bulancak	+	+
Karadere	-	+
İncivez	+	+
Keşap		
Yolağzı	-	-
Keşap	-	-
Keşap giriş köprüsü	+	+
Espiye		
Gelivera	+	+
Yağlıdere	+	+
İşlem görmemiş sular		
Çayrağzı	-	-
Bulancak	-	-
Batlama	-	-
Keşap	-	-
Gelivera	-	-

Çizelge 5.10. Samsun ili çevresel ve içme sularına uygulanan LAMP ve Nested PZR ürünlerinin sekans sonuçları

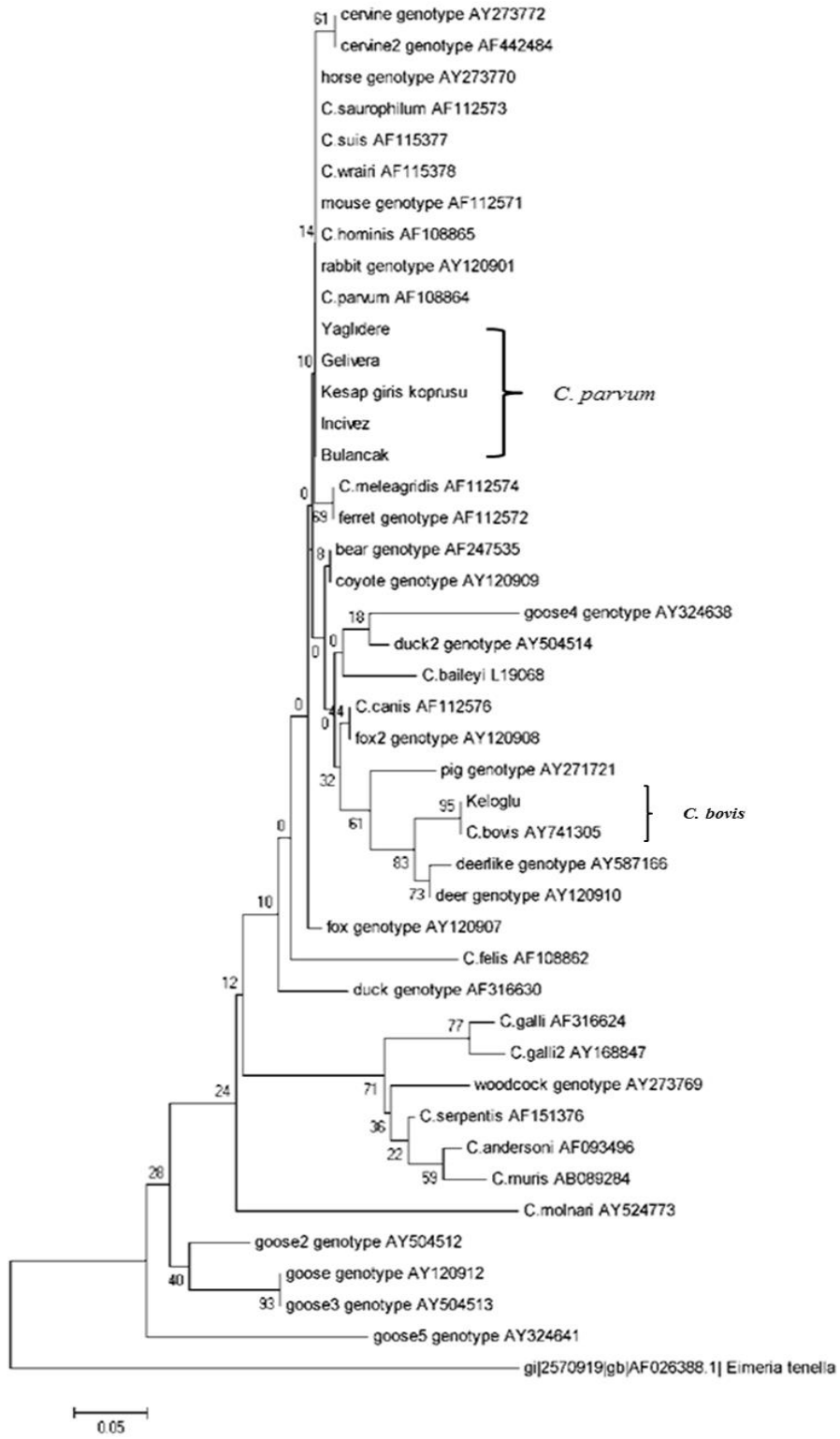
İstasyonlar	18S rRNA Nested PZR ve sekans sonuçları <i>Cryptosporidium</i>	SAM-1 LAMP <i>Cryptosporidium</i>
Samsun İl Merkezi		
Mert Irmağı-I	-	+
Mert Irmağı-II	-	-
Kürtün Irmağı-I	-	-
Kürtün Irmağı-II	-	-
Terme		
Akçay	+	+
Miliç	+	+
Terme Çayı-I	+	+
Terme Çayı-II	+	+
Terme Çayı-III	+	+
Çarşamba		
Yeşilirmak-I	+	+
Yeşilirmak-II	+	+
Yeşilirmak-III	+	+
Irmaksırtı-I	+	+
Irmaksırtı-II	+	+
Tekkeköy		
Gelemen	+	-
Selyeri	-	+
Kirazlık	-	+
Bafra		
Kızılırmak-I	-	+
Kızılırmak-II	-	-
Kızılırmak-III	-	-
İşlem görmemiş sular		
Samsun Merkez	-	-
Terme	+	-
Çarşamba	-	-
Tekkeköy	-	-
Bafra	-	-

Çalışmada toplanan su örneklerinde Nested PZR metodu ile pozitif olduğu belirlenen örneklere ait Nested PZR ürünleri *RsaI* enzimi ile kesilmiş ve restriksiyon ürünleri %3'lük LMP agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir. *RsaI* enzimiyle kesim sonrasında 413 bp gösteren örneklerin *C. parvum*'a ait oldukları belirlenmiştir (Şekil 5.16)

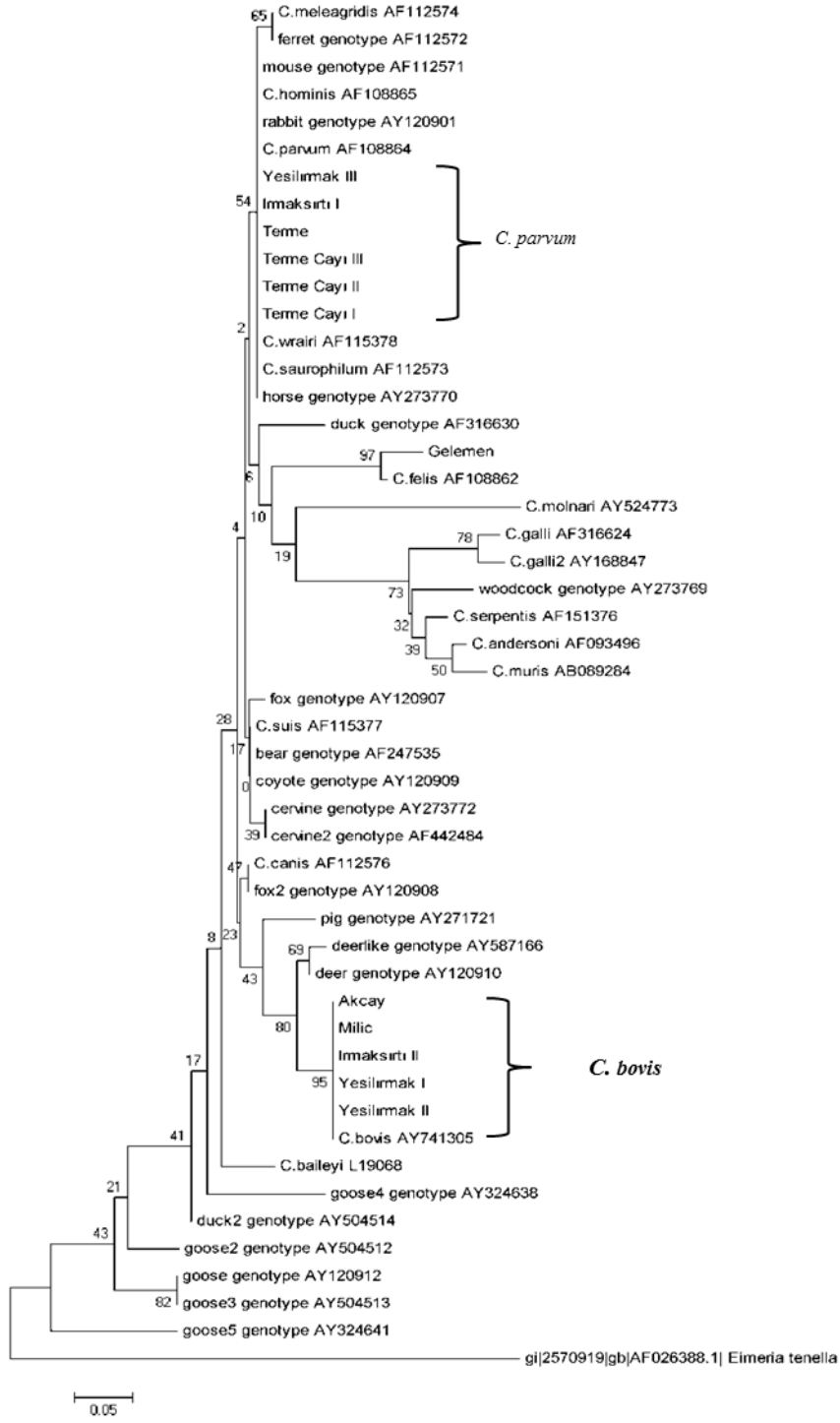


Şekil 5.16. Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerine ait Nested PZR ürünlerinin *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu agaroz jeldeki görüntüsü; M:100 bp DNA marker; N: (distile su) negative, P: *C. parvum* DNA'sı, 4–13: çalışılan su örnekleri

Sekans analizi sonucunda elde edilen hizalanmış baz dizileri MEGA 5.05 paket programı kullanılarak maksimum olasılık analizleri, genetik uzaklık Kimura-2 parametre modeli ve seç bağla testi (Bootstrapping) 1 000 tekrarla hesaplanmıştır. Filogeni ağacı Neighbour Joining (NJ) algoritmasıyla oluşturulmuştur. Sonuç olarak; Giresun ilinin Keloğlu bölgesinden alınan su örnekleri *C. bovis* olarak tanımlanırken, Bulancak, İncivez, Keşap, Gelivera ve Yağlıdere bölgelerinden alınan su örnekleri ise *C. parvum* olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.17). Samsun ilinden alınan su örneklerinde ise Akçay, Miliç, İrmaksırtı-II, Yeşilirmak-I ve Yeşilirmak-II istasyonlarından alınan su örnekleri *C. bovis* olarak belirlenirken, Yeşilirmak-III, İrmaksırtı-I, Terme, Terme Çayı-I, Terme Çayı-II ve Terme Çayı-III istasyonlarından alınan su örnekleri *C. parvum* olarak belirlenmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.17. Giresun ilinden alınan örneklerde SSU rRNA gen bölgesine ait NJ filogeni ağacı



Şekil 5.18. Samsun ilinden alınan örneklerde SSU rRNA gen bölgesine ait NJ filogeni ağacı

Cryptosporidium türlerinin insanlarda ve pek çok hayvan türünde, değişik derecelerde ishal tablosu ile karakterize hastalık oluşturabildiği belirtilmiştir (Casemore ve ark., 1985; Türkçapar, 2001; Aysal, 2004; Hazer, 2007). Her geçen yıl, bağışıklık sistemi baskılanmış olguların sayısındaki artış ve bağışıklık sistemi sağlam kişilerde büyük salgınların saptanması kriptosporidiyozun önemini arttırmaktadır. *C. parvum*'un da dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, insanlarda ishale neden olan en yaygın üç patojenden biri olduğu bildirilmiştir (Menedez ve ark., 1991; Laime ve ark., 1994; Delioğlu, 2012).

Parazitin bulaşımı ile ilgili ulaşılan kaynak bilgilerde; Hayvan gübrelerinin yaygın bir biçimde toprağa bırakılması sonucu, aerosol yayılmayla direk olarak veya su kaynaklarının kontaminasyonu ile indirekt olarak enfeksiyon oluşabileceği saptanmıştır. *C. parvum*'un doğada yaygın olarak bulunmasının nedeni ookistlerin her zaman infektif olması, oldukça küçük olmaları (3.5-6.0 µm) ve düşük sedimentasyon oranına (0.5 m/s) sahip olmalarından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Fayer, 2000). Yine su kaynaklı bulaşım ile ilgili olarak ilk olgular 1983'te Finlandiya'dan, Rusya'nın St. Petersburg kentine seyahat eden ve ishali bulunan Finlandiyalı kişilerde tanımlanmıştır (Eren, 2011). Kuzey Amerika'da da 1985 yılında *C. parvum*'un içme suyu kaynaklarını kontamine etmesiyle ilk içme suyu kaynaklı salgın rapor edilmiştir (MacKenzie ve ark., 1994; Över, 1996; Strausbaugh, 2000). Ookistlerin, dokunulmamış yüzey sularında, filtre edilmiş yüzme havuzu suyunda, hatta klorlanmış veya filtre edilmiş içme sularında dahi bulunabildiği belirlenmiştir (Chen ve ark., 2002). Enfekte kişilerle direk temas halinde olan insanlarda, umumi yüzme havuzlarını kullanan kişilerde, bu hastalığın yoğun olarak bulunduğu yerlere seyahat edenlerde HIV pozitif kişiler, organ transferi yapılanlar, kemoterapi tedavisi devam eden insanlar, böbrek hastaları, çocuk yuvaları veya çocukların bulunduğu günlük bakım merkezlerinde çalışanlar, ülkelerarası yolculuk yapanlar (yolculuk ishali), izciler, kampçılar gibi işlenmemiş su kaynaklarından su içmek zorunda kalanlar bu parazitin bulaşmasında risk grupları olarak saptanmıştır (Türkçapar, 2001; Aysal, 2004; Kaya, 2011). Benzer çalışmalarda, Şahin ve arkadaşlarının İzmir'in Buca ilçesine bağlı bir köyde yaşayan ve ishali olan 191 köylüye ait dışkı örneklerinin Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle 191 hastanın 15'inde (%7.9) *Cryptosporidium* spp.

ile birlikte olmak üzere 9 *C. cayatenensis* tespit edilmiştir. Yoğun yağış ile birlikte ortaya çıkan bu salgında, olası şüpheli kaynağın köye su sağlayan kontamine şebeke suyu deposu olduğu düşünülmüştür (Dağ, 2010).

Türkiye’de sulara yapılan ilk parazitolojik çalışmada ise 1997-1999 yılları arasında İstanbul’da Kağıthane, Büyükçekmece, Ömerli ve Elmalı barajlarındadır. Bu barajlardan temin edilen 40 ham su örneği *Cryptosporidium* spp. ve *G. intestinalis* yönünden incelenmiş ve örneklerinin hiçbirinde *Giardia* kisti ve *Cryptosporidium* ookistinin tespit edilmediği bildirilmiştir (Köksal, 2002; Terzi, 2005).

Parazitin sulara epidemiyolojisi ile ilgili ulaşılan kaynak bilgilerde ise *Cryptosporidium* ookistlerinin suda geniş bir yayılım gösterdiği, yüzey suları ve atık sulara %100; içme suyu örneklerinde de %37 oranında bulunduğu bildirilmiştir (Smith ve Rose, 1998; Kaya, 2011). Kriptosporidiyozun etkili bir tedavisinin bulunmamış olması, ookistlerin çevresel şartlara ve klorlamaya dirençli olup, nemli ortamda aylarca canlı kalabilmeleri nedeniyle büyük çapta salgın oluşturma riski taşıyabildiği belirtilmiştir. Yine bir çalışmada ABD’nin Milwaukee şehrinde su şebekesinde kanalizasyondan kaynaklanan bir kontaminasyon sonucu 1993 yılında 43 000 kişinin enfekte olduğu bildirilmiştir. Yine aynı yıl ABD’de Maine’de kontamine elma suyundan (pastörize edilmemiş) 213 kişi hastalanmıştır. 2015 yılına kadar Gıdalar ve içme-kullanma suları dışında; gübrelenmiş, taze olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzelerden kaynaklanan farklı enfeksiyon vakaları da bildirilmiştir. Sonuç olarak Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından Bakteriyolojik Çözümleme El Kitabı’nın 7. baskısına sebzelerde *Cryptosporidium* türlerinin analizine de eklemiştir. (Lucio-Forster ve ark., 2004; Uyar ve Özkan, 2009). Yine Kolören ve Delioğlu (2011), Amasya ili ve ilçelerinde 10 farklı istasyondan alınan çevresel ve içme suyu örneklerinde *Cryptosporidium* spp.’nin varlığını tespit edebilmek için IFT yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada Eylül 2010 ve Ağustos 2011 tarihleri arasında her ay periyodik olarak alınan toplam 100 su örneğinin 66’sı (%73.30) *Cryptosporidium* spp. için pozitif olarak bulunmuştur. Fakat çalışmada toplanan içme suyu örneklerinde *Cryptosporidium* spp.’nin varlığına rastlanılmamıştır. Yapılan çalışmada da benzer olarak içme suyu örneklerinde *Cryptosporidium* spp.’nin

varlığına rastlanmazken, Giresun ilinde 180 çevresel su örneğinin 170'inde (%94.4) 1-45 *Cryptosporidium* ookisti/L, Samsun ilinde ise 240 çevresel su örneğinin 214'ünde (%89.16) 1-85 *Cryptosporidium* ookisti/L pozitif olarak bulunmuştur.

Parazitin mevsimlere göre dağılımın araştırıldığı çalışmada, Wilkes ve ark., (2009) tarımsal arazilerin bulunduğu bölgelerdeki yüzey sularında *Cryptosporidium* ookisti, *Giardia* kisti, patojenik bakteriler ve indikatör bakteriler arasındaki mevsimsel ilişkiyi incelemişlerdir. Elde edilen bilgilere göre sonbahar ve kış dönemlerinde indikatör bakterilerle beraber parazitlerin sayılarında artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmada da benzer olarak Samsun ili örneklerinde ilkbahar aylarında (Mart, Nisan ve Mayıs), Giresun ilinde de sonbahar (Eylül, Ekim, Kasım) aylarında *Cryptosporidium* ookist sayımlarının giderek artış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada bahar aylarında parazitin yaşam döngüsündeki yeterli ısı ve nemin olması nedeniyle ookist sayısında artışın olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada elde edilen Giresun ilinin sonuçlarına benzer olarak Mons ve ark., (2009) Paris ve çevresinde *Cryptosporidium* ookist sayılarının sonbahar mevsiminde diğer mevsimlere göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Hashwey ve arkadaşları da (1997), ilkbahar aylarında *Cryptosporidium*'un fazla görülmesinin nedenini, fazla yağın yağmur ve nemli havanın, içme suyu ve çevresel sularda daha fazla kontaminasyona sebep olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada, Samsun ilinde ilkbahar aylarında (Mart, Nisan ve Mayıs) ortalama yağış miktarı azalırken, *Cryptosporidium* ookist sayıları giderek artış göstermiştir. Ayrıca 2012, 2013 Eylül, Ekim ve Kasım aylarında ise *Cryptosporidium* ookist sayılarında düzenli bir azalma tespit edilmiştir. Her ne kadar ilkbahar aylarında *Cryptosporidium* ookist sayımlarındaki artış Hashwey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer sonuçlar vermiş olsa da ortalama yağış miktarı açısından benzerlik gözlenmemiştir. Bu durum, araştırma yapılan bölgedeki iklim şartlarından, örneklerin hayvancılığın yoğun yapıldığı bölgelerden alınmasından ve örnek alınan bölgede fazla miktarda bulunan atık suların, kaynaklanmış olabilir. Giresun ili için sonbahar döneminde yağışlar giderek artış gösterirken ilkbaharda azalarak seyretmiştir. Ayrıca Giresun'da

ilkbahar aylarında *Cryptosporidium* ookist sayımlarında giderek azalma gözlenirken, sonbahar aylarında ookist miktarlarında artış gözlenmiştir. Giresun ilinden elde edilen sonuçlar Hashwey ve arkadaşlarının çalışması ile benzer sonuçlar vermiştir.

Cryptosporidiumun tespitinde direk mikroskopi, boyama, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Parazitin tansında moleküler yöntemlerin (PZR ve antijen tanıma testleri) spesifik ve duyarlı olduğu bildirilmiştir (Cama ve ark., 2003).

Yine Sungur ve ark., (2008), tarafından *Cryptosporidium* türlerinin tespitinde PZR tekniğinin, boyama ve diğer pek çok tanı yöntemlerine göre çok daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Kötü koşullarda muhafaza edilmiş örneklerde etkenin tespit edilmesi konusunda avantajlar sağlayan PZR tekniğinin, ELISA yöntemine göre 103-104 kat daha duyarlı olduğu ve bu durumun aynı şekilde IFA için de geçerli sayılabileceği belirtilmiştir. Basit PZR ile amplifiye edilen DNA'ların, ortama yeniden eklenen daha spesifik bölgelere yönelik primerlerle tekrar amplifiye edilmesi esasına dayanan Nested PZR tekniğinin, klasik tek aşamalı PZR tekniğine göre 4-5 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Gatei ve ark., (2003) benzer olarak *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanmasında 840 baz çiftine sahip olan 18S rRNA genini kullanmışlardır. Yapmış oldukları genotiplendirme sonucunda 4 tip *Cryptosporidium* tanımlamışlardır. İzolatların %75'ini *C. parvum* insan genotipinde, %21.7'sini *C. parvum* inek genotipinde, %1.6'sını *C. meleagridis* genotipinde, %1.6'sı *C. muris* genotipinde tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda 18S rRNA gen lokusu kullanılarak yapılan genotiplendirmenin filogenetik analizlerde kolaylık sağlayabileceği rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada da diğer çalışmalara benzer olarak moleküler tekniklerden Nested PZR ve RFLP yöntemleri kullanılarak parazitin tespiti yapılmıştır. Pozitif bulunan örnekler RFLP yöntemi ile *C. parvum* olarak saptanmıştır.

Parazitin tanısında kullanılan tekniklerden biri LAMP yöntemidir. LAMP tekniği enfeksiyon hastalıklarının nedeni olan etkenin sınıflandırmasında kullanılan nükleik asit amplifikasyon testlerindedir (NATs) (Notomi ve ark., 2000). LAMP'in

başarılı sonuçları, bu tekniğin kriptosporidiyoz (Karanis ve ark., 2007; Bakheit ve ark., 2008), toxoplazmoz (Sotiriadou ve Karanis, 2008) ve giardiyoz (Plutzer ve Karanis, 2009) gibi protozoon hastalıklarının teşhisi için uygun olabileceği bildirilmiştir.

Türkiye’de su kökenli *Cryptosporidium* ile yapılan çalışma sınırlı düzeydedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu alandaki boşluğu doldurmaya yöneliktir. Türkiye’de LAMP yöntemiyle su kökenli protozoonları tespit etmede kullanılan çalışmalar bulunmaktadır. Kolören ve ark., (2011), Ordu bölgesinde yapmış oldukları çalışmada farklı su kaynaklarından alınan toplam 70 su örneğinde IFT, LAMP ve Nested PZR yöntemlerini kıyaslayarak *Cryptosporidium* spp.’nin varlığını tespit etmişlerdir. İncelenen bu 70 su örneğinden 18 (%25.70)’i IFT yöntemiyle; 19’u (%27.10) LAMP yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Yapılan çalışmanın güvenilirliğini test etmek için rastgele seçilen 16 örnek 10 adet *Cryptosporidium* oookistleri ile kontamine edilmiştir. Kontamine edilen örneklerin hepsi hem LAMP tekniği hem de Nested PZR yöntemiyle testlenerek, örneklerin hepsinin LAMP tekniğinde pozitif bulunduğu, Nested PZR yöntemiyle ise sadece 7 örneğin pozitif olduğu gözlenmiştir. Bu durum LAMP tekniğiyle, Nested PZR yöntemine göre daha hassas sonuçlar alınabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Mevcut çalışmada da benzer olarak Samsun ili ve ilçelerinden alınan toplam 240 çevresel su örneğinin 101’i (%42) LAMP yöntemiyle, 92’si (%38.3) Nested PZR yöntemiyle; Giresun il ve ilçelerinden alınan 180 çevresel su örneğinde LAMP yöntemiyle 74 (%41.1), Nested PZR ile 70 (%38.8) örnek pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada incelenen toplam 120 içme suyu örneklerinin hepsi bu yöntemler ile negatif sonuç vermiştir. Yine Sinop ve Ordu bölgelerinin deniz ve şebeke sularında *Cryptosporium* spp. kontaminasyonuna yönelik yapılan moleküler çalışmada 128 su örneği toplanmıştır. Ordu ilinden alınan 70 örneğin 43’ünde; Sinop ilinden toplanan 58 örneğin 35’inde IFT yöntemiyle *Cryptosporidium* oookistleri tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada SAM-1 geni LAMP analizleri sonucunda *C. parvum*, *C. hominis* ve *C. meleagridis* için %65.50 oranında, SSU rRNA geni Nested PZR analizinde ise %31 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Kolören ve ark., 2012). Bu çalışmada da LAMP tekniğinin *Cryptosporidium*’u tespit etmede Nested PZR yöntemine göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir.

Kolören ve Demirel'de (2013), Ordu ili Melet Irmağı'nın beş farklı noktasında yaptıkları çalışmada MAF yöntemini kullanarak *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada moleküler teknik olan LAMP metodu kullanılarak bütün istasyonlarda bu parazitin varlığı pozitif olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada da Samsun ve Giresun illerinden alınan toplam 540 çevresel su örneğinden 175'i (%32.4) LAMP metodu ile pozitif olarak bulunmuştur.

Kolören ve ark., (2010), LAMP tekniğiyle *C. parvum* ve *G. lamblia* gibi parazitleri kısa zamanda tespit etmenin mümkün olduğunu bildirmişlerdir. LAMP yönteminin yüksek duyarlılığı, ekonomik ve kolay uygulanabilir olması birçok alandaki tanı laboratuvarlarında bu tekniğin kullanımının mümkün olduğunu belirtmişlerdir. PZR tanı testinin aksine LAMP tekniği için etkili bir DNA amplifikasyonunda tamamen saf halde elde edilmiş DNA'ya gereksinim olmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar standart bir PZR için harcanan zamanın üçte biri kadar daha kısa sürede sonuç almanın mümkün olduğu saptamışlardır.

Alhassan ve ark., (2007), tarafından da Bulgaristan'da 7 ırmak suyundan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerini belirlemek için LAMP tekniğiyle PZR yöntemi kıyaslanmıştır. Alınan su örneklerinin 7'sinde de LAMP tekniği ile *Cryptosporidium* DNA'sı çoğaltılırken, PZR tekniğiyle hiçbir örnekte *Cryptosporidium* DNA'sını belirlememişlerdir.

Mevcut çalışmada, Giresun ve Samsun il ve ilçelerinde belirlenen farklı istasyonlardan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* spp. parazitin moleküler teknikler kullanılarak varlığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre araştırma alanının bu parazitlerle kontamine olduğu gözlenmiştir. Bölgede su kirliliğine bağlı enfeksiyonların gerçekleşmemesi için öncelikle su kaynaklarının düzenli olarak kontrol edilmesi gerekmektedir. Kırsal alanlarda yeterli altyapının ve su arıtma sistemlerinin olmaması, dolayısı ile lağım sularının hiçbir işleme tabi tutulmadan yüzeysel sulara karışması, hayvan besiciliğinin yerleşim yerlerine çok yakın mesafelerde yapılması ve bölgenin aldığı yoğun yağışlar göz önüne alındığında su kirliliğine bağlı enfeksiyonların artışı söz konusu olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 2012 sonbahar, 2013 ilkbahar ve sonbahar, 2014 sonbahar aylarında Giresun ve Samsun illerinde belirlenen toplam 45 istasyondan 420 çevresel ve 120 içme suyu örneklerinde *Cryptosporidium* parazitinin varlığı mikroskobik ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Mikroskobik araştırma kapsamında, Giresun ilinden alınan su örnekleri IFA yöntemiyle incelenmiş ve 180 çevresel su örneğinin 170'inde (%94.4) 1-45 *Cryptosporidium* ookisti/L saptanmıştır. Samsun ilinde ise bu yöntemle 240 çevresel su örneğinin 214'ünde (%89.16) 1-85 *Cryptosporidium* ookisti/L pozitif bulunmuştur.

Moleküler çalışmalar kapsamında ise Giresun il ve ilçelerinden alınan 180 çevresel su örneklerinde LAMP yöntemiyle 74 (%41.1), Nested PZR ile 70 (%38.8) örnekte *Cryptosporidium* spp. pozitif bulunmuştur. Aynı zamanda, araştırma bölgesinden alınan 60 içme suyu örneğinde hiçbir metodla herhangi bir *Cryptosporidium* parazite rastlanılmamıştır. Tüm veriler değerlendirildiği zaman, içme suyu ve çevresel sular dahil olmak üzere toplam 240 su örneğinde LAMP yöntemiyle %30.8, Nested PZR ile %29.1 oranında *Cryptosporidium*'un varlığı tespit edilmiştir.

Samsun il merkezi ve ilçelerinde belirlenen istasyonlarda aynı zaman periyodunda alınan 240 çevresel su örneğinde LAMP yöntemi ile 101 (%42), Nested PZR yöntemiyle 92 (%38.3) örnekte *Cryptosporidium* spp. pozitif bulunmuştur. Ayrıca 60 içme suyu örneği bu yöntemler ile negatif sonuç vermiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde içme suyu ve çevresel sular dahil toplam 300 su örneğinde LAMP yöntemiyle %33.6, Nested PZR ile %30.6 oranında *Cryptosporidium*'un varlığı saptanmıştır.

Nested PZR ürünlerinin sekans analizi sonuçlarına göre Giresun ilinde *Cryptosporidium* için, Bulancak, Keloğlu, İncivez, Keşap giriş köprüsü, Gelivera, Yağlıdere; Samsun ilinde Akçay, Miliç, Terme Çayı-I, Terme Çayı-II, Terme Çayı-III, Yeşilirmak-I, Yeşilirmak-II, Yeşilirmak-III, Irmaksırtı-I, Irmaksırtı-II, Gelemen, Terme istasyonlarının pozitifliği sekans analizleriyle doğrulanmıştır.

İçme suyunun hijyenik olmaması, yetersiz kanalizasyon sistemleri gibi kötü hijyenik koşullar, hayvancılıkla uğraşma, evcil hayvan besleme, veteriner

hekimlik ve laboratuvar faaliyetleri gibi mesleğe ait faktörler, epidemik bölgelere yolculuk, immün sistem yetmezliği, 0-4 yaş ve 60 yaş üstü olma gibi yaş faktörü, enfekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama, yetersiz beslenme *Cryptosporidium* enfeksiyonları için risk faktörleri olarak bilinmektedir (Ungar, 1995; Bonilla ve ark., 1992; Spano ve Crisanti, 2000; Altıntaş, 2002).

Enfektif dozunun düşük olması, klorlama işlemine karşı ookistlerinin dirençli olması, henüz tam anlamıyla kemoterapötik tedavisinin bulunmaması ve gelişme aşamasındaki biyokimyasal mekanizmasının çoğunlukla anlaşılabilmesi, bu protozoonun (*C. parvum*) tespiti üzerine dikkatleri toplamaktadır. Ülkemizde ise su kökenli *Cryptosporidium* spp. parazitinin varlığını saptamaya yönelik çok az çalışma mevcut olup, Karadeniz Bölgesi ise bu alanda yapılan çalışmalar için oldukça yeni bir bölgedir. Dolayısıyla, bu çalışma Giresun ve Samsun illerindeki çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin varlığını göstermek için yapılan bir çalışma olması nedeniyle önemli bir yere sahiptir.

Cryptosporidium spp.'nin tarımda kullanılan atık sularla bulaştığı bilinmektedir. Dolayısıyla yoğun yağış alan bölgemizde bu parazitlerin çevresel sularla hızla yayılması muhtemeldir. Tarımda atık su kullanımının çeşitli sağlık problemlerine neden olduğu, özellikle *Cryptosporidium* spp. gibi parazit ookistlerinin bu şekilde insanlara bulaştığı bilinmektedir. Bölgede üretilen ve çiğ olarak tüketilen sebzelerin temiz su ile çok iyi yıkanıp, güvenilir olduğundan emin olduktan sonra tüketilmesi halk sağlığının korunmasında gereklidir. *Cryptosporidium* türlerinin fekal oral yolla bulaştığı göz önüne alınarak belediyeler ve hatta muhtarlıklar bilgilendirilerek, bu kurumların kanalizasyon sistemlerini artırılmış halde ya da içme suyu kaynaklarından uzak yerlere deşarj etmeleri tavsiye edilmektedir (Kaya, 2011).

Türkiye'de kabul edilen Sağlık Bakanlığı'na ait İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkındaki Yönetmelik'te belirtilen su kalite kriterleri kapsamında su kökenli *Cryptosporidium* ve *Giardia* protozoonlarına yer verilirken, SKKY'de (2004) kıta içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterlerinde bu parazitlere yer verilmemektedir. Kıta içi su kaynaklarının hayvansal sulama ve rekreasyonel

amaçlı kullanımı gözönüne alındığında, halk sağlığı korunması yönünden bu protozoonların SKKY (2004)'ye dahil edilmesi önerilmektedir (Seferoğlu, 2014).

C. parvum enfeksiyonlarının gerçekleşmemesi için öncelikle su kaynaklarının kontrol edilmesi gerekmektedir. Ookistlerin yok edilmesi enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. İyi hijyen, el yıkama ve kontamine olmuş materyallerin uzaklaştırılması ookist alımını engellemektedir. Özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerin kaynatılmış ve şişelenmiş suları kullanması ve sebzeleri iyice yıkadıktan sonra pişirerek tüketmesi gerekmektedir.

Karadeniz Bölgesi'nin bol yağış alması fekal yolla bulaşan bakteri ve parazitlerin yağmur suyu ile dere, göl ve akarsulara taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Enfeksiyon riskinin en aza indirilebilmesi için düzenli yağış alan bölgemizde kanalizasyon altyapılarının kuvvetlendirilmesi, temiz su kaynaklarının düzenli olarak kontrol edilmesi ve ilgili yerlere bildirilmesi gerekmektedir (Turgay ve ark., 2010). Bu nedenle gerek tarımda gerekse içme suyu kullanımında ve hatta suların eğlence amaçlı kullanımında halk sağlığının korunması için tüm yetkililerin ve halkımızın risk oluşturan parazitler hakkında bilinçlendirilmesi gerekmektedir.

Karadeniz Bölgesi'nde risk grubunu oluşturan insanların kriptosporidiyoz konusunda bilgilendirilmesi ve korunma yollarının anlatılması için, bu tez çalışmasını destekleyen TÜBİTAK 111T818 nolu kariyer projesi (2012-2014) kapsamında broşürler hazırlanmıştır. Ayrıca İl Sağlık Müdürlüğü ve İl Milli Eğitim Müdürlüğü ile iletişime geçilerek *Cryptosporidium* ile ilgili broşürlerin dağıtılması sağlanmıştır. Yine proje kapsamında altı farklı ilkokulda ilköğretim öğrencilerine bilinçlendirme eğitimi adı altında seminerler düzenlenmiştir.

7. KAYNAKLAR:

- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V. 2004.** Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304: 441-5.
- Adamska, M. 2015.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurring in natural water bodies in Poland. *Parasitology Research*, 114: 687-692.
- Akdemir, C. 2013.** *Cryptosporidiosis*'in serolojik ve mikroskopik tespiti ve içme sularının ookist yönünden incelenmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 37: 9-12.
- Akın, M., Akın, G. 2007.** Suyun önemi, Türkiye'de su potansiyeli su havzaları ve su kirliliği. *Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi*, 47(2): 105-118.
- Akısü, Ç., Korkmaz, M. 2005.** Tıbbi parazitolojide tedavi. *Tıbbi Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi, Yayın No: 20. İzmir*, s: 40-41.
- Aksehirli, S.G. 1995.** Kayseri'de 0-5 yaş grubu ishallerde *Cryptosporidium*'un araştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Aksu, H., 2004.** İçme Suyu Kaynaklı Mikrobiyolojik Risklerin Değerlendirilmesi. İstanbul ve Su Sempozyumu: Tartışmalar ve Forum, İstanbul.
- Akyön, Y., Ergüven, S., Arıkan, S., Yurdakök, K., Günalp, A. 1999.** *Cryptosporidium parvum* prevalans in a group of turkish children. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 41(2): 189-196.
- Al, 2011.** *Cryptosporidiosis: Parazitolojide Laboratuvar*, Editörler: Korkmaz, M., Ok, Ü.Z., Meta Basım, 359-364.
- Alemdar, S., Kahraman, T., Ağaoğlu, S., Alişarlı, M. 2009.** Bitlis ili içme sularının bazı mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri. *Ekoloji Dergisi*, 19(73): 29-38.
- Alhassan, A., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M.Y., Mbatı, P.A. 2007.** Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Veterinary Parasitology*, 143: 155-60.
- Alkan, U., Çalışkan, S., Mescioğlu, Ü. 1999.** Ulubat gölü'nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi. *Çevkor*, 9(33): 3-5.
- Altıntaş, K. 2002.** *Tıbbi Parazitoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları, s: 170-172.
- Anonim, 2003.** Water for people water for life. The United Nations World Water Development Washington, DC.
- Anonim. 2005.** İnsani tüketim amaçlı sular hakkında yönetmelik 17.2.2005 tarihli ve 25730 sayılı Resmî Gazete. İTASHY, Ankara

- Anonim, 2007.** Water quality outlook, unep global environment monitoring system. (GEMS)/Water Programme Office.
- Anonim, 2008.** Guidelines for drinking-water quality. third edition, Volume: I. WHO, Geneva.
- Ardıç, N. 2007.** İçme sularında parazit ve diğer patojenlere karşı dezenfeksiyon uygulamaları ve ara konaklarla mücadelede kullanılan kimyasallar. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, İstanbul.
- Arslan, Ö.M., Ekinci, İ.A. 2012.** Kars yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium parvum* subtiplerinin belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18: 221-216.
- Aslan, G., Bayram, G., Otağ, F., Direkel, Ş., T. Özkan, A., Çeber, K., Emekdaş, G. 2012.** Mersin ilinde farklı su kaynaklarında cryptosporidium spp. varlığının araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 46(1): 93-100.
- Atalık, A. 2006.** Küresel ısınmanın su kaynakları ve tarım üzerine etkileri. Bilim ve Ütopya, 139: 18-21.
- Awad-El-Karem, F.M., Robinson, H.A., Petry, F., Mcdonald, V., Evans, D., Casemore, D. 1998.** Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. Parasitology Research, 84: 297-301.
- Ayaz, E., Kolören, Z. 2014.** Giresun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium parvum*'un Nested PZR yöntemiyle tespit edilmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Eskişehir, s1650.
- Ayinmode, A.B., OLakunle, F.B., Xiao, L. 2010.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native calves in nigeria. Parasitology Research, 107: 1019-1021.
- Aysal, S. 2004.** Isparta bölgesindeki çeşitli su kaynaklarında *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, *Entero hemorrajik*, *E.coli* ve diğer Entero patojenlerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Bakheit, A., Torra, D., Palomino, L.A., Thekiso, O., Mbatia, P.A., Ongerth, J., Karanis, P. 2008.** Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR negative samples by loop mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated. Veterinary Parasitology, 158(1-2): 11-22.
- Balatbat, A.B., Jordan, G.W., Tang, Y.J., Silva, J. 1996.** Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by Nested PCR. Journal of. Clinical Microbiology, 34(7): 1769-1772.
- Baltacı, F. 1998.** Su kalite standartları. Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü Seminer Notları, Ankara.
- Bayramoğlu, Ö., Pekmezci, D., Başarı, F. 2013.** Adana ili gıda çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* prevalanslarının farklı yöntemler ile araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 37: 4-8.
- Bilgehan, H. 1990.** Özel ve klinik mikrobiyoloji. 800s, Ankara.

- Bonilla, L.C., Gzanpa, N., Cano, G., Raleigh, X., Quijada, L. 1992.** Kriptosporidiyoz among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulia State, Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(5): 582-586.
- Boxell, A., Hijjawi, N., Monis, P., Ryan, U. 2008.** Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Experimental Parasitology*, 120(1): 67-72.
- Börekçi, G., Otağ, F., Emekdaş, G. 2005.** Mersin’de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. *Infeksiyon Dergisi*, 19(1): 39-46.
- Burenbaatar, B., Bakhelt, M.A., Plutzer, J. ve ark., 2008.** Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. *Parasitology Research*, 102: 901-905.
- Cama, V.A., Bern, C., Sulaiman, I. M., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A., Kawai, V., Vargas, D., Zhou, L., Xiao, L. 2003.** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 50 (suppl), 13: 531–533.
- Carey, C.M., Lee, H., Trevors, J.T. 2004.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38: 818-862.
- Casemore, D.P. 1991.** Laboratory methods for diagnosing kriptosporidiyoz. *Journal of Clinical Pathology*, 44: 445-45.
- Castro-Hermida, J.A., Garcia-Preledo, I., Almeida, A., Gonzales-Warleta, M., Da Costa, J.M.C., Mezo, M. 2009.** Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Research*, 43: 4133-4142.
- Castro-Hermida, J.A., Garcia-Preledo, I., Almeida, A., Gonzales-Warleta, M., Mezo, M. 2010.** *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research*, 44: 5887-5896.
- Chen, X., Keithly, J.S., Paya, C.V., Russo, L., Nicholos, F. 2002.** Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*, 346(22): 1723-1731.
- Clark, D.P. 1999.** New insight into human Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 554-563.
- Clayton, F., Heller, T., Kotler, D.P. 1994.** Variation in the enteric distribution of Cryptosporidia in acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Pathology*, 102: 420-425.
- Coşkun, M.A. 2012.** Akarsularda su kalitesi belirleme ve modelleme. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Malatya.
- Coupe, S., Delabre, K., Pouillot, R., Houdart, S., Santillana-Hayat, M. Derouin, F. 2006.** Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surfacewater, including recreational areas: a one-year prospective study. *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medicine Microbiology*, 47: 351–359.

- Current, W.L., Bick, P.H. 1989.** Immunology of *Cryptosporidium* spp. Pathology and Immunopathology Research, 8: 141-160.
- Current, W.L., Garcia, L.S. 1991.** Cryptosporidiosis. Clinical Microbiological Reviews, 4(3): 325-358.
- Current, W. L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B., Weinstein, M.D. 1983.** Human *Cryptosporidiosis* in immunocompetent and immunodeficient persons studies of an outbreak and experimental transmission. The New England Journal Of Medicine, 308: 1252-1257.
- Çeber, K., Aslan, G., Otağ, F., Delialioğlu, N., Öztürk, C., Babür, C., Babür, C., Emekdaş, G. 2005.** Mersin ilindeki içme suyu, kullanma suyu, atık su ve deniz sularında *Cryptosporidium* spp. oocistlerinin araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29(4): 224-22.
- Çetinkaya, F. 2004.** *Cryptosporidium parvum*'un bulaşmasında su ve gıdaların rolü. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 23(1-2-3): 103-109.
- Çiçek, M., Körkoca, H., Gül, A. 2008.** Van belediye mezbahasında çalışan işçilerde ve kesimi yapılan hayvanlarda *Cryptosporidium* spp.'nin araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(1): 8-11.
- Çiçek, M., Körkoca, H., Akkaş, Ö. 2011.** Van ili içme sularının *Cryptosporidium* spp. oocistleri yönünden incelenmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 68 (3): 122 – 126
- Dağ, A. 2010.** Şanlıurfa yöresinde immunsuprese hastalarda *Cryptosporidium* spp. sıklığının kinyoun asit-fast boyama ve elisa yöntemleri ile araştırılması. Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
- De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-More, L.M., Abbassi, H., Peeders, J.E. 1999.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. International of Journal Parasitology, 29: 1269-1287.
- Delioğlu, B.K. 2011.** Yeşilirmak ve Tersakan Çayı (Samsun-Amasya)'ndan alınan yüzeysel su örneklerinde *Cryptosporidium parvum*'un LAMP tekniği ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Demirel, E. 2014.** Ordu ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Demirer, A. 1995.** Su Hijyeni. Teksir, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara.
- Di Giovanni, G.D., Hashemi, F.H., Shaw, N.J., Abrams, F.A., Lechevallier, M.W., Abbaszadegan, M. 1999.** Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. Applied and Environmental Microbiology, 65(8): 3427-3432.

- Dinçer, S. 2014.** Çanakçı Deresi su kalitesi ve kirlilik düzeyinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Giresun.
- Direkel, Ş., Özerol, İ.H., Durmaz, R. 2008.** İshalli hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yöntemleriyle araştırılması. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilim Dergisi, 1(1): 20-25.
- Dirim, E.D., Dağcı, H., Turgay, N., Akarca, U.S., Alkan, M.Z. 2009.** The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 33(2): 120-4.
- Doğan, N., Akgün, Y. 1998.** İshalli olgularda *Cryptosporidium* oookistlerinin araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 22(3): 243-246.
- Doğan, N., Demirüstü, C., Aybey, A. 2008.** Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin beş yıllık bağırsak paraziti prevalansının türlere ve cinsiyetlere göre dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(2): 120-125.
- Doğancı, T., Araz, E., Ensari, A., Tanyüksel, M., Doğancı, L. 2002.** Detection of *Cryptosporidium parvum* infection in childhood using various techniques. Medical Science Monitor, 8(12): 223-226.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. 1990.** Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Pres, USA, 199.
- Dupont, C., Bougnoux, M.E., Turner, L., Rouveix, E., Dorra, M. 1996.** Microbiological findings about pulmonary Cryptosporidiosis in two AIDS patients. Journal of Clinical Microbiology, 34(1): 227- 229.
- Ekinci, İ.A., 2012.** Kars yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı ve moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars.
- El Shazly, A.M., Soltan, D.M., El-Sheikha, H.M., Sadek, G.S., Morsy, A.T. 2007.** Correlation of ELISA copro-antigen and oocysts count to the severity of *Cryptosporidium parvum* in children. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 37(1): 107-20.
- Elgün, G. 2009.** İshalli dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. antijeninin elisa yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Elgün, G., Koltaş, İ.S. 2011.** Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. Parasitology Research, 108(2): 395-7.
- Emre, Z., Alabay, M., Düzgün, A., Çerçi, H. 1997.** Comparison of staining and concantration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal spesimens. Veterinary and Animal Sciences, 21: 293-296.
- Erdoğan, D.D. 2003.** İnsanlarda Cryptosporidiosis dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Erdoğan, D.D., Dağcı, H., Turgay, N., Akarca, U.S., Alkan, M.Z. 2008.** The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(2):120-4.
- Eren, C. 2011.** Farklı gruplardaki immün-süprese bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve modifiye asit-fast boyama yöntemi ile araştırılması. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.
- Erman, N., Beyazıt, A., Öz, İ. 2000.** İzmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda Cryptosporidiosis'in yaygınlığı. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(39): 33-38.
- Fahey, T.M.D. 2003.** Cryptosporidiosis. *Infection Disease Update* 10(2): 75-80.
- Fakir, Y. 2012.** Denizli içme suyu şebekesindeki su kalitesi parametrelerinin zamana ve konuma göre değişiminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli.
- Fayer, R. 2000.** Waterborne and foodborne protozoa: Foodborne Diseases Handbook, New York. Eds: Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O., pp: 289-322.
- Fayer, R. 2004.** Waterborne Zoonoses: Waterborne zoonotic protozoa, Ed: Cotruva, J.A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D., Craun, G.F., Fayer, R., Gannon, V.P.J., World Health Organization (WHO), Cornwall, UK, s: 255-282.
- Fayer, R. 2008.** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: General Biology. Eds: Fayer, R., Xiao, L., Boca Raton, CRC Press, pp:1-41.
- Fayer, R. 2010.** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 214 (1): 90-97.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30: 1305-1322.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. 2008.** *Cryptosporidium ryanaen* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156: 191-198.
- Fayer, R., Ungar, B.L. 1986.** *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50(38): 458-486.
- Garcia, L.S., Bruckner, D.A. 1997.** Diagnostic medical parasitology. ASM Pres, Washington DC, Third edition, 59-63.
- Garcia, L.S., Shimizu, R.Y. 1997.** Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6): 1526-1529.
- Gasser, R.B., O'Donogue, O. 1999.** Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. *International Journal of Parasitology*, 29: 1379-1413.

- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, RW., Cuevas, LE., Parry, CM., Cunliffe, NA., Beeching, NJ., Hart, CA. 2003.** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the united kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(4): 1458- 1462.
- Gilles, H. 1999.** Cryptosporidiosis. In: Hart CA, editor. *Protozoal Diseases*. New Oxford University Press, 592-606.
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M. 1995.** Diversity of oligonucleotide functions. *Annual Reviews Biochemistry*, 64: 763-97.
- Goldoft, M.J., Todd, D. 2008.** Cryptosporidiosis. *Epitrens*, 13(7): 1-4.
- Graaf, C.D., Vonopdenbosch, E., Ortaga-More, L.M., Abbasi, H., Peters, J. 1999.** Areview of the importance of Cryptosporidiosis in farm animals. *Journal of Clinical of Pathology*, 29(8): 1269-87.
- Gül, Y., Özdemir, H. 1990.** Kliniklerimizde ilk cryptosporidiosis olgusu. *Fırat Üniversitesi Dergisi*, 4(1): 61-67.
- Güler, Ç. 1997.** Su Kalitesi Kitabı. Ankara.
- Gün, H., Tanyüksel, M., Haznedaroglu, T. 1997.** Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türkiye Mikrobioloji Cemiyeti Dergisi*, 24:116-119.
- Gündüz, 2012.** Kars yöresindeki buzağlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları prevalansının modifiye asit fast (maf) boyama ve ELISA yöntemleriyle belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars.
- Gürer, İ., 2007.** Küresel Isınma, Türkiye'nin Su Kaynakları, Olası Etkileşim, Türkiye İklim Değişikliği Kongresi, İstanbul.
- Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hamnes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L. 2006.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary Parasitology*, 140: 204-216.
- Harp, J.A., Goff, J.P., 1998.** Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal of Dairy Science*, 81: 289-294.
- Hashwey, R., Smith, N.H., Cron, S., Graviss, E.A., Chappell, C.L., White, A.C. 1997.** Cryptosporidiosis in Houston. Texas a report of 95 cases *Medicine*, 76(2): 118-139.
- Hazer, Y. 2007.** Afyonkarahisar bölgesindeki risk gruplarında *Cryptosporidium parvum* araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.
- Hijjawi, N. 2003.** *Cryptosporidium*: in vitro cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture, Eds: Thompson, R.C.A., Armson, A., Ryan, U.M., from molecules to disease. Amsterdam: Elsevier, pp: 233-253.

- Jayalakshmi, J., Appalaraju, B., Mahadevan, K. 2008.** Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 51(1):137.
- Jenkins, M.C., Trout, J., Abrahamsen, M.S., Lancto, C.A., Higgins, J., Fayer, R. (2000).** Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *Journal of Microbiological Methods*, 43: 97-106.
- Joachim, A. 2004.** Human Cryptosporidiosis: an update with special emphasis situation in Europe. *Journal of Veterinary Medicine*, 51: 251–259.
- Kali, N. 2008.** Erzurum ovası su kalitesi ve kirliliğinin tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- Karaman, Ü., Daldal, N., Özer, A., Enginyurt, Ö., Ertürk, Ö. 2015.** Incidence of cryptosporidium spp. in the human population of Malatya in Turkey. *Acta Medica Mediterranea*, 31: 263.
- Karanis, P., Kourenti, K., Smith, H.V. 2007.** Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, 5: 1–38.
- Karanis, P., Sotiriadou, V., Kartashev, C., Kourenti, N., Tsvetkova, K., Stojanova, 2006.** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environmental Research*, 102: 260-71.
- Kaya, D. 2011.** Ordu il merkezi ve ilçelerinden alınan su örneklerinde kirlilik indikatör bakterilerin ve parazitlerin moleküler yöntemlerle tespit edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Kehl, K.S.C., Cicirello, H., Havens, P.L. 1995.** Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2): 416-418.
- King, B.C., Monis, P.T. 2007.** Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology Reviews*, 134(3): 309-23.
- Kissinger, J.C. 2008.** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: Genomics, Eds: Fayer, R., Xiao, L., CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 43–56.
- Kolören, Z., Avşar, C., Şekeroğlu, A.Z. 2010.** Protozoonların tanısında ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (LAMP). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34: 207-11.
- Kolören, Z., Delioğlu B.K. 2011.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in water supplies of Amasya, Middle Black Sea, by Acid-Fast staining methods. *Journal of Applied Biological Sciences*, 5(3): 81-84.
- Kolören, Z., Demirel, E. 2013.** Investigation on *Cryptosporidium* spp. in water samples collected from River Melet in Ordu by loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(2): 28-32.

- Kolören, Z., Karanis P., Sotiriadou, I. 2011.** Investigations and comparative detection of *Cryptosporidium* species by microscopy, Nested PCR and LAMP in water supplies of Ordu, Middle Black Sea. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 105(8): 607–615.
- Kolören, Z., Kaya, D. 2010.** Ordu ve çevresindeki ilçelerin yüzeysel sularında *Cryptosporidium parvum* ve *Giardia lamblia* 'nın yaygınlığı. 4. Ulusal Limnoloji Kongresi, 04-06 Ağustos 2010 8s, Bolu.
- Kolören, Z., Kaya, D., Avşar C. 2013.** Detection of *Cryptosporidium* species in the sea and tap water samples of Black Sea, Turkey. *Journal of Parasitology*, 99(3): 554-557.
- Kolören, Z., Taş, B., Kaya, D. 2011.** Gaga Gölü (Ordu, Türkiye)'nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi The Black Sea Journal of Sciences*, 2(1): 3, 74-85.
- Köksal, F., 2002.** Kaynak sularının *Giardia* ve *Cryptosporidium* yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 32 (3-4):275-277.
- Köktürk, O. 2002.** Parazit hastalıkları grup baskısı. *Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi*, *Toraks Dergisi*, Cilt 3, Ek 5.
- Kusnierz, B.W., Bajer, A., Caccio, S., Pliszka, E.H., Bernatowska, E., Socha, P., Van Dongen, J., Bednarska, M., Paziewska, A., Sinski, E. 2007.** *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiencies. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45(4): 458-464.
- Laberge, I., Griffiths, M.W. 1996.** Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 32: 1–26
- Laime, Mazzoleni, A.P., Argioli, F., De Virgilis S., Cao, A., Purcell, R.H., Farci, P. 1994.** Hepatitis C virüs in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*, 343: 388-390.
- Le Blancq, S.M., Khramtsov, N.V., Zamani, F., Upton, S.J., Wu, T.W. 1997.** Ribozomal RNA gene organisation in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62: 1-7.
- Leav, B.A., Mackay, M., Ward, H.D. 2003.** *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, 36: 903–908.
- Leng, X., Mosier, D.A., Oberst, R.D. 1996.** Simplified method for recovery and PCR detection *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2): 643-647.
- Limor, J.R., Lal, A.A., Xiao, L. 2002.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7): 2335-2338.
- Lobo, M.L., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. 2008.** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 732-737.
- Lowery, C.J., Moorel, J.E., Millar, B.C., Mc Corry, K.A.J., Xu, J., Rooney, P.J., Dooley, J.S.G. 2001.** Occurrence and molecular genotyping of

- Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland. Journal of Applied Microbiology, 91: 774-779.
- Lucio-Forster, A., Özkan, T.A., Bowman, D.D. 2004.** Continuous flow centrifugation and sucrose gradients for detecting cysts of *Giardia* and oocysts of *Cryptosporidium* in patients with neoplasia and diarrhea. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 27(1): 69-70.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J. and Proctor, M.E. 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public watersupply. The New England Journal of Medicine, 331: 161-167.
- Mac Pherson, D.W., McQueen, R. 1993.** Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. Journal of Clinical Microbiology, 31(2): 198-202.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997.** Brock biology of microorganisms. International Edition. Prentice Hall, 8: 524-526.
- Mahmoudi, M.R., Kazemi, B., Mohammadina, A., Mirzaei, A., Karanis, P. 2013.** Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran. Transaction of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, 107(8): 511-7.
- Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. 2005.** Microsporidia: Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds: Weiss, L.M., Philadelphia, Churchill Livingstone, p: 3237-3257.
- Mark, A.C., Maria, T.K., Byron, L.B. 1999.** The ultrastructure of gametogenesis of *Cryptosporidium baileyi* in the respiratory of broiler chickens. International Journal for Parasitology, 85(4): 609-615.
- Markel, E.K., Voge, M., John, D.T. 1986.** Medical Parasitology. Sixth Edition. W. B. Saunders Company, London, 72-75.
- Mata, L., Balanos, H., Pezarro, D., Viyes, M. 1984.** Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 33: 24-29.
- Mayer, C.L. ve Palmer, C.J. 1996.** Evaluation of PCR, Nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in Wastewater. Applied and Environmental Microbiology, 62(6): 2081-2085.
- Mc Donald, V. 2000.** Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. Parasite immunology, 22: 597-604.
- McOrist, A.L., Jackson, M., Bird, A.R. 2002.** A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. Journal of Microbiological Methods, 50: 131-139.
- Mehlhorn, H., Piekarsk, G. 2002.** Grundriß der Parasitenkunde, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.6.Auflage, 516.
- Meisel, J.L., Perea, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E. 1992.** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology, 70: 1156. In: Crawford, G.F., Vermund, H.S., 1998, Human Cryptosporidiosis. CRC Critical Rev. Microbiol., 16; (2): 113-159.

- Menedez, S.R., Garcia, M.R., Sanchez san Roman, Gonzalez, S.A., Navascules, A., Alvarez, P.R., Saez, R.L. 1991.** Intrafamilial spread of hepatitis C virus. *Infection*, 19: 341-1433.
- Mojarad, N.E., Keshavarz, A., Taghipour, N., Haghghi, A., Kazemi, B., Athari, A. 2011.** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in clinical samples: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C2 gene. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 4(1): 29-33.
- Mons, C., Dumetre, A., Gosselin, S., Galliot, C., Laurent, M. 2009.** Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Research*, 43: 211-217.
- Morgan, U.M., Thomson, R.C.A. 1998.** PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward?. *Parasitology Today*, 14: 469.
- Mtombo, M.M.A., Nash, A.S., Blewett, D.A., Wright, S. 1992.** Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocyst in cat faecal specimens. *Veterinary Parasitology*, 45: 49-57.
- Munsuz, N., Ünver, Y. 1995.** Su kalitesi. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Yay. No: 1389, Ders Kitabı, Ankara, s: 403.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. 2007.** Klinik Mikrobiyoloji, *Manual of Clinical Microbiology*, 9(2): 2122-2128.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. 2002.** Accelerated reaction by Loopmediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 223-9.
- Nago, T.T., Tokashiki, Y.T., Kisanuki, K., Nakasone, I., Yamane, N. 2010.** Laboratory-based evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia lamblia* cyst in stool specimens. *Rinsho Byori*, 58(8): 765-71.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H. 1976.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium* *Gastroenterology*, 70:592-598. In Dillingham R.A,Lima, A.A., Guerrant, R.İ., 2002, *Cryptosporidiosis : epideniology and impact. Microbes Infect.*, 4:1059-1066
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuch, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. 2000.** Loop-mediated iothermal amplification of DNA. *Nucleid Acids Research*, 28: E63.
- O'Handley, R.M., Olson, M.E. 2006.** Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Veterinary Clinical of North Food Animals*, 22(3): 623-643.
- Ok, Ü.Z., Balcıoğlu, C. 2007.** Cryptosporidiosis: Tıbbi parazit hastalıkları, Editörler: Özcel, M.A., Özbel, Y., AK, M., İzmir, s: 363-382.
- Ok, Ü.Z., Girinkardesler, N., Kilimcioglu, A., Limoncu, E. 1997.** Dışkı inceleme yöntemleri: Parazit Hastalıklarında Tanı. Editörler: Özçel, M.A., Altıntaş, N., 1. Baskı, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, s:1-61.
- Ok, Ü.Z., Üner, A., Korkmaz, M. 1995.** İmmün yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları. *Türk Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi, Basımevi No:12*, 98 s. İzmir.

- Otağ, F., Aslan, G., Emekdaş, G., Aydın, E., Taylan Özkan, A., Çeber, K. 2007.** Mersin ilinde ilkokul öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 31: 17-19.
- Arslan, Ö.M., Ekinci, İ.A. 2012.** Kars yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium parvum* subtiplerinin belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Dergisi, 18: 221-216.
- Över, U. 1996.** İshalle seyreden hastalarda *Cryptosporidium*' un rolü ve sağlıklı populasyonda seroprevalansı. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özcan, K. 1998.** Tıbbi Parazitoloji Ders ve Laboratuvar Notları, Adana, s: 77-79.
- Özcel, M.A. 1995.** İmmun yetmezlikle önemi artan parazit hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:12, Ege Üniv. Basımevi, Bornova, İzmir.
- Özcel, M.A. 2009.** Restriksiyon endonükleazlar: moleküler parazitoloji. Editörler: Caner, A., Döşkaya, M., Özcel, M.A., İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, s: 376- 367.
- Özcel, M.A., Özbel, Y., Ak, M. 2007.** Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği, İzmir, 363-376.
- Özcel, M.A., Turgay, N., İnci, A., Köroğku, E. 2007.** Tıbbi ve veteriner immunoparazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, s: 93-97.
- Özçağlar, A. 2000.** Coğrafyaya Giriş (Sistemik Kavramlar Yöntemler). Ankara.
- Özçelik, S., Poyraz, Ö., Kalkan, K., Malatyalı, E., Değerli, S. 2012.** Hayvancılıkla uğraşanlarda ve sığırlarda *Cryptosporidium* spp. yaygınlığının ELISA ile araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 18 (Suppl-A): A61-A64, 2012 DOI:10.9775/kvfd.2011.5981.
- Özdemir, A.C. 2010.** İstanbul içme suyu havzalarında arazi kullanımlarının su kalitesine olan etkisinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şehir ve Bölge Planlama Anabilim Dalı, İstanbul.
- Özer, E. 1990.** Evcil hayvanlarda Cryptosporidiosis. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 38(1): 20-31.
- Özlem, M.B., Eren, H., Kaya, O. 1997.** Aydın yöresi buzağlarında *Cryptosporidium*'ların varlığının araştırılması. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi, 22(36): 15-22.
- Özsoy, S. 2009.** Su ve yaşam suyunun toplumsal önemi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Çalışma Ekonomisi ve Endüstri İlişkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Paris, D.H., Blacksell, S.D., Newton, P.N., Day, N.P. 2008.** Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, 102: 1239-46.

- Pedraza Díaz, S., Amar, C., Nichols, G.L., Mclauchlin, J. 2001.** Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerging Infectious Diseases journal*, 7(1): 49-56.
- Piper, M.B., Bankier, A.T., Dear, P.H. 1998.** A happy map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research*, 8: 1299-307.
- Plutzer, J. 2008.** *Cryptosporidium* and *Giardia* as water contaminant pathogens in Hungary: 22-25s.
- Plutzer, J., Karanis, P. 2009.** Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitology Research* DOI 10.1007/s00436-009-1391-3.
- Plutzer, J., Törökne' A., Karanis, P. 2010.** Combination of ARAD microfibre filtration and LAMP methodology for simple, rapid and cost-effective detection of human pathogenic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 82-88.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S. 2004.** Review of the biology and epidemiology of Cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6: 773–785.
- Reisner, B., S., Spring, J. 2000.** Evaluation of a combined acid-fast-trichrome stain for detection of *Microsporidia* and *Cryptosporidium parvum*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 124: 777-779.
- Resmi Gazete, 1988.** Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği (SKKY), Sayı: 19919, Ankara.
- Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C. 2013.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Veterinary parasitology*, 197: 7-12.
- Robin, H.J., Petry, F. 1999.** *Cryptosporidium parvum*: Structural components of the oocyst Wall. *International Journal for Parasitology*, 85(5): 839-849.
- Rosenblatt, J.E., Sloan, L.M. 1993.** Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6): 1468-1471.
- Ryan, U., Read, C., Hawkins, P., Warnecke, M., Swanson, P., Griffith, M., Deere, D. Cunningham, M., Cox, P. 2005.** Genotypes of *Cryptosporidium* from Sydney water catchment areas. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1221–1229.
- Sakarya, Y., Kar, S., Tanyuksel, M. ve ark. 2010.** Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and calves through Nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey. *Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 977-980.
- Santin, M., Trout, J.M. 2008.** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: Livestock. Eds: Fayer, R., Xiao, L., CRC Press, Boca Raton, FL, p: 451–483.
- Saygı, G. 1998.** Temel tıbbi parazitoloji. *Esnaf Ofset Matbaacılık*, Kasım, 78-80.

- Scott, T.M., Parveen, S., Portier, K.M., Rose, J.B., Tamplin, M.L., Farrah, S.R., Koo, A., Lukasik, J. 2003.** Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1089-1092.
- Sears, C.L., Kirckpatrick, B.D. 2001.** In: cryptosporidiosis and isosporiosis, principles and practise of clinical parasitology. John Wiley & Sons Ltd. Pres. pp: 139-164.
- Seferoğlu, O. 2014.** Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *Giardia intestinalis*'in moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Shadid, N.S., Rahaman, A.S.H.M., Mata, L.J., Sanyal, S.C. 1985.** Cryptosporidiosis in Bangladesh. *British Medical Journal*, 290: 114-115.
- Shalaby, I., Gherbawy, Y., Jamjoom, M., Banaja, A. 2014.** prevalence and genotyping of *cryptosporidium* in stool samples collected from children in taif city (Saudi Arabia). *Tropical Biomedicine*, 31(2): 215–224.
- Siddons, C.A., Chapman, P.A., Rush, B.A. 1992.** Evaluation of an enzymeimmunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 479-482.
- Silva, C.V., Ferreira, M.S., Gonöalves-Pires, M.R.F., Costa-Ruiz, J.M. 2003.** Detection of *Cryptosporidium* specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro*, 98(8): 1097-1099.
- Slavin, D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (spp.nov). *J.Comp Pathol.*,65:262. In: Crawford,G.F.,Vermund,H.S,(1998). Human Cryptosporidiosis. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 16(2): 113-159
- Smith, H.V., Rose, J.B. 1998.** Waterborne cryptosporidiosis. *Currents Status, Parasitology Today*, 14: 14-22.
- Sotiriadou, I., Karanis, P. 2008.** Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62: 357–365.
- Spano, F., Crisanti, A. 2000.** *Cryptosporidium parvum*: The many secrets of a small genome. *International Journal for Parasitology*, 30: 553-565.
- Starling, C.R., Arrowood, M.J. 1993.** Cryptosporidia, In: parasitic protozoa, Academic Press. 6(65): 159-224.
- Strausbaugh, L.J. 2000.** *Cyclospora cayetenensis*, A review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990.s. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 1040-1057.
- Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, 2004.** 31/12/2004 Tarih ve 25687 Sayılı Resmi Gazete. Erişim Tarihi: 15/05/2015.

- Sungur, T., Kar, S., Güven, E., Aktaş, M., Karaer, Z., Vatansever, Z. 2008.** *Cryptosporidium* spp'nin dışkıdan Nested PCR ve carbol fuchsin boyama yöntemi ile teşhis edilmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(4): 305-308.
- Suresh, P., Rehg, J.E. 1996.** Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. Journal of Clinical Microbiology, 34(1): 38-40.
- Şimşek, A.T., İnci, A., Yıldırım, A., Çiloğlu, A., Bişkin, Z., Düzlü, Ö. 2012.** Nevşehir yöresindeki yeni doğan ishallerde cryptosporidiosis'in real time PCR ve Nested PCR yöntemleri ile saptanması. Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 9(2): 79-87.
- Şimşek, Z., Yıldız Zeyrek, F., Kurcer, M.A. 2004.** Effect of *giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. Journal of Tropical Pediatric, 50: 90- 93.
- Tamer, S.G., Balıkçı, E., Erbay, A. 2008.** Lösemi ve lenfoma tanısı alan çocuklarda cryptosporidiosis prevalansı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32 (3): 192-197.
- Tamer, G.S., Gülenç, S. 2008.** Dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(3): 198–201.
- Taqhi-Kilani, R., Rimacho-Moreno, M., Wenman, W.M. 1994.** Three tandemly repeated 5S ribosomal RNA-encoding genes identified, cloned and characterized from *Cryptosporidium parvum*. Emerging Infectious Diseases journal, 4(4): 681-5.
- Terzi, G. 2005.** Gıda kaynaklı protozoon enfeksiyonların insan sağlığı açısından önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 16(2):47-55.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994.** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4637-4680.
- Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijjawi, N.S. 2005.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Advances in Parasitology, 59: 77-158.
- Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M. 2002.** Evcil hayvanlarda Cryptosporidiosis: enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Editör: Özer, E., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 38(1): 20-31.
- Toroğlu, E., Toroğlu, S., Alaeddinoğlu, F. 2006.** Aksu Çay (Kahramanmaraş)'ında akarsu kirliliği. Coğrafi Bilimler Dergisi, 4(1): 93-103.
- Truong, Q., Ferrari, B.C. 2006.** Quantitative and qualitative comparisons of cryptosporidium faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. International Journal For Parasitol, 36: 811-819.
- Tuli, L., Gulati, A.K., Sundar, S., Mohapatra, T.M. 2008.** Correlation between CD4 counts of HIV patients and enteric protozoon in different seasons-an

- experience of a tertiary care hospital in Varanasi (India). BMC Gastroenterology, 8: 36.
- Turgay, N., Yolasiğmaz, Ü. A., Oyur, T., Özdemir, B. S., Töz, S. 2012.** İzmir ve çevresinde bağırsak parazitleri. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 36: 71-4.
- Tümer, S., Şahin, İ.Ş., Yüksel, M.F., Ceylan, E., Vurupalmaz, Y., Y. Zeyrek, F.,** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklığı. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı. s: 245.
- Tünger, Ö., Tünger, A. 2007.** Enfeksiyon hastalıkları elkitabı. HYB Basım Yayın, s: 545-546.
- Türkçapar, N. 2001.** Cryptosporidiosis. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.
- Twort, A.C. 1974.** Water Supply. Edward Arnold Ltd., London, pp. 112.
- Tyzzar, E.E. 1907.** A sporozoon found in the peptic glands of common Mouse. Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine, 5:12-3.
- Tyzzar, E.E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (Sp. Nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protis, 26: 394-412.
- Tzipori, S., Ward, H. 2002.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes and Infection, 4: 1047-1058.
- Unat, E.K., Yücel, A., Atlas, K., Samastı, M. 1995.** Unat'ın tıp parazitolojisi. 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, s: 595-600.
- Ungar, B.L. 1990.** Enzyme-Linked Immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in Fecal specimens. Journal of Clinical Microbiology, 28(11): 2491-2495.
- Ungar, B.L.P. 1995.** Infectious diseases and their etiologic agents, volume 2, section H, in Principle and Practise of Infectious Diseases Editors, Mandell G.L, Bennet J.E., Dolin R, Fourth Edition, Churchill livingstone, New York Churchill livingstone p: 2500-2546.
- Uslu, O. 2001.** Su kirliliği. Türkiye'nin çevre sorunları, T.Ç.S.V Yayını, Ankara.
- Usluca, A., Aksoy, Ü. 2011.** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. Turkish Journal of Medical Sciences, 41(6): 1029-1036.
- Uyar, Y., Özkan, T.A. 2009.** Amebiyazis, giardiyazis ve kriptosporidiyazis tanısında antijen tarama yöntemlerinin yeri. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 33(2): 140-150.
- Ulçay A., Görenek L., Coşkun Ö., Araz E., Acar A., Eyigün, C.P. 2008.** İmmün yetmezlikli hastalarda intestinal protozoonların tanısı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(4): 328-333.
- Üner, A., Tanrıverdi, S., Caner, A., Değirmenci, A. 2007.** *Cryptosporidium*'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar: Moleküler

Parazitoloji. Editörler: Özcel, M.A., Tanyüksel, M., Eren, H., Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın, s. 631-64.

- Weber, R., Bryan, R.T., Juranek, D.D. 1992.** Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal spesimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11): 2869-2873.
- WHO, 1996.** Guidelines for drinking water quality. 2nd Ed., Vol. I-II, Geneva.
- WHO, 2008.** World Health Organisation Geneva. Guidelines for Drinking water Quality., 3rd Ed., Vol.1.
- Widmer, G., Orbach, E.A., Tzipori, S. 1999.** β -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4): 1584- 1588.
- Wilkes, G., Thomas, Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker, N., Topp, E., R. Lapen, D. 2009.** Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, Giardia cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Research*, 43: 2209–2223.
- Willson, W.R. 2004.** Enfeksiyon hastalıkları tanı ve tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, s: 824-827.
- Wittner, M., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M. 1993.** Parasitic infection in AIDS patients: cryptosporidiosis, isosporiasis, microsporidiosis, cyclosporiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 7: 569-86.
- Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Takahashi, Y. 2004.** Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct. *Tropical Medicine and International Health*, 32(1): 5-14.
- Wyatt, C.R., Riggs, M.W., Fayer, R. 2010.** Cryptosporidiosis in neonatal calves. *Veterinary Clinical Food Animals*, 26: 89-103.
- Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A.A. 2000.** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a Small-Subunit rRNA based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5492-5498.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A. 1999.** Polygenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the Small-Subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4): 1578-1583.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. 2004.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiological Reviews*, 17(1): 72-97.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulow, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A.A. 1999.** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3386-3391.

- Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Lal, A.A. 2000.** *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*, 16: 287-292.
- Xiao, L., Sulaiman, I., Fayer, R., A Lal, A. 1998,** Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5): 687- 692.
- Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R., Lal, A.A. 2002.** Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health, *International Journal for Parasitology*, 32: 1773-1785.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A. 2004.** The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431: 1107-112.
- Yazar, S., Yaman, O., Gözkeç, N., Şahin, İ. 2005.** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalarda barsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(4): 261-263.
- Yetkin, M.A. 1998.** Immun yetmezlikli hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.
- Yılmaz, H., Taş, C.Z., Çiçek, M. 2008.** Investigation of cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Medical Journal*, 29(4): 526-529.
- Yorulmaz, B. 2006.** Eşen Çayı (Koca Çay) su kalitesinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan incelenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Yousefi, R.A. 1991.** Ankara'nın bazı bölgelerindeki yer altı sularında enterik bakterilerin aranması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine AYZAZ
Doğum Yeri : Samsun
Doğum Tarihi : 20.06.1989
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : ayaz_emine_1989@hotmail.com
İletişim : 0 546 264 36 67
Bilgileri

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	
Lisans	Biyoloji	Ordu Üniversitesi	2008-2012
Y. Lisans	Biyoloji	Ordu Üniversitesi	2012-2015

BİLİMSEL AKTİVİTELER

Ulusal Kongrelerde Yayınlanmış Poster Bildiriler

- Seferoglu, O., Koloren, Z., Karaman, Ü., **Ayaz, E.** 2013. Giresun ili ve ilçelerinden alınan yüzeysel su örneklerinde *Giardia intestinalis*'in Nested PZR kullanılarak tespit edilmesi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli, s198.
- Demirel, E., Koloren, Z., Karaman, Ü., **Ayaz, E.** 2013. Giresun il merkezi ve ilçelerinden alınan yüzeysel su örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin standart PZR yöntemiyle tespit edilmesi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli, s222.
- Karaman, Ü., Koloren, Z., Demirel, E., **Ayaz, E.**, Seferoğlu, O., 2013. Giresun ilindeki sulara parazitlerin varlığı. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli, s228.
- Karaman, Ü., Koloren, Z., Seferoğlu, O., **Ayaz, E.**, Demirel E., 2013. Samsun il ve ilçelerinden alınan çevresel sulara parazitlerin varlığı.18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli, s229.
- Karaman, Ü., Koloren, Z., **Ayaz, E.**, Demirel E., Seferoğlu, O., 2013. Samsun İli Terme ve Kocaman ilçelerindeki sulara protozoon ve helmintler. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli, s230.
- Ayaz, E.**, Koloren, Z. 2014. Giresun ili ve ilçelerinden alınan çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium parvum*'un Nested PZR yöntemiyle tespit edilmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Eskişehir, s1650.
- Karaman, Ü., Koloren, Z., **Ayaz, E.**, Iraz, M. 2014. Türkiye'de kistik ekinokokkozis literatür değerlendirilmesi. 7. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 4-7 Eylül, Ordu, s124.
- Koloren Z., **Ayaz, E.** 2015. Samsun ili Terme Çayı'ndan alınan çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium spp.*'nin LAMP yöntemi kullanılarak tespit edilmesi. Ekoloji Sempozyumu. 6-9 Mayıs, Sinop, s448.

Uluslararası Kongrelerde Yayımlanmış Poster Bildiriler

Kolören, Z., **Ayaz, E.**, Seferoğlu, O. 2014. Occurrence of *Cryptosporidium* species by Nested PZR in the drinking and environmental water samples of Samsun, Black Sea, Turkey. 5th International *Giardia* & *Cryptosporidium* Conference. 27-30 May, Uppsala, Sweden, s115.

Karaman, Ü., Kolören, Z., **Ayaz, E.**, Gür, Ü. 2015. Prevalence of *Blastocystis* sp. in primary school students at a central village of Ordu province. 1st International Blastocystis sp. Symposium. 28-29 Mayıs, Ankara, s39.

Ulusal Dergilerde Yayımlanmış Makaleler

Demirel, E., Kolören, Z., Karaman, Ü., **Ayaz, E.** 2014. Giresun'da su örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin polimeraz zincir reaksiyonu ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 48(4): 661-668.

Görev Aldığı Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projeler

Zeynep Kolören, **Emine Ayaz**, Onuralp Seferoğlu. Samsun ve Giresun'da su kökenli parazitlerin (*Cryptosporidium parvum* ve *Giardia lamblia*) moleküler teknikler (LAMP, IFA, PZR-RFLP, NESTED PZR) kullanılarak tespit edilmesi (**TÜBİTAK Proje No: 111T818**)

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Zeynep Kolören