

ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZİNCAN İLİ FARKLI SU KAYNAKLARINDAN
Cryptosporidium parvum' un MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TESPİT EDİLMESİ

Seçil YALÇIN

Danışman: Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2017

Her Hakkı Saklıdır

Kabul ve Onay Sayfası

Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN danışmanlığında, Seçil YALÇIN tarafından hazırlanan bu çalışma 19/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul oybirliği/oy çokluğu (5/5) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doçent Doktor Özlem BARIŞ

İmza:

Danışman : Doçent Doktor Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza:

Üye : Yardımcı Doçent Doktor Neriman MOR

İmza:

Üye : Yardımcı Doçent Doktor Mehmet KUZUCU


İmza:

Üye : Yardımcı Doçent Doktor Serap SUNAR

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun 04/07/2017 tarih ve 21/... nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil, ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Erzincan İli Farklı Su Kaynaklarından *Cryptosporidium parvum*’ un Moleküler Yöntemlerle Tespit Edilmesi ” isimli Yüksek Lisans tezim tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 19/06/2007

İmza
Seçil YALÇIN



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZİNCAN İLİ FARKLI SU KAYNAKLARINDAN *Cryptosporidium parvum*' un MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESPİT EDİLMESİ

Seçil YALÇIN

Erzincan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Cryptosporidium parvum son 30 yıldan beri insan ve birçok hayvan türünde önemli enterik protozoon patojen olarak kabul edilmektedir. Su ise *Cryptosporidium*' un taşınmasında en önemli araçlardan biri olarak görülmektedir. Bu nedenle günümüzde *Cryptosporidium* içme sularında kontrol edilmesi gereken yeni ve en önemli kontaminantlardan biri haline gelmiştir. Buna dayanarak yaptığımız çalışmada Erzincan iline bağlı ilçe ve köylerden 2016 yılı Mart ve Ağustos ayları arasında, 6 ay boyunca toplam 140 farklı noktadan içme ve kullanma suyu örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler PCR ve LAMP tekniği uygulanmıştır. PCR ile toplanan örneklerden 6' sı (% 4,3) pozitif sonuç verirken, LAMP ile 9' u (% 6,4) *Cryptosporidium parvum* açısından pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda elde edilen bu veriler ile geçim kaynağı tarım ve hayvancılık olan Erzincan ilinin sularındaki bu kirliliğe, enfekte hayvan dışkılarının çevreye bırakılması ve tarımda kullanılan atık suların çevresel sular aracılığı ile su kaynaklarına ulaşmasından kaynaklandığı, yağın yağmur ve nemli havanın, içme suyu ve çevresel sularda kontaminasyonu arttırdığı düşünülmektedir.

Ülkemizde su kökenli *Cryptosporidium spp.* varlığını saptamaya yönelik çalışmalar yok denecek kadar az bulunmaktadır. Bu çalışma Erzincan ili içme ve kullanma suyu örneklerinde *Cryptosporidium parvum*' un varlığını moleküler yöntemler ile göstermek için yapılan ilk çalışmadır. Elde edilen veriler ile toplum sağlığının korunması, iyileştirilmesi, yaşam kalitesinin artırılmasına katkı sağlaması bu çalışmanın önemini vurgulamaktadır.

2017, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium parvum*, içme ve kullanma suyu, LAMP, PCR

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF *Cryptosporidium parvum* by MOLECULAR METHODS IN DIFFERENT WATER RESOURCES DURING ERZİNCAN

Seçil YALÇIN

Erzincan University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Cryptosporidium parvum has been accepted as a major enteric protozoan pathogen in human and many animal species since last 30 years. Water is seen as one of the most important means of transporting *Cryptosporidium*. Today, *Cryptosporidium* has become one of the newest and most important contaminants to be controlled in drinking waters. Based on this, we have collected samples of potable water and drinking water from 140 districts and villages of Erzincan province between March and August of 2016 for 6 months. PCR and LAMP techniques were applied to the collected samples. PCR yielded 6 (4.3%) positive results in 140 water samples, whereas 9 (6.4%) of 140 water samples with LAMP were positive for *Cryptosporidium parvum*. This data obtained as a result of our work and the contamination in the waters of Erzincan which is a livelihood of agriculture and livestock are caused by the exposure of infected animal feces to the environment and the access of agricultural wastewater to the water resources through environmental waters and the contamination of wet rain and humid air and drinking water and environmental waters.

There are few studies to determine the presence of waterborne *Cryptosporidium* spp. in our country. This study is the first study to show the existence of *Cryptosporidium parvum* in molecular samples in the water samples of Erzincan province. It emphasizes the importance of this work to protect the health of the community with the obtained data, to improve it and to contribute to the increase of the quality of life.

2017, 63 pages

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, drinking and using water, LAMP, PCR,

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda destek alabildiğim, bana bu çalışmayı gerçekleştirme olanağı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını ve ilgisini eksik etmeyen danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Nalan YILDIRIM' a; çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşim Önder YALÇIN' a; varlıklarına her zaman şükrettiğim kızım Elif ve oğlum Ömer Anıl YALÇIN' a; çalışmalarım boyunca her türlü imkan ve kolaylığı sağlayan, her zaman destek olan müdürüm Ömer Yurdal MAZLUM ve mesai arkadaşım Ayşegül KÖKSAL' a, bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan annem Zinet ve babam Hasan GÖKCÜ' ye, bana hayatta kardeşe sahip olmanın bir ayrıcalık olduğunu hissettiren kardeşlerim Hatice ÜÇER ve Merve GÖKCÜ' ye ve son olarak Tez çalışmasını FEN-C-YLP-240215-0127 proje numarası ile destekleyen Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seçil YALÇIN

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
Simgeler.....	viii
Kısaltmalar.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ:	6
2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un Tarihçesi	6
2.2. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un Sistematığı	7
2.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un Morfolojisi.....	8
2.4. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un Yaşam Döngüsü:	9
2.4.1. Ekskistasyon (Kistlerin açılması).....	10
2.4.2. Merogoni (Aseksüel çoğalma).....	10
2.4.3. Gametogoni.....	11
2.4.4. Fertilizasyon.....	12
2.4.5. Ookist dönemi	12
2.4.6. Sporogoni	12
2.5. Cryptosporidiosis.....	14
2.6. Cryptosporidiosis Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	18
2.6.1. Mikroskopik yöntemler.....	19
2.6.2. Serolojik yöntemler.....	22
2.6.3. Histopatolojik inceleme	23
2.6.4. Kültür yöntemleri.....	23
2.6.5. Moleküler yöntemler.....	24
2.7. Sularda <i>Cryptosporidium</i> Aranması ile İlgili Yurtdışında Yapılan Çalışmalar.....	26
2.8. Sularda <i>Cryptosporidium</i> Aranması ile İlgili Türkiyede Yapılan Çalışmalar	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	36
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	36

3.2. Örneklerin Toplanması.....	36
3.3. Filtrasyon.....	36
3.4. Örneklerin Saflaştırılması (Sükroz Gradient Yöntemi).....	37
3.5. DNA İzolasyonu.....	37
3.6. PCR Tekniği.....	38
3.7. LAMP Tekniği.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	64



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. A: <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un yapısı	9
Şekil 2.2. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un gelişim evreleri	13
Şekil 2.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un bulaş yolları	15
Şekil 4.1. PCR jel görüntüleri	43
Şekil 4.2. LAMP tekniği jel görüntüleri	44



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. TS 266 Standardına Göre İçme ve Kullanma Sularının Taşınması Gereken Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikler	2
Tablo 1.2. Su Kaynaklı Patojenler (Anonim, 2008).....	5
Tablo 2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un sınıflandırılması).....	7
Tablo 3.1. PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri	38
Tablo 3.2. PCR reaksiyonu döngü şartları	38
Tablo 4.1. Mart ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları	41
Tablo 4.2. Nisan ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları	40
Tablo 4.3. Mayıs ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları	41
Tablo 4.4. Haziran ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları	41
Tablo 4.5. Temmuz ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları	42
Tablo 4.6. Ağustos ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları	42
Tablo 5.1. Erzincan ili 1926 - 2016 yılları arasında gerçekleşen ortalama yağış değerleri.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
μ	Mikron
μm	Mikrometre
μg	Mirogram
μl	Mikrolitre
rpm	1 dakikadaki devir sayısı
V	Volt

Kısaltmalar

AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksiği sedromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
ASKİ	Ankara Su ve Kanalizasyon İdaresi
BAL	Bronkoalveolar lavaj
CDC	Center, s for Disease Control and Prevention
DFA	Direkt İmmünfloresan Tekniği
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzime-Bağlı-İmmün Analiz (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
İFA	İndirekt Floresan Antikor Testi (Immunofluorescence Assay)

IFAT	Immunofluorescence Antibody Test
Ig	İmmünoglobulin
IMS	İmmunomagnetik separasyon
IMS-IF	Specific immunofluorescence
LAMP	İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi (Loop Mediated İzothermal Amplification)
MAF	Modifiye Asit Fast yöntemi
MKSA	Modifiye Kinyoun'un Aside Dirençli Boyama Yöntemi
MZN	Modifiye Ziehl Neelsen boyama yöntemi
USA	Amerika Birleşik Devletleri
PBS	Tampon çözelti (Phosphate Buffered Saline)
PFGE	Darbeleri alan jel elektroforezi (Pulsed field gel electrophoresis)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriksiyon fragment length polymorphism)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
TRAP-C2	<i>Cryptosporidium-2</i> geninin Thrombospondin adhesive proteini
UV	Ultra Viyole
TS	Türkiye Standardı

1. GİRİŞ

Su, en küçük organizmadan, en büyük canlıya kadar, bütün biyolojik yaşamın ve canlılık aktivitelerinin devamlılığını sağlar. Canlıların hayatlarını idame ettirebilmeleri için gerekli en önemli kaynaktır. Fakat günümüzde kullanılabilir su kaynakları süratle kirlenmekte ve çeşitli sebeplere bağlı olarak yetersiz kalmaktadır (Taş vd., 2010).

Dünyadaki suyun % 97' sinden fazlası tarımsal faaliyetler için kullanılamaz özelliktedir. Bu oran okyanus ve denizlerdeki suyu kapsamaktadır. Su kaynaklarının geriye kalan % 3' lük kısmı ise tatlı suları kapsamaktadır (Seckler vd., 1998). Dünyadaki oranı bu kadar az olan tatlı suların % 78' ini ise kuzey ve güney kutuplarındaki buzullar oluşturmaktadır. Geriye kalan % 22' lik bölümü dünyanın bütün ülkeleri arasında sulamada, sanayi sektöründe, içme ve kullanma suyu eldesinde kullanılmak üzere paylaşılmaktadır (Aküzüm vd., 1999).

TS 266 standardına göre içme ve kullanma suyu, kaynağına bakılmaksızın orijinal haliyle veya arıtıldıktan sonra bu standartta belirtilen özellikleri sağlayan, genel olarak içme, yemek yapma, gıda maddelerinin hazırlanması (gıda maddelerinin hazırlanmasında gıdalar ile doğrudan temas durumunda olan sular) gibi amaçların yanısıra temizlik amacıyla da kullanılan sular olarak tanımlanmaktadır (TS 266, 2005).

Canlılarda vücut aktiviteleri için gerekli olan su ihtiyacının yanında kullanım suyuna duyulan ihtiyaçta önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada bulunan su rezervi 1.500.000.000 km³ civarında olup bu miktarın sadece % 0,2' si içme ve kullanma suyu olarak kullanılabilen özelliklere sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından kullanma suyuna olan ihtiyaç kişi başına ortalama 150 lt/gün olarak kabul edilmiştir. Bu ölçü batıdaki ülkelerde günlük 500 lt/güne kadar çıkmakta olup geri kalmış olan Asya ve Afrika bölgelerinde 50 lt/güne kadar düşmektedir (Kaypmaz vd., 2001).

Suyun içme ve kullanma suyu olarak kullanılabilmesi için hangi kaynaktan elde edilirse edilsin fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik niteliklerinin sağlık açısından

belli özellikleri taşıması gerekmektedir (Kaypmaz vd., 2001). Bu nitelikler TS 266 standardına göre Tablo 1.1’ de belirtildiği gibidir.

Tablo 1.1. TS 266 Standardına Göre İçme ve Kullanma Sularının Taşınması Gereken Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikler

	Özellik	En Çok Değer
Mikrobiyolojik Özellikler	<i>Escherichia coli (E.coli)</i>	0/100 mL
	<i>Enterococci,</i>	0/100 mL
	Antimon	5,0 µg/L
	Arsenik	10 µg/L
	Benzen	1,0 µg/L
	Bor	1,0 µg/L
	Bromat	10 µg/L
	Kadmiyum	5,0 µg/L
	Krom	50 µg/L
	Bakır	2000 µg/L
Kimyasal Özellikler	Siyanür	50 µg/L
	Florür	1,5 µg/L
	Kurşun	10 µg/L
	Cıva	1,0 µg/L
	Nikel	20 µg/L
	Nitrat	50 mg/L
	Nitrit	0,50 mg/L
	Pestisitler	0,10 µg/L
	Toplam pestisit	0,50 µg/L
	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	0,10 µg/L
	Selenyum	10 µg/L

İnsanlar, yaşamsal ve ikdisadi ihtiyaçları için suyu doğadan alır ve kullanırlar. Kullanım sonrasında suyu tekrar doğaya verirler. Bu esnada suya bırakılan atık maddeler suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik niteliklerini değiştirerek, su kirliliğini ortaya çıkarırlar. Buna bağlı olarak su kirliliği, sularda insan etkisiyle

oluşan, su kaynaklarının kalitesinin düşmesine bağlı olarak suyun kullanımını kısıtlayan veya tamamen engelleyen ve kullanımı aksatacak miktarda organik, inorganik, biyolojik ve radyoaktif maddeler barındırması olarak tanımlanmaktadır (Uslu, 2001).

Nüfusun hızla artmasına karşın su kaynaklarının sabit kalması nedeniyle güvenilir suya olan ihtiyaç da her geçen gün önemini arttırmaktadır. Bu nedenle, kısıtlı olan içme ve kullanma sularında mikrobiyolojik kirlilik halk sağlığı açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır (Alkan vd., 1999).

Ülkeler su varlıklarına göre; yılda birey başına düşen kullanılabilir su miktarı 1.000 m³' ten daha az olanlar su fakiri, yılda kişi başına düşen kullanılabilir su miktarı 2.000 m³' ten daha az olanlar su stresi çeken ve yılda kişi başına düşen kullanılabilir su miktarı 8.000-10.000 m³' ten daha fazla olan ülkeler ise su zengini olarak adlandırılır (Ertem vd., 2012).

Ülkemizde yılda kişi başına düşen kullanılabilir su miktarı yaklaşık 1.500 m³ olup; bu duruma göre ülkemiz su stresi çeken ülkeler arasında gruplandırılmaktadır. Gereken önlemler alınmazsa ülkemiz de yakın bir tarihte su fakiri ülkeler arasına gerileyecektir (Ertem vd., 2012).

Su kaynaklarındaki kirliliğin artması ile dünyadaki nüfusun yaklaşık olarak % 20'si güvenilir olmayan içme suyu kullanmakta ve buna bağlı olarak içme ve kullanma suları ile çeşitli hastalıkların insanlara bulaşma olasılığı da artmaktadır (Irmak 2008).

Dünya üzerindeki hastalıkların da yaklaşık % 80' inin kirli su ve temizlik koşullarının yetersizliğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle yılda 200 milyona yakın insan su ile ilişkili hastalıklara yakalanmakta ve her yıl büyük bir kısmını çocukların oluşturduğu 5 milyondan fazla kişi, su kirliliğinin neden olduğu hastalıklarla hayatını yitirmektedir. (Anonim, 2007; Irmak 2008; Kaya, 2011).

İçme ve kullanma suları ile bağlantılı hastalıklar bulaşma şekillerine göre dört ana grupta incelenmektedir. Bu gruplar hastalığa neden olan etkeninin suya karışması ile oluşan hastalıklar, su miktarının azlığı sonucu oluşan hastalıklar, suda yaşayan

canlılar aracılığı ile oluşan hastalıklar ve su ile bağlantılı vektörlerin oluşturduğu hastalıklar olarak belirtilmiştir (Irmak 2008).

Su ile bulaşan hastalıkların en önemli grubunu hastalık etkeninin suya karışması neticesinde oluşan hastalıklar oluşturmaktadır. Bu hastalıklar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hala önemli sağlık sorunu olma özelliklerini sürdürmektedirler (Kaypmaz vd., 2001).

Önemli su orijinli patojenler önceden tanımlanmış fakat hastalık yaptığı yeni belirlenenler ve yeni tanımlanmışlar olarak sınıflandırılabilirler. Bu patojenlerin büyük kısmı ilk sınıfa aittir ve *Cryptosporidium*, *Microsporidia* gibi paraziter protozoonları, hepatit E virüsünün de dahil olduğu bazı virüsleri, *Mycobacterium* spp., aeromonasları, *L. pneumophila* ve *P. aeruginosa* gibi çok sayıda çevresel bakteriyi içerir (Sharma vd, 2003).

Her geçen yıl hastalık yaptığı yeni anlaşılan ve önem kazanan patojenlerin sayısındaki artışın altında çeşitli sebepler yatmaktadır. Öncelikle en önemli sebep moleküler, immunolojik ve immunomagnetik teknikler gibi etkili tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesidir (Hurst ve Toranzus, 1997). Diğer bir sebep ise, bu daha çok *Cryptosporidium*' un önemi ile ilişkilidir, immün sistemi baskılanmış bireylerin sayısındaki artıştır. Bunlara örnek olarak, kanser veya organ nakli için ilaç tedavisi uygulanan hastalar, yaşlılar ve edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu olan (AIDS) hastalar verilebilir. Batıda bu patojenlerin önemi, büyük bir olasılıkla bu bölgede sanayinin gelişmesine bağlı olarak fazla sayıda immün sistemi baskılanmış birey bulunmasından kaynaklanmaktadır. Artan şehirleşme, son yıllarda sürekli artan insan hareketleri, devamlılık gösteren iklimsel değişiklikler, patojenlerin birçok ilaca karşı direnç oluşturması ve patojenlerin horizontal gen transferi yolu ile virülens özelliğini kazanması gibi durumlar diğer nedenler arasındadır (Sharma, 2003).

Sağlığa herhangi bir zararı olmayan suyun en önemli niteliği bakteriyolojik niteliği olup, içme ve kullanma sularının kesinlikle hastalık yapan mikroorganizmaları içermemesi gereklidir (Kaypmaz vd., 2001). Tablo 1.2' de önemli su kaynaklı patojenler verilmiştir.

Tablo 1.2. Su Kaynaklı Patojenler (Anonim, 2008)

Patojenler	
Bakteriler	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>
	<i>Escherichia coli</i> – Patojenik
	<i>E. coli</i> – Enterohemorajik
	<i>Legionella</i> spp.
	Tuberküloz olmayan mycobacteri
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella typhi</i>
	Diğer salmonellalar
	<i>Shigella</i> spp
	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	
Virüsler	Adenovirüs
	Enterovirüs
	Astrovirüs
	Hepatit A virüsü
	Hepatit E virüsü
	Norovirüs
	Sapovirüs
Rotavirüs	
Protozoalar	<i>Acanthamoeba</i> spp
	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
	<i>Entamoeba histolytica</i>
	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Naegleria fowleri</i>	
<i>Toxoplasma gondii</i>	
Helmintler	<i>Dracunculus medinensis</i>
	<i>Schistosoma</i> spp.

Bu türler arasında *Cryptosporidium parvum* insanları ve hayvanları en sık enfekte edebilen enterik protozoon parazitlerden biridir. Dünyada da oldukça yaygındır. Son yıllarda bu parazitin suyla geçerek salgınlar yapması ve özellikle bağışıklığı

baskılanmış olan bireylerde kolay geçmeyen ishallere neden olması açısından dikkatleri üzerine çekmiştir (Current ve Bick 1989, Spano ve Crisanti 2000). Yapılan çalışmalar ile *C. parvum*' un insan sağlığı açısından büyük endemik salgınlara, hayvancılıkta ise büyük ekonomik kayıplara neden olduğu ortaya konulmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla *C. parvum*; ookistlerinin kirlilik oluşturabilecek yoğunlukta çevrede bulunuyor olması, ookistlerinin büyüklüklerinin içme suyu arıtma tesislerinin filtrelerinden geçecek kadar küçük (4-6 µm) olması ve dolayısı ile şehir şebeke suyuna kolaylıkla karışması, klor gibi su dezenfeksiyonunda kullanılan örneğin %3' lük hipoklorid, iyot bileşikleri, kresilik asit, benzalkonyum klorid gibi dezenfektan maddelere de ileri düzeyde dirençli olması, nemli ve soğuk ortamlarda canlılık ve enfektivitesini uzun süre koruyabilmesi ve enfeksiyon dozunun hayli düşük olması gibi özelliklerinden dolayı suyla geçen en önemli patojenlerden biri haline gelmiştir. Bu nedenle de halk sağlığı açısından da önemli bir yere sahip olmuştur. (Eckert,2005; Ardıç 2007). Bu özelliklere sahip olması *C. parvum*' un sulardan kaynaklanan büyük kitlesel salgınlarını da açığa kavuşturmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ:

2.1. *Cryptosporidium parvum*' un Tarihçesi

Cryptosporidium türleri ilk defa Clarke tarafından 1885 yılında fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri şeklinde tarif edilmiştir (Fayer ve Ungar, 1986; Current ve Garcia, 1991; Ok vd., 1995). 1905 yılında ise Ernest Edward Tyzzer tarafından farelerin gastrik mukoza hücrelerinde gösterilmiş ve diğer Coccidia cinslerinden farklı olarak ookistlerinin içinde sporokistlerinin olmaması nedeniyle eski Yunancada hidden sporocysts (saklı kist) anlamına gelen *Cryptosporidium* olarak isimlendirmiştir (Casemore vd., 1985; Hashwey vd., 1997). Yine Tyzzer tarafından 1912 yılında laboratuvar farelerinin ince bağırsaklarında bulunarak ilk kez tür düzeyinde *C. parvum* olarak adlandırılmış ve oluşturduğu hastalığa ise Criptosporidiosis adı verilmiştir (Fayer ve Ungar, 1986; Yücel, 1989).

2.2. *Cryptosporidium parvum*' un Sistematığı

Cryptosporidium türlerinin sınıflandırmadaki yeri ilk olarak 1911' de Leger tarafından belirlenmiştir (Dubey vd., 1990). *C. parvum*, Apicomplexa şubesinde, Coccidia alt sınıfında, Eucoocidiida takımı ve Eimeriina alt takımında, Cryptosporidiidae ailesinde *Cryptosporidium* cinsinde sınıflandırılmaktadır (O'Donoghue, 1995). *Cryptosporidium*' un 13 farklı türü tanımlanırken (Olson vd., 2004; Thompson vd., 2008) son yıllarda daha yeni *Cryptosporidium* türleride tanımlanmıştır. Bu sebeple zamanla bulunan tür sayısı artmış ve bu sayı 23'e kadar çıkmıştır (Muhid vd., 2011). Ancak *C. parvum*, *C. andersoni* (mammalian), *C. meleagridis* ve *C. baileyi* (avian), *C. serpentis* (reptiller) ve *C. nasorum* (balık) olmak üzere 6 temel tür yaygın olan belirtilmektedir.

C. parvum Tip1 ve Tip 2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılır (Peng vd., 1997). Bu iki alt grup arasındaki farklar genetik markerlar kullanılarak ve farklı konakçı dizilerinin olduğu belirlenerek tespit edilmiştir (Widmer, 1995; Carraway vd., 1996; Morgan vd., 2000). *C. parvum* Tip 2 insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde bulunurken Tip 1'in sadece insanlarda görüldüğü belirtilmiştir.

Tablo 2.1. *Cryptosporidium parvum*' un sınıflandırılması (Mehlhorn ve Piekarski 2002)

Alem	Protista
Altalem	Protozoa
Şube	Apicomplexa
Sınıf	Sporozoa
Altsınıf	Coccidia
Takım	Eucoccidia
Alttakım	Eimeriorina
Aile	Cryptosporidiidae
Cins	<i>Cryptosporidium</i>

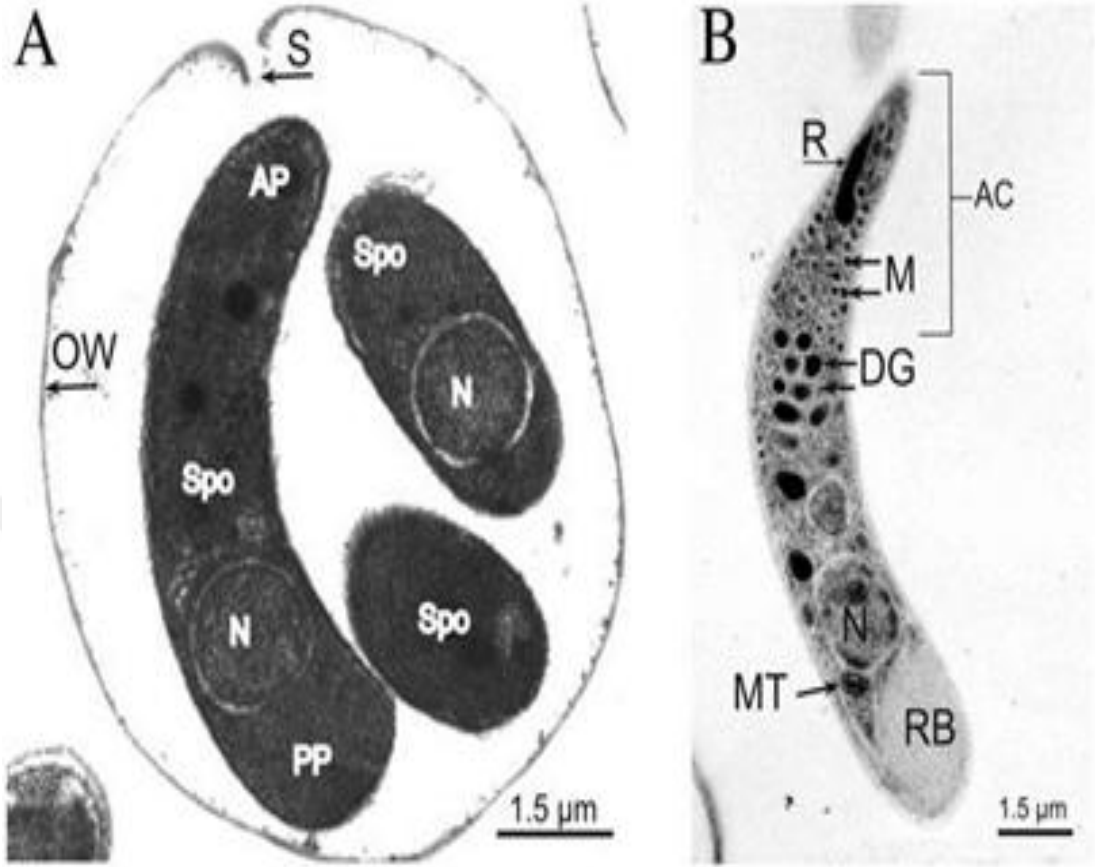
2.3. *Cryptosporidium parvum*' un Morfolojisi

C. parvum, 2-6 µm büyüklüğünde coccidian bir protozoon olup, zorunlu hücre içi parazittir. Ookistleri, yuvarlak veya ovale yakın şekildedir ve kalın duvarlıdır. Ookistlerin içinde dört adet sporozoit bulunmaktadır. Diğer kocsidian parazitlerden farklı olarak sporozoitleri saran sporokistler bulunmamaktadır. *C. parvum*'un ookist ve sporozoit yapısı şekil 2.1' de gösterilmektedir.

Sporozoit formları 4,9 x 1,2 µm çapında olup yarım ay şeklindedir ve ookist içerisinde birbirlerine paralel olarak konumlanmaktadır. Sporozitlerin çekirdekleri arka kısmındadır, duvarı ise 50 nm kalınlığında düz ve renksiz yapıdadır. Sporozoitlerden oluşan trofozoitler ise 2-2,5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapıdadırlar (Hamnes vd., 2006; Fayer vd., 2008).

Tip 1 ve Tip 2 merozoitler morfolojik olarak yuvarlak ya da yarım ay şeklinde ve aynı görünüme sahiptirler. Merozoitler yaklaşık olarak 1 x 5 µm büyüklüğündedirler.

Mikrogametositler çok kısa sürede mikrogametlere dönüştüklerinden dolayı her zaman görülememektedirler. Büyüklükleri 4 x 5 µm'dur. Mikrogametositler içinde şekillenen mikrogametler ise 0,4 x 0,95 µm büyüklüğünde olup çivi şeklindedirler. Makrogametositler ise küresel olup küçük çekirdeklidir ve olgun makrogametositler 4,6 µm büyüklüğündedirler (Boch vd., 1982).



Şekil 2.1. A: *C. parvum*'un yapısı. S: yarık, Spo: Sporozoitler, N: çekirdek, OW: Ookist duvarı, AP: üst kutup, PP: arka kutup, B: Apikal kompleks ve organelleri gösteren sporozoitin enine kesiti, AC: apikal kompleks, M: mikronemes, R: rhoptry, MT: Mito

2.4. *Cryptosporidium parvum*' un Yaşam Döngüsü:

C. parvum, insan ve hayvanlarda sindirim ve solunum yolu epitelyum hücrelerinin mikrovillus bölgesine yerleşerek bu bölgelerde enfeksiyon oluşturur ve tüm gelişim evrelerini epitel hücrelerin apikal kısımlarında geçirmektedir. Hücrede çoğalmasına rağmen hücrenin sitoplazmasında bulunmamaktadır (O'Handley ve Olson 2006). Yani hücre içi ekstrastoplazmik bir parazittir (Heine vd., 1984, Kaske ve Kunz 2003). Diğer hücre içi parazitleri hücrenin sitoplazması içine yerleşirken, *Cryptosporidium* hücrenin ekzositoplazmik alanına yerleşir. Bu özelliği nedeniyle diğer hücre içi parazitlerden ayrılır.

İnsan ve danalardan elde edilen *Cryptosporidium* izolatlarının fare, tavuk embriyosu ve insan hücre kültürlerinde gelişimlerinin incelenmesi sonucu *Cryptosporidium*

parvum' un yaşam siklusunun altı gelişim evresinden oluştuğu ve tüm evrelerinin tek bir konakta gerçekleşmekte olduğu belirlenmiştir (Current ve Long, 1983). Bu gelişim evreleri; eksitasyon, merogoni, gametogoni, fertilizasyon, ookist dönemi ve sporogoni olarak tanımlanmaktadır (Current ve Bick, 1989; Ungar, 1995; Saygı, 1998; Spano ve Crisanti, 2000).

2.4.1. Eksitasyon (Kistlerin açılması)

Parazitin enfekte konağın dışkısı ile dışarı atılan ookist sporlanarak enfektif özellik kazanır ve yiyecek, içecek veya bazı diğer çevresel etmenler aracılığıyla oral yolla, konjunktiva veya solunum yoluyla vücut içerisine alınırlar (Starling ve Arrowood, 1993). Bu evrede stural birleşme alanında meydana gelen ayrılma ile ookistler açılır ve içerisindeki hareketli enfektif sporozoitler açığa çıkar (Current ve Reese, 1986). Bu ayrılma anaerobik veya indirgeyici ortamlarda ookist duvarının permeabilitesinin değişimine bağlı olarak başlar ve ayrılmada pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik indirgeyici etmenler gibi faktörler rol oynamaktadır. (Starling ve Arrowood, 1993; Sears ve Kirkpatrick, 2001).

2.4.2. Merogoni (Aseksüel çoğalma)

Yaşam döngüsünün ikinci aşaması olan merogoni evresi bağırsak epitel hücreleri arasına giren sporozoitlerin aseksüel olarak çoğalmasdır. Sporozoitlerin bağırsakta tutunma yeri jejenumun sonu ve ileum olup, buna ek olarak da pankreatik kanallara, safra kanalına ve solunum sistemine yerleşebilmektedirler. Konağın sindirim yolunda serbest kalan sporozoitlerden her biri apikal oluşumlarının yardımıyla kayma hareketi yaparak konağın bağırsak epitel hücreleri (enterositler) içine girmekte ve hücrelerin mikrovillus bölgesinde (parazitoforoz vaküol içerisinde) trofozoit (tek nükleuslu meront) formuna dönüşmektedirler (Ok ve Balcıoğlu, 2007). Öncelikle mikrovillus bölgelerine tutunan sporozoitlerin mikrovillus kıvrımları tarafından membran kesesi oluşturularak etrafi sarılmaktadır. Daha sonra parazitin alt kısmındaki plazma membranı ile konak hücre mebranı arasında kaynaşma gerçekleşmektedir. Sporozoiti içine alan konak hücre membranının bozulmasıyla sporozoitin membranı ile konak

hücrenin plazması teması geçer. Lokalizasyon konak hücrenin üst kısımlarında sınırlı kalmasına rağmen sporozoit puyer plaklarındaki M hücrelerinin dip kısımlarına kadar ilerleyebilir. Böylece konak hücrede intrasellüler-extrastoplazmik bir yerleşim göstermiş olur. Sporozoitler ilk aşamada yuvarlak, granüler endoplazmik retikulumdan yoksun ve apikal kompleksin tam şekillenmediği trofozoitlere dönüşmektedirler (Marcial ve Madara, 1986). Apikal kompleks trofozoitler olgunlaşınca kaybolmakta ve ribozomal endoplazmik retikulum meydana gelmektedir. Trofozoitler 2-2,5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapıda olup ribozomal endoplazmik retikuluma gereksinim duymaktadırlar (Saygı, 1998; Yetkin, 1998). Konak hücre içerisinde beslenen, büyüyen trofozoit şizogoni ile çoğalarak 6-8 merozoit meydana getirmektedir. Merozoitleri taşıyan hücreye tip-I meront (şizont) denilmektedir. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, tip-I meront oluşumunun sürekli tekrarı söz konusu olabilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Tip-I merontların parçalanmasıyla serbest hale geçen merozoitler infekte olmamış mikrovilluslar arasına girerek yeni bir şizogoni başlatırlar veya tip-I merontlar 4 merozoit içeren tip-II merontlara dönüşmektedirler. Tip-II merontlardan oluşan merozoitler yeni hücreleri infekte ederek gametogoni başlatmaktadırlar (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

2.4.3. Gametogoni

Şizogoni sonucunda, hücre parçalanınca tip-II merontların içinde oluşan 4 merozoit serbest kalarak ve yeni konak hücrelerine yerleşerek eşeyli üreme fazı olan gametogoni başlatmaktadır. Konak hücreye giren merozoitler gametogoni ile birlikte, mikro veya makrogametositlere, daha sonra da mikro ve makrogametlere dönüşmektedirler (Ok vd., 1995; Saygı, 1998; Topçu vd., 2002). Mikrogametositler yoğun çekirdekli olup gelişimlerinin sonucunda her bir mikrogamonttan kamçısı bulunmayan 16 tane mikrogamet meydana gelmektedir. Makrogametositler ise glikojen ve amilopektin granüllerinden zengindir ve her bir makrogamonttan yalnızca bir makrogamet meydana gelmektedir (Current, 1986; Current ve Reese, 1986; Özer, 1990; Ungar, 1995; Dirim, 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 birisi, 4-6 µm büyüklüğündeki konak hücre membranına yapışmış olarak bulunan makrogamet ile birleşerek fertilize olmaktadır. Sonuç olarak diploit kromozoma sahip zigot oluşmaktadır (Current ve Bick, 1989; Mark vd., 1999; Dirim, 2003).

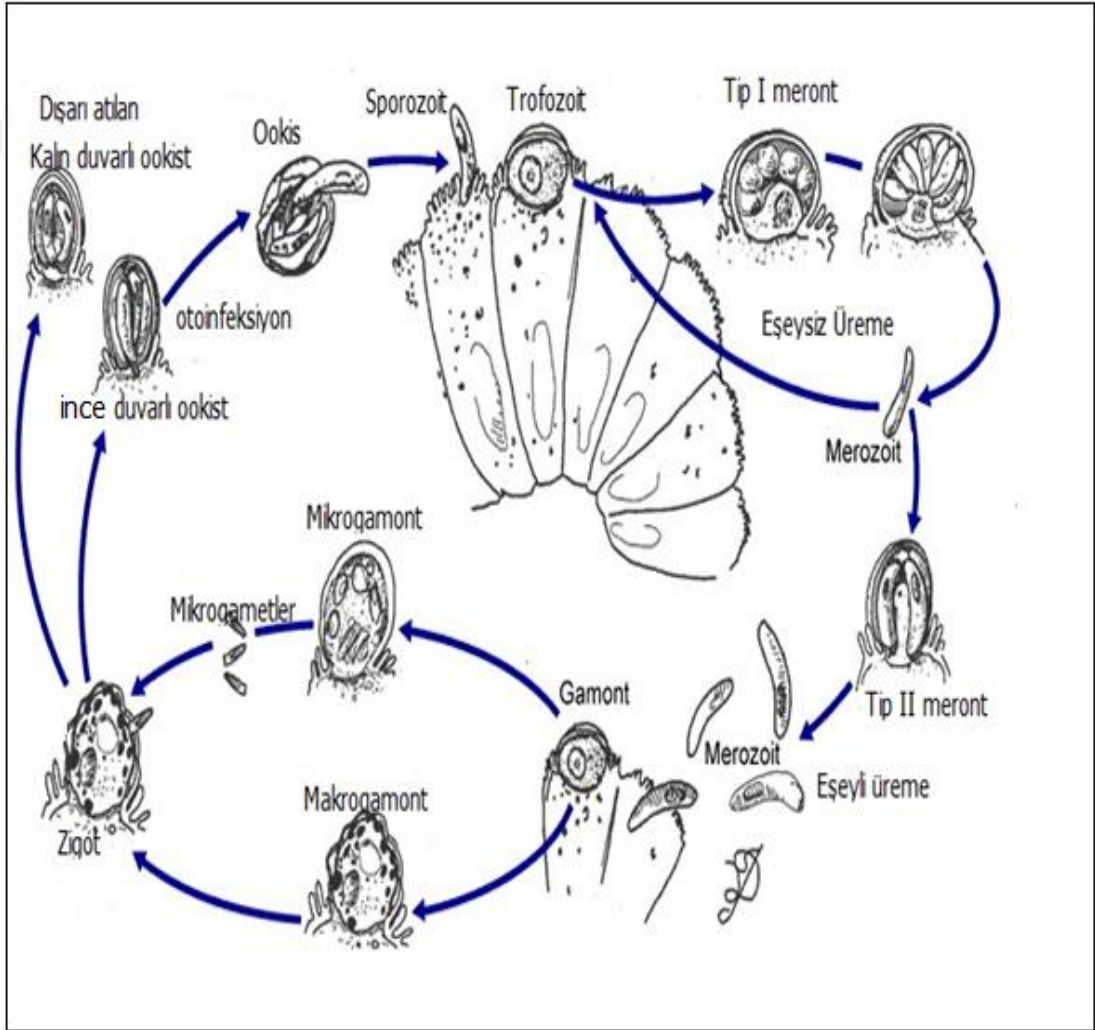
2.4.5. Ookist dönemi

Bu evrede ookist duvarının oluşumu tamamlanmaktadır. 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 vd., 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 birisidir. 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 bulunmaktadır. İç tabakası ise yine glikoproteinlerden oluşmaktadır (Mark vd., 1999; Robin ve Petry, 1999).

2.4.6. Sporogoni

Sporogoni evresinde konağın gastrointestinal sisteminde olgunlaşan ookistlerin içinde sporlanma ile enfekte özelliği kazanmış sporozoitler oluşmaktadır. *C. parvum*' un eşeyli üremesi sonucunda yaklaşık % 80' i kalın % 20' si ise ince duvarlı özellik gösteren iki farklı tip ookist oluşumu gözlenmektedir (Dubey vd., 1990; Ok vd., 1995). İnce çeperli ookistler içinde 4 adet sporozoit bulunmaktadır ve ookistler konak vücudundan dışarı çıkmadan, bağırsak içinde açılmaktadır. Bu ookistlerin içlerinde bulunan sporozoitler serbest kalarak yeni epitel hücrelere girmekte ve konakta enfeksiyonun devamlılığını sağlamaktadırlar. Bu tip bulaş şekli iç oto enfeksiyon olarak adlandırılmaktadır (Saygı, 1998; Köktürk, 2002; Topçu vd., 2002).

Kalın çeperli yapıya sahip 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışkısı ile dışarıya atılmakta ve bu sayede enfeksiyonun bir konaktan diğerine bulaşmasına neden olmaktadır (Dubey vd., 1990; Unat vd., 1995; Starling ve Arrowood, 1993). Bulaşma fekal-oral yolla, ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir (Saygı, 1998; Fayer vd., 2000; Köktürk, 2002; Terzi, 2005). *Cryptosporidium parvum*' a ait yaşam döngüsü ve ookistlerin gelişim evreleri Şekil 2.2. ' de gösterilmiştir.



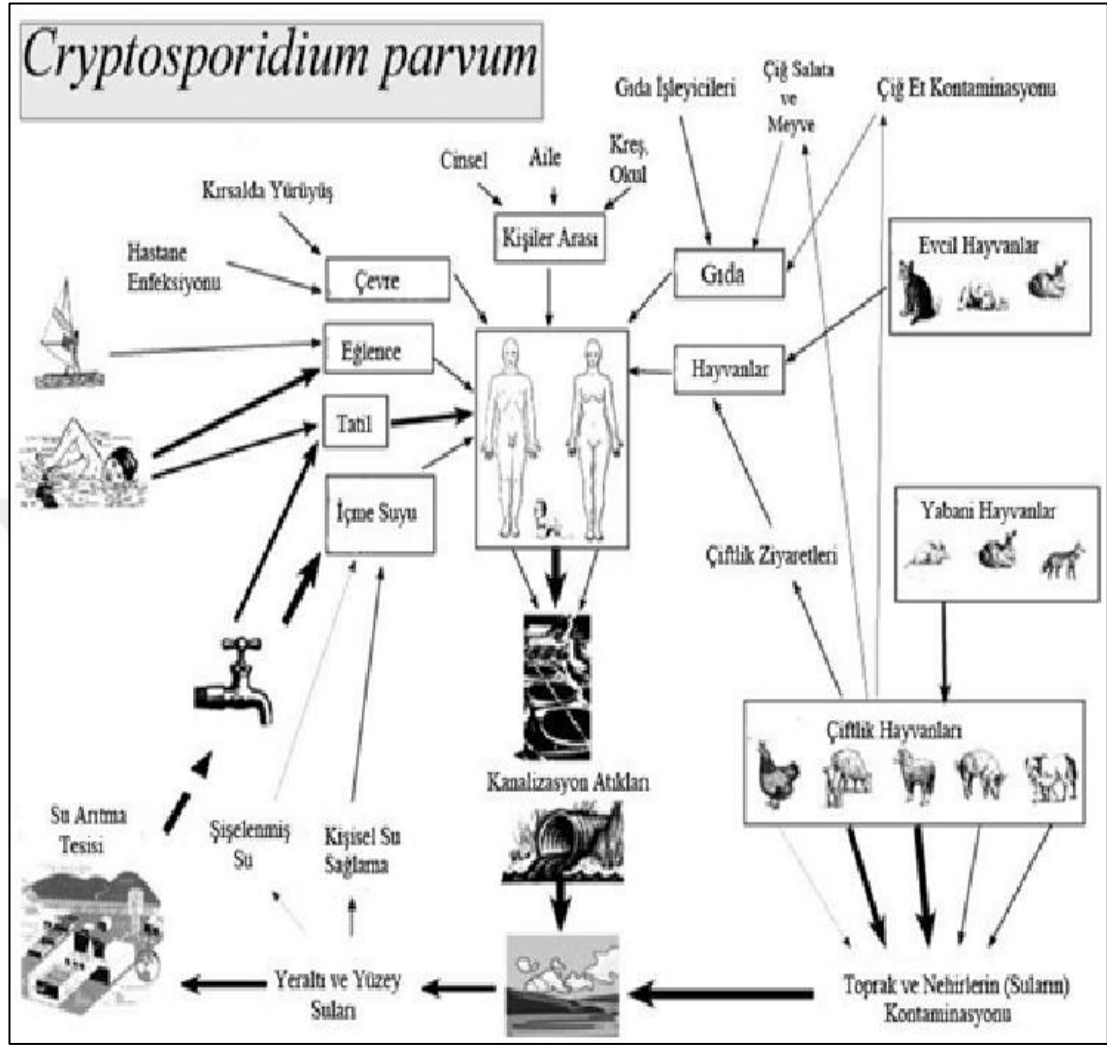
Şekil 2.2. *Cryptosporidium parvum*' un gelişim evreleri

2.5. Cryptosporidiosis

Cryptosporidiosis *Cryptosporidium* cinsine bağlı protozoonların neden olduğu, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan, kanatlıları, balıkları, sürüngenleri ve memelileri kapsayan 200' aŐın hayvan türünde görülen zoonoz bir hastalıktır (Ergüven vd.,1998, Gdemerdan vd., 1999 ; Altıntaş, 2002; Miller vd., 2003).

Günümüze kadar bildirilen *Cryptosporidium* türlerinden en az 8'inin (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C.suis*, *C. muris* ve *C. andersoni*) ve 40'dan fazla genotipten 7 tanesinin insanları direkt, bir kısmının ise tesadüfen enfekte ettiği bildirilmiştir (Robinson vd., 2008). *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C.canis* ve *C. rabbit* türleri insanlarda patojen olarak değerlendirilmiştir. Enfeksiyonların ana unsuru olarak *C. parvum* ve *C. hominis*' e dikkat çekilmiŐtir fakat bu türler coğrafik Őartlara göre değişmektedir. *C. hominis* insandan insana bulaŐırken, *C. parvum*'un ise hem insandan insana hem de hayvandan insana bulaŐtıęı belirtilmektedir (Xiao ve Feng., 2008; Abd El Kader vd., 2012;).

C. parvum insan ve hayvanlara değişik yollardan bulaŐabilmektedir (Clark 1999). Şekil 2.3' de *C. parvum*' un bulaş yolları gösterilmektedir. Fakat yapılan çalışmalarla Cryptosporidiosis' in en büyük bulaş yolunun kontamine suların içilmesi ile olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 2.3. *Cryptosporidium parvum*' un bulaş yolları

Enfeksiyon 10 ookist alımıyla başlayabilmekte ve inkübasyon süresi 5 ila 28 gün arasında değişmektedir. İleum ve jejunum tutulumu sonucunda şiddetli ishalin yanında, baş ve kas ağrıları, hafif ateş, halsizlik, kuvvet ve iştah kayıplarının da hastalığın semptomları arasında olduğu bildirilmiştir (Cheng vd., 2009; Dorny vd., 2009). *Cryptosporidium*' un neden olduğu diyarenin bol sulu, mukuslu olduğu, lökosit ve eritrosit içermediği bildirilmiştir. Hastalığın tedavi olmadan da klinik belirtilerinin birkaç gün ve birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebileceği bildirilmiş olmasına rağmen, immün yetmezliklerde klinik tablo değişebilmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007; Dorny vd., 2009).

Enfeksiyonun şiddeti kişinin bağışıklık sisteminin durumuna bağlıdır. Enfeksiyon sağlıklı kişilerde hiç bir semptom göstermeden seyredebileceği gibi, AIDS başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde önemli uzamış diyare ile birlikte, pankreas, hepatobiliyer sistem ve solunum sistemini de etkileyerek hayati tehlike yaratan sonuçlara neden olabilmektedir (Prescott vd., 2002; Eckert, 2005).

Cryptosporidiosis çocuklarda görülen ishaller arasında da önemli bir yere sahiptir ve 1-5 yaş arasındaki çocuklarda daha sıklıkla görülmektedir. *Crptosporidiosis* prevalansı açısından hasta çocuklar ile aile içi veya mesleki temas sebebiyle 20-40 yaş grubundaki erişkinler ikinci önemli grubu oluşturmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun mevsimlere bağlı olarak değişebildiği, özellikle daha sıcak ve daha nemli aylarda sık görüldüğü fakat yeni olguların sayısının her ülkede farklı zamanlarda artabileceği bildirilmiştir (Dirim 2003).

Cryptosporidiosis 1976 yılında immun sistemi sağlam 3 yaşındaki ishalleri bir çocukta ve immün sistemi baskılanmış, sindirim sisteminde emilim bozukluğu bulunan 39 yaşında ishalleri bir erkekte *C. parvum* ookisti tesbit edilene kadar omurgalı hayvanların hastalığı olarak bilinmekteydi. 1976-1981 yılları arasında ise immün direnci baskılanmış hastalarda az sayıda cryptosporidiosis bildirilmiş olmasına rağmen, 1981-1982 yıllarında, yalnızca AIDS olgularında enfeksiyonun 47 hastada şiddetli enterite yol açtığı saptanmıştır. 1982 yılında cryptosporidiosisin AIDS' li hastalarda tehlike oluşturan bir enfeksiyon olduğu CDC' nin (Center, s for Disease Control and Prevention) raporlarıyla ortaya konduktan sonra *Cryptosporidium* spp. hakkında yapılan çalışmalarda artış olmuştur (Çetinkaya, 2004; Berger, 2006; Özcel, 2007)

Ülkemizde de hem immun sistemi sağlam, hem de immun sistemi baskılanmış kişilerde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalara dayanarak *Cryptosporidium'* un önemli bir gastroenterit nedeni olduğu belirlenmiştir. Özellikle çocukluk yaş grubundaki gastroenteritlerde, lenfoma ve lösemi gibi malign hastalıklarda, AIDS gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda *Cryptosporidium spp.* mutlaka araştırılmalıdır (Yıldız vd., 2001; Delibaş vd, 2001; Aksoy vd, 2003;). Sonuç olarak, hastalığın süresi ve şiddeti konağın immun durumuna bağlıdır.

Bu zamana kadar dünyada kirli içme suyunun tüketimi, kirli sularda yüzme ve diğer eylemlere bağlı olduğu bilinen su kaynaklı çok sayıda *Cryptosporidium* salgını kaydedilmiştir.

1986-1998 yılları arasında 10.000' den fazla kişiyi etkileyen *Cryptosporidium* salgınları bildirilmiştir. Bu salgınların da halka açık havuzlar, su eğlence parkları, göl veya nehir sularında yüzme ile geliştiği tesbit edilmiştir (Prescott, 2002; Eckert, 2005).

Amerika Birleşik Devletleri' ndeki (USA) su kaynaklı salgınlara bakıldığında kayıtlara geçen en önemli salgının 1993' te Milwaukee' de yaşandığı bilinmektedir. Milwaukee salgını kayıtlara geçen en büyük su kaynaklı salgın olup, salgın sırasında kanalizasyon örneklerinde % 90 oranında, nehir suyu örneklerinde % 75 oranında ve içme suyu örneklerinde % 28 oranında *Cryptosporidium* oookistlerin varlığı gösterilmiştir. Şehirde yaşayan AIDS' li kişilerin % 50' sinin *Cryptosporidium* ile enfekte olduğu ve 68 kişinin 6 ay gibi bir sürede yaşamlarını yitirdiği bildirilmektedir (Mac Kenzie vd., 1994; Eisenberg vd.,2005).

Yine 1984 yılında Texas'ta 5.900 kişinin yaşadığı bir yerleşim merkezinin iki ayrı noktasında *cryptosporidiosis* salgını görülmüştür. Bu iki merkeze içme suyunun aynı artezyen kuyusundan sağlandığı, suyun filtrelenmeden dolaşıma verildiği, ancak şebekeye verilmeden hemen öncesinde klorlama yapıldığı saptanmıştır. Salgından sonra boya testleri yardımı ile kanalizasyon atıklarının içme suyuna karıştığı kesin olarak tesbit edilmiş ve karışımın düzenli olmayan aralıklarla gerçekleştiği anlaşılmıştır. Fakat kanalizasyon atıklarının içme suyuna karıştığı nokta belirlenememiştir (Butler ve Mayfield, 1996).

1987 yılında ise Batı Georgia'da tahminen 13.000 kişinin etkilendiği salgında içme suyu kriterlerinin zamanın federal ve eyalet standartlarına uygun olduğu saptanmış fakat 489 kişinin gaitasına bakıldığında % 61' i *Cryptosporidium* pozitif olarak bulunmuştur. Alternatif içme suyu kullanan 322 kişiden % 20' side *Cryptosporidium* pozitif olarak belirlenmiştir (Butler ve Mayfield, 1996; Dietz vd., 2000).

Clitheroe' de (Lancashire, İngiltere) 2000 yılı Mart ayında ortaya çıkan cryptosporidiosis salgınına bakıldığında, 58 kişinin bu salgından etkilenmiş olduğu ve bu salgına epidemiyolojik çalışmalarla, hayvan dışkılarıyla temas halinde olduğu belirlenen musluk suyunun sebep olduğu tespit edilmiştir (Howe, 2002).

Yurt dışından bildirilen sudan kaynaklanan *Cryptosporidium* salgınlarının yanında, ülkemizde de bu tür salgınların olabileceği fakat bu konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Usluca ve Aksoy, 2006).

2.6. Cryptosporidiosis Tanısında Kullanılan Yöntemler

Cryptosporidium türlerinin tanısı çeşitli yöntemler kullanılarak dışkı, balgam ve safra örneklerinde yapılmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış, belirlenemeyen gastrointestinal şikayeti veya safra yolları iltihabı olan hastalarda ince bağırsak aspirasyon sıvısı veya biyopsi örneği, safra, karaciğer biyopsi örneği; solunum sistemi şikayeti olan bireylerde de balgam, Bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi örnekler; sinüziti olan bireylerde ise mide yıkama suyu incelenmektedir (Chalmers ve Katzer, 2013).

Tanısı ilk olarak bağırsak biyopsilerinde *C. parvum*' un çeşitli gelişim evrelerinin gösterilmesiyle konmuştur. İlk defa bağırsak biyopsisinde gösterilmesine rağmen hem pahallı ve uzun süre sonuç vermesi nedeniyle hemde ookistleri belirlemeye yönelik daha gelişmiş yöntemlerin ortaya çıkmasına bağlı olarak biyopsi yöntemi günümüzde tercih edilmemektedir (Casemore, 1991; Clark, 1999; Topçu vd., 2002).

Cryptosporidium ookistlerinin saptanmasında kullanılan başlıca yöntemler; direkt mikroskopi yöntemi, serolojik yöntemler, moleküler yöntemler, histopatolojik yöntemler ve kültür yöntemleridir.

İncelenecek örneklerde teşhisi kolaylaştırmak ve uygulanan teknikle daha etkili sonuca ulaşabilmek için konsantrasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu teknikler; Sheather' in yüzdürme yöntemi, formol-eter yöntemi, formol-etil asetat sedimentasyon yöntemi, percoll-sükroz yöntemi, doymuş çinko sülfat ve doymuş sodyum klorür yüzdürme teknikleri, demir III sülfat flotasyonu, dializ ile prüfikasyon, Cam çubuk sütun prüfikasyonu, İmmunomagnetik separasyon (IMS)

yöntemi gibi yöntemlerdir (Weber vd., 1992; Di Giovanni vd., 1999; Carey vd., 2004).

2.6.1. Mikroskopik yöntemler

Cryptosporidium türlerinin tanısında en yaygın kullanılan yöntem dışkıda ookist varlığı açısından boyalı ve boyasız preparatların ışık mikroskobu ile incelenmesi şeklindedir.

Boyasız preparatların hazırlanması için çöktürme veya yüzdürme teknikleri kullanılır. Yoğunlaştırma için Sheather'ın şeker çözeltisi, çinko sülfat (% 33) ve sodyum klorür (% 36) kullanılmaktadır. (Current ve Garcia 1991; Baron vd., 1994)

Toplanan örnekleri preparat hazırlayarak x10, x40 objektiflerde inceleyebilmek mümkündür (Akşehirli, 1995). Faz kontrast veya differensiyel interferens kontrast mikroskobu ile direkt olarak tarandığında ookistler saptanabilmektedir. Ancak, bu tip mikroskopların her laboratuarda bulunmaması, incelemenin güç olması gibi olumsuz faktörler söz konusu teknikleri geçersiz kılmaktadır. Genel olarak boyasız mikroskopik incelemelerde paraziti tanımlamak zordur ve ön bir tarama testi olmaktan öteye geçemez (Dubey vd., 1990).

Boyasız mikroskopik yöntemlerle *Cryptosporidium* ookistlerinin yapısal özellikleri ile içyapıları görülememekte ve ayrıca morfolojik yönden maya hücreleri ile fungal sporlara, küf sporlarına ve yağ globüllerine benzerlik gösterdiği için bu tür yapılarla karışabilmektedirler. Bu nedenle çeşitli boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Ancak, diğer pek çok parazitin boyanması amacı ile kullanılan hematoxylin (Reisner ve Spring, 2000), trikrom demir hematoxylin (Dubey vd., 1990), polyvinyl alkol gibi boyama teknikleri bu parazitin tanısında önem taşımazlar (Sears ve Kirkpatrick, 2001). İodin ile yapılan boyama basit, kolay ve mantar sporu ile ookistleri faz kontrast veya differensiyel interferens kontrast mikroskopunda ayırabilmenin mümkün olması açısından (ookist renksiz, maya kahverengi), ön bir tanı yöntemi olarak kullanılsa da (Starling ve Arrowood, 1993), genel düşünce lügol ile ookistlerin iyi bir şekilde tanımlanamayacağı şeklindedir (Silva vd., 2003). Soğuk boyama

tekniki olan bu yontemde etkenin belirlenmesi zordur, tecrube ve sonuclari dogrulama testleri ile kesinlestirmek gerekmektedir (Starling ve Arrowood, 1993).

Cryptosporidiosis' de teshis amaci ile karbol fuksin (Heine, 1982), safranin-metilen mavisi, asit fast, nigrosin, giemsa, floresan boyama (auramin-rhodamin, auramin-fenol floresans, auramin-karbol fuksin, akridin oranj) gibi tekniklerden yararlanilmaktadir (MacPherson ve McQueen, 1993; Leng vd., 1996). Bunlari yaninda ookiste benzeyen yapilari birbirinden ayirmak amaci ile boyama teknikleri kombinasyonlari da kullanilabilmektedir (Ignatus vd., 1997; Reisner ve Spring, 2000).

Gunumuzde tani amaci ile en sik kullanimlari boyama teknikleri, asit fast boyama yontemleridir. Bu grupta kinyoun-modifiye asit fast (Roberts vd., 1996), modifiye Ziehl Neelsen, soguk ve sicak asit fast teknikleri yer alir (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Asit fast boyama yontemleri sik sik kullanimlarsalarda hassasiyeti ve secicilikleri dusuktur (Clark, 1999).

Modifiye Asit Fast (MAF) sicak boyama yontemi rutin laboratuvarlarda preparatlarin istenilen zamanda degerlendirilebilmesi, ucuz olmasi, ookistlerin icyapisini diger yontemlerden daha ayrintili gosterebilmesi ve kirmizi boyanan ookistlerin mavi zeminde kolay ayirt edilebilmesi gibi nedenlerden dolayi diger boyama yontemlerine gore daha yararli bulunmustur. Ancak ısıtma islemi sirasinda buharlasan tahris edici maddeler nedeniyle havalandırma sisteminin yeterli olmadigi laboratuvarlarda MAF yerine kinyoun asit-fast yontemi tavsiye edilmektedir (Current ve Garcia,1991; Ungar, 1995; Gilles, 1999; Mandel vd., 2005). Kinyoun-asit fast boyamada, ookistler koyu kirmizi-pembe bir renkte boyanirken, maya ve diger doku artıkları boya almazlar (Dogan ve Akgun, 1998; Dirim vd., 2003). Soguk kinyoun boyamada ise yine ookistler mavi zemin uzerinde parlak kirmizi renginde, heterojen boyanmis olarak gorunur (Over, 1996).

Safranin-metilen mavisi ile boyanan preparatlarda ookistler mavi zemin uzerinde turuncu kirmizi renkte, seffaf bir çerçeve ile çevrili olarak gözlemlenir. Negatif boyama tekniklerinden olan nigrosin boyamada ise, zemin ve bakteriler yeşil rente

iken ookistler boya almazlar. Benzer durum mantar sporları için de geçerli olup ayrılabilmesi için deneyim gereklidir (Fayer vd., 2000). Yine metilen mavisi-eosin ve karbol fuksin boyama tekniklerinde de nigrosin boyama yöntemine benzer bir durum söz konusudur ve ortamdaki renk kontrastı taramanın yapılabilmesi için yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, bu tip negatif boyama yöntemlerinde, ookistlerin sporlar ile karıştırılma durumu mevcuttur. Karbol fuksin boyamada zemin kırmızı gözlenirken, ookistler ışık kırıcı özellikte, düzgün duvarlı ve oval bir şekilde görülürler (Weber vd., 1992; Erman vd., 2000). Mikroskopta x40 objektifte, eğer mikrometre ile oynanır ise ookistlerin içerisinde kırmızı kalıntılar şeklinde sporozoitler atırt edilebilir (Özlem vd., 1997). Karbol fuksin dimetilsülfooksit ile uygulandığında, ayırt edilebilir bir zemin üzerinde kırmızıya boyanmış ookistler rahatlıkla fark edilebilmektedirler (Fayer vd., 2000). Giemsa boyamada ise uygulama oldukça kolay olup hazırlanan preparatlar uzun süre saklanabilmektedir. Ancak, bu teknik ile boyanan preparatlarda ookistleri sporlardan ve diğer mikroorganizmalardan ayırmak zordur (Garcia ve Bruckner, 1997). Gram boyamada ise, ookistler soluk gri renkte boyanırken, çevresinde boyanmamış belirgin bir boşluk kalır, maya ve benzer diğer yapılar ise mor renkte boyanır (Doğan ve Akgün, 1998).

Mantar sporları ile ookistleri birbirinden kesin olarak ayırabilmek amacı ile asit fast-trikrom kombine boyama tekniğinden de yararlanılabilmektedir. Bu teknik ile boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yuvarlak veya oval ve parlak pembe renkte görülürler (Ignatus vd., 1997; Reisner ve Spring, 2000).

Floresan boyama yöntemleri kullanılarak boyanan örnekler floresan mikroskobunda x100 objektifte tarandığında siyah zemin üzerinde yuvarlak veya oval, boyayı almasına göre sarımsı elma yeşili veya turuncu renkte olan ookistler rahatlıkla fark edilebilirler. Ancak, ookistlerin çoğunun yeteri kadar boya almaması ve yapısının bozulmuş olması gibi durumlar ortaya çıkabilir (Mtombo vd., 1992). Floresan boyama yöntemi, hızlı, etkili ve diğer boyama yöntemlerine göre daha kullanışlı bir yöntemdir ancak bütün boyama tekniklerinin de olduğu gibi bu teknikte mükemmel değildir (Starling ve Arrowood, 1993).

2.6.2. Serolojik yöntemler

Serolojik yöntemler çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesine olanak sağlamaktadır. *Cryptosporidium* türlerinin dışkıda immunolojik olarak araştırılmasında Direkt İmmüno Floresan Tekniği (DFA), İndirekt Floresan Antikor Testi (IFA), Enzime Bağlı İmmüno sorbent Deney (ELISA) yöntemlerinden ve hızlı tanı kitlerinden yararlanılmaktadır.

Mikroorganizmanın yüzeyindeki antijenlerin immunolojik olarak belirlenmesinde kullanılan monoklonal antikor temeline dayanan DFA yöntemi günümüzde cryptosporidiosis tanısında referans test olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem ile incelenecek örnekteki antijenler lam yüzeyine yayılarak fikse edilir ve antijene özel işaretli antikorlar eklenir. Bu sayede işaretli özel antikorların oluşumuna neden olan antijenler belirlenir (Özcel ve Altıntaş 1997).

Antikor veya antijen taramasında kullanılan serolojik testlerden biride ELISA' dır. ELISA bir hemaglutinasyon plağı çukurunun içinde oluşturulan antijen antikor karışımının üzerine, enzim ile işaretlenmiş anti insan IgG, IgM ve diğer antikorların ilve edilmesi ve son olarak substratın eklenmesi ile pozitif örneklerde renk değişiminin gözlemlenmesi temeline dayanan ve paraziter hastalıkların teşhisinde güvenilir sonuç veren bir yöntemdir (Kehl vd., 1995). Bu yöntemin Kompetitif ve nonkompetitif ELISA, İndirek ELISA, Sandwich ELISA, Makro ve mikro ELISA, Avidin ve biyotin ekli ELISA gibi çeşitleride bulunmaktadır. Bu testlerin çapraz reaksiyon göstererek yalancı pozitif sonuçlar vermesi en büyük dezavantajıdır (Deveci, 2014).

IFA tekniği ise ookist yapısında bulunan antijenik yapılara floresan boya ile işaretli monoklonal antikorların bağlanması prensibi esasına dayanır ve aside dirençli boyama tekniklerine göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Carey ve ark 2004).

Bu tekniklerin yansıra 15 dakikada değerlendirilebilen hızlı tanı testleri de mevcuttur. Bu testlerin en önemli avantajı çabuk ve kolay uygulanmaları ile çok kısa sürede sonuç verebilmeleridir. Hızlı tanı testleri uygulanırken herhangi bir araca ya

da ekipmana ihtiyaç yoktur ve oda sıcaklığında, 1,5-2 yıl kadar saklanabilirler (Garcia vd., 2000).

2.6.3. Histopatolojik inceleme

Histopatolojik inceleme yöntemi özellikle 1980 öncesinde *Cryptosporidium* için kullanılan tek tanı yöntemidir. Alınan biyopsi örneğinde mikrovillusların kenarında ookistlerin aranması şeklinde uygulanmaktadır. Bu yöntemde hemotoksilen ve eozin gibi boyalarla boyanarak çeşitli gelişim dönemlerindeki *Cryptosporidium*' ların teşhisi yapılabilse de, yöntem tür identifikasyonu için yeterli olmamıştır. Bunun yanında hem invaziv girişim gerektirmesi hem de alınan parça için hızlı fiksasyona ihtiyaç duyulması, pahalı olması ve yöntem için fazla zamana ihtiyaç duyulması gibi nedenlerden dolayı günümüzde pek kullanılmamaktadır (Fayer ve Ungar, 1986; Casemore, 1991).

2.6.4. Kültür yöntemleri

Canlılığının belirlenmesi amacıyla *Cryptosporidium*' un konak hücredeki gelişim evreleri ilk olarak 2004 yılında tanımlanmıştır. Bu da *Cryptosporidium* çalışmaları açısından oldukça önemli bir adım olmuştur. Hücre kültürleri incelendiğinde *Cryptosporidium*' un tüm gelişim evrelerini görmek mümkündür, fakat çok küçük boyutlarda olduğu için yapısının tanımlanması oldukça güçtür (Boxell, 2008).

Hücre kültürleri etkene karşı ilaç denemelerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak etkenin gerek ekskistasyonu, gerek üreme yetisi ve ilaç duyarlılığı inokulum hazırlama tekniğine, inkübasyon süresi ve şartlarına, etkenin orijinine ve benzer bir takım faktörlere bağımlılık gösterir (Gasser ve O'Danoghue, 1999).

Çalışmalarda kullanılacak en uygun kültürün HCT-8 oluşu belirtilmiştir (Carey vd., 2004). Hücre kültürünün en büyük dezavantajı, henüz devamlılığı sağlanabilen bir kültürün ortaya konamamış olması ve doğal etkenin 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 oluştuğu bildirilsede ookistin 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).

2.6.5. Moleküler yöntemler

Günümüzde etkenin araştırılmasında ve genetik özelliklerinin belirlenmesinde Polymerase Chain Reaction (PCR) yöntemi başta olmak üzere birçok moleküler metod kullanılmaktadır (Oktun ve Yüce, 1995; Mülazımoğlu, 1993). Bunlar Plasmid DNA analizi, Genomik DNA restriksiyon analizi, Prob hibridizasyon teknikleri, Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), Gen sekans analizleri, PCR' a dayalı tiplendirmeler (PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-AFLP gibi teknikler) ve Ribotiplendirme olarak sıralanabilir.

PCR yönteminin kullanılması, su kaynaklarında bulunan *Cryptosporidium* türlerinin tespit edilmesinde avantaj sağlamaktadır (Saygı, 1998). Parazit DNA' sının saptanmasına dayanan bu yöntem ile numunede bulunan bir ookist bile saptanabildiği için mikroskopik incelemelere göre çok daha hassas ve kesin sonuçlar vermektedir. PCR tekniği bu nedenle kötü koşullarda muhafaza edilmiş, donmuş veya içerisinde çok az ookist bulunan numunelerin tanısında dahi kolaylıkla kullanılabilen en uygun yöntemler arasındadır (Leng vd., 1996; Özlem vd., 1997; Morgan ve Thomson, 1998; Jenkins vd., 2000; Sears ve Kirckpatrick, 2001). Oldukça hızlı, yüksek düzeyde duyarlılık gösteren ve hassas sonuçlar veren bir test olmasına rağmen bu yöntemin kullanımını sınırlayan pek çok faktörden bahsedilebilmektedir. Rutin çalışmalarda yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyonu, incelenecek numunede bulunabilecek safra tuzları, bilirubin, kompleks polisakkaritler ve bazı diğer komponentler PCR için inhibitör özellik göstermektedirler. Bu nedenle dışkı ve su kökenli çalışmalarda PCR tekniğini verimli bir şekilde kullanabilmek için kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması ve numuneden ookistlerin titizlikle izole edilmesi gerekmektedir (Fayer vd., 2000). Aynı zamanda testin güvenilirliği açısından, uygun bir ekstraksiyon yönteminin ve en uygun primerlerin seçilip kullanılması da çalışmanın hassasiyeti için oldukça önemli bir basamaktır. (Xiao vd., 2000; McOrist vd., 2002; Carey vd., 2004).

Son zamanlarda giderek önemini artıran ve yeni bir metot olan İlmiğe dayalı izotermal çoğaltma (LAMP) tekniği de *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik Notomi ve arkadaşları tarafından 2000 yılında geliştirilmiştir. LAMP tekniğinin başarılı sonuçlar vermesi sayesinde, bu tekniğin cryptosporidiosis (Karaniş vd, 2007; Bakheit vd., 2008), toxoplasmosis (Sotiriadou ve Karaniş, 2008) ve giardiosis (Plutzer ve Karaniş, 2009) gibi protozoon hastalıklarının teşhisi için de uygun olabileceği bildirilmiştir

Bu teknikte kullanılan primerler çalışılacak protozoonun hedef gen bölgesine göre tasarlanır. LAMP yönteminde hedef DNA nın 8 farklı noktasını tanıyan 6 adet primer kullanılmaktadır. Bu primerler dış forward primer (F3), dış revers primer (B3), İç forward primer (FIP)(3' ucunda F2 ve 5' ucunda F1c bölgelerinden oluşmaktadır); İç revers primer (BIP) (3' ucunda B2 ve 5' ucunda B1c bölgelerinden oluşmaktadır) olarak isimlendirilmektedir. LF ve LB primerleri ile de yöntemin etkinliği artırılabilir ve aynı zamanda süresi kısaltılabilmektedir (Nagamine vd., 2002).

Reaksiyonun izotermal şartlarda gerçekleşmesi nedeni ile termal döngü cihazı gibi özel ve pahalı aletler gerektirmemesi, su banyosu veya ısı bloğu ile izotermal amplifikasyon gerçekleştirilebildiğinden saha koşullarında kolaylıkla uygulanabilmesi (Liu vd., 2009), hedef DNA' daki 8 bölgeyi tanıyan 6 primer kullanıldığı için reaksiyonun spesifitesinin yüksek olması, ürünün tüpü açmadan gözle belirlenebilmesi nedeni ile PCR' daki en önemli kontaminasyon kaynaklarından birisi olan PCR sonrası görüntüleme basamağını uygulamaya gerek kalmayarak kontaminasyon riskinin azalması (Parida vd., 2008) , magnezyum pirofosfat iyonlarının çökmesi sonucu oluşan bulanıklığın gerçek zamanlı takip edilerek oluşan ürünün miktarının belirlenebilmesi (Mori vd., 2004) yöntemin avantajlarındandır.

LAMP için hedef bölgede 8 spesifik bölge gerektiğinden primer dizaynının PCR' dan daha zor olması, reaksiyonun belirleme limitinin düşük olmasından dolayı örneğin ve reaksiyonun hazırlığı aşamalarında kontaminasyona duyarlı olması, reaksiyonda internal amplifikasyon kontrolü kullanılmadığından negatif sonuçların, reaksiyon inhibisyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenememesi, PCR

reaksiyonu ile aynı tüpte birden fazla hedef bölgenin belirlenmesine olanak veren multipleks format kullanılarak amplifiye edilen bölge belirlenebilirken, LAMP reaksiyonu için bu formatın uygun olmaması, birden fazla hedef bölge için tasarlanan primerlerin aynı reaksiyonda kullanılabilmesine rağmen (Fukuda vd., 2006), hangi bölgenin amplifiye edildiğinin belirlenememesi yöntemin dezavantajlarıdır.

2.7. Sularda *Cryptosporidium* Aranması ile İlgili Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Mayer ve Palmer atık sularda yaptıkları çalışmada, *Giardia* ve *Cryptosporidium* parazitlerinin varlığını belirlemek amacıyla IFA ve PCR metodlarını karşılaştırmalı olarak uygulamışlardır. Elde edilen bilgilere göre *Giardia* için IFA ve PCR yöntemleri % 100 uyumlu olarak tespit edilirken; *Cryptosporidium* IFA tekniği ile PCR arasındaki uyum % 63,7 olarak bildirilmiştir (Mayer ve Palmer, 1996).

İsrail’de Zuckerman ve arkadaşları 1997 yılında 9 ay boyunca değişik çevresel kaynaklardan *Cryptosporidium*’ ların varlığını araştırmış; başlıca içme suyu kaynağı olan Kineret Gölü’ den alınan örneklerin % 66,6’ sında ve ayrıca bir filtrasyon tesisine giren içme suyuna ait 35 örnekten 23’ ünde *Cryptosporidium*’ ları saptamışlardır. Araştırmacılar içme suyu kaynaklarının kontaminasyonuna kanalizasyon sisteminin ve sığır dışıklarının neden olabileceğini bildirmişlerdir (Zuckerman vd., 1997).

Yine Amerika’ da, içme sularının geleneksel filtrasyon teknikleri ile işlendiği fabrikalarda yapılan çalışmalarda, işlenmiş ve tüketilmeye hazır hale getirilen suların % 3,8-33,3’ ünün her 100 litresinde 0,1-48 ookist bulunduğu tespit edilmiştir (Fayer, 2000).

Robertson ve arkadaşları 2001 yılında Norveç’ te yaptıkları çalışmada, 305 atık su örneğinden 55’ inde (% 13,5) *Cryptosporidium*, 10’ unda (% 2,5) ise hem *Cryptosporidium* ookistlerinin hem de *Giardia* kistlerinin olduğu belirlenmiştir (Robertson vd., 2001).

Kuzey İrlanda'da 1996-1999 yılları arasında, içme suyu kaynaklarında konvansiyonel ve moleküler tespit yöntemleri karşılaştırmalı olarak kullanılarak *Cryptosporidium* oostlarının insidansı ve genotipleri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada toplanan 474 su örneğinin 380 tanesi IFA tekniğiyle, 94 tanesi İmmunomagnetik separasyon (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 PCR tekniğiyle incelenmiş ve bunların 11 'i (% 5,1) pozitif bulunmuştur (Lowery vd., 2001).

Ryan ve arkadaşlarının 2005 yılında Sydney Waragamba' daki su toplama havzasında *Cryptosporidium* spp' nin kaynaklarını araştırmak amacıyla topladıkları gaita ve su numunelerini IMS ve IFA yöntemleriyle incelemişlerdir. Daha sonra oost içerdiği tespit edilen örneklere 18S rRNA ve HSP-70 genine ait gen bölgelerinde filogenetik analizler yapmışlardır. Analiz sonucunda *C. parvum*, *C. suis*, domuz genotipi-2, geyik genotipi ve keçi genotiplerini içeren 5 farklı tür bulunduğunu tespit etmişlerdir (Ryan vd., 2005).

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

Rusya ve Bulgaristan' da 2006 yılında Karanis ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise farklı kaynaklardan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* ve *Giardia* parazitlerinin varlığını belirlemek amacıyla toplam 166 su örneği incelenmiştir. Toplanan su örneklerine filtrasyon, flokülasyon ve sukroz gradiyent saflaştırma yöntemleri uygulanarak kist ve ookistler IFA yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada incelenen su örneklerinin % 18,1' inde *Cryptosporidium* ookisti ve % 9,6' sında da *Giardia* kistleri tespit edilmiştir. Sonuçta her iki parazit de içme ve kuyu suyunda, nehirde alınan çevresel sularda ve lağım sularında bulunmuş olup, şişelenmiş sularda da *Giardia* kistlerinin varlığına rastlanmıştır (Karanis vd., 2006).

2008 yılında Lobo ve arkadaşları 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 Amerika Birleşik Devletleri Koruma Ajansı (USEPA) 1623 protokolüne göre IMS, IFA ve PCR temelli yöntemler ile incelenmiştir. Sonuç olarak IFA yöntemiyle incelenen 175 örneğin 81'inde *Cryptosporidium* pozitifken, 67'inde *Giardia* pozitif olarak tespit edilmiştir. PCR 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 (Lobo vd., 2008)

Macaristan' da yapılan çalışmada farklı su kaynaklarından ve çeşitli coğrafi bölgelerden toplanan 36 örnekte *Giardia* ve *Cryptosporidium* türlerinin prevalansı IFT ve PCR teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. Örnekler içme suyu arıtma tesisleri, kanalizasyon arıtma tesislerinden ve Balaton Gölü rekreasyon alanından toplanmıştır. Sonuç olarak IFT ile 36 örnekte 24' ü (% 67) *Giardia* pozitif ve 15' i (% 42) *Cryptosporidium* pozitif bulunurken, PCR ile de 36 örneğin 13' ünün (% 36) *Giardia* ve 10' unun (% 28) *Cryptosporidium* pozitif olduğu bildirilmiştir (Plutzer vd., 2008).

İspanya’da 2007 yılında ilkbahar-yaz-sonbahar-kış dönemlerinde Tambre Irmağı üzerindeki eğlence amaçlı kullanılan 5 farklı bölgedeki çeşitli kaynaklardan, orta büyüklükte bir ırmaktan ve 3 önemli ırmak ağzından toplamda 22 su örneği 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* (18S rRNA gen bölgesi) ve *Giardia* (β -giardin gen bölgesi) parazitleri varlığı açısından PCR tekniğiyle incelenmiştir. Sonuç olarak Tambre Irmağı havzasının *Cryptosporidium* ve *Giardia intestinalis* ile yüksek miktarda kontamine olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çiftlikteki hayvanlarda *Cryptosporidium* türleri ve *Giardia intestinalis*’ in ortalama değerlerine göre bahar mevsimi verileri kış döneminden farklı bulunmuş olup, su örneklerindeki ookist miktarı ise sonbahar- kış aylarına göre bahar-yaz aylarında çok daha yüksek çıkmıştır (Castro-Hermida vd., 2009).

Paris ve çevresinde yapılan çalışmada içme suyu kaynağı olarak kullanılmakta olan Seine ve Marne Irmağı’ nın suları protozoonların kontaminasyonu açısından değerlendirilmiştir. 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* konsantrasyonuyla ilişkiliyken, enterokok miktarının *Cryptosporidium* miktarıyla ilişkili olmadığı saptanmış olup, diğer fekal bakterilerin incelenen protozoonlarla ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Mons vd., 2009).

Plutzer ve arkadaşları 2010 yılında içme sularını 2 μ m çaplı ARAD mikrofiltreden geçirerek filtrenin üzerinde kalan örnekleri *Cryptosporidium* ve *Giardia intestinalis* parazitleri yönünden LAMP tekniğiyle incelemiştir. Çalışma sonucunda ARAD filtreleme ve LAMP tekniğinin birlikte kullanımının parazitler etkenlerin saptanmasında daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Plutzer vd., 2010).

İspanya' nın Galicia bölgesinde 50 atık su arıtma tesisinde, 52 içme suyu arıtma tesisinde ve 28 rekreasyonel nehir alanında yapılan çalışmada *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistlerinin litre başına ortalama konsantrasyonları Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) yöntemiyle belirlenmiştir. Alınan 232 su numunesi Filita-Max filtreleri kullanılarak filtre edilmiş ve daha sonra ookistler konsantre edilerek IFAT tekniğiyle incelenmiştir. Rekreasyonel alanlar içinde, *Cryptosporidium*' un 16 (% 57,1; litre başına 1-60 ookist) ve *Giardia*' nın bulaşıcı formu 17 (% 60,7; litre başına 1-160 kist) örnekte saptanmıştır. Su arıtma tesislerine doğru akan sular içinde, 21 içme suyu arıtma tesisinde ookistlere (% 40,4; litre başına 1-13 ookist) ve 22 içme suyu arıtma tesisinde kistlere (% 42,3; litre başına 1-7 kist) rastlanmıştır. Arıtma tesislerinden çıkan atık su içinde, *Cryptosporidium* ookistleri 17 (% 32,7; litre başına 1- 4 ookist) ve *Giardia* kistleri 19 (% 36,5; litre başına 1-5 kist) olarak belirtilmiştir. *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 kist) örneğin içinde saptanmıştır (Castro-Hermida vd., 2010).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, su kökenli *Cryptosporidium* ve *Giardia* parazitlerini tespit etmek amacıyla LAMP, PCR ve IFA metotları kullanılmıştır. Çalışmada İran'ın kuzeyindeki iki nehirden 10 L olacak şekilde yüzey suyu örnekleri alınmıştır. Toplam 40 örnek IFA, PCR 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, PCR tekniğiyle de pozitif sonuç vermiştir. Sonuç olarak LAMP yönteminin diğer yöntemlere göre daha hassas çalıştığı bildirilmiştir (Mahmoudi vd., 2013)

Daniels ve arkadaşları 2015 yılında Hindistanın kırsal kesimi olan Odisha sahil bölgesinde hasta insanlar, evcil hayvanlar ve su kaynaklarında *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistlerinin konsantrasyon/dökülme oranı ile çevresel yükünü ortaya koymaya çalışmışlardır. Çalışma için ishali hastalardan 85 dışkı örneği 7 evcil hayvan türünden 111 dışkı örneği ve 60 köyden 207 su kuyusu örneği , 94 göl

suyu örneği toplamışlardır. Örnekler IMS-DFA yöntemiyle incelenmiştir. Sonuç olarak diyareli hastaların % 12' sinde ookist ve kistlere; hayvan türlerinde % 0- 35 oranında ookiste % 0- 67 oranında kiste, göllerden alınan örneklerin % 37-74 oranında, kuyulardan alınan örneklerin % 10-14 oranında kontamine olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar çalışma sonucuna göre ishallerde halk sağlığı endişesinin ele alınması ve salgınlarda su ve hayvanların rolünün araştırılmasını önermişlerdir (Daniels vd., 2015).

2.8. Sularda *Cryptosporidium* Aranması ile İlgili Türkiyede Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde içme suyu kaynaklarında standartlara uygun olarak yapılmış ilk parazitolojik çalışma 1997 ve 1999 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. *Giardia* ve *Cryptosporidium* için Kağıthane, Büyükçekmece, Ömerli, Elmalı barajlarına ait 40 ham su örneği (her örnek için 480 litre su) IFA tekniği ile incelenmiştir. İncelenen ham su örneklerinin hiçbirinde *Giardia* kisti ve *Cryptosporidium* ookisti tespit edilmemiştir (Köksal, 2002).

Bakır ve arkadaşları 2003 yılında Ankara' da belediyeye ait sulardan 43, kuyulardan 34, Ankara Nehri'nden 6 ve iki arıtılmamış barajdan 2 olmak üzere toplam 85 örnekte *C. parvum*, *G. lamblia* ve *E. histolytica* gibi su kaynaklı parazitlerin varlığını araştırmışlardır. Araştırmada mikroskopi, IFA ve PCR teknikleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda toplam 6 nehir suyu örneğinden 1 tanesinin (% 16,6) *Cryptosporidium* ookistleri açısından pozitif olduğu bildirilmiştir (Bakır vd., 2003)

Ankarada yapılan diğer bir çalışmada ise arıtım işlemi uygulanmayan kuyu sularında, Ankara Su ve Kanalizasyon İdaresi (ASKİ) arıtım sistemine dahil olan su kaynaklarının bulunduğu hat üzerinde, hayvancılık yapılan bölgelerdeki yüzeysel su kaynakları ile yine bu kaynaklara boşaltılan mezbaha arıtım sisteminden çıkan su örnekleri mikroskobik yöntemlerle incelenerek bu bölgede *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı ve mevsimsel dağılımı araştırılmıştır. Çalışma sonunda hayvancılıkla uğraşılan bölgelerde bulunan su kaynaklarında ve mezbaha arıtım

suları ile ASKİ arıtım öncesi işlem görmemiş su örneklerinde *Cryptosporidium* ookisti saptanmıştır (Kurşun, 2003).

Isparta il sınırları içindeki göl, dere ve çeşme olmak üzere çeşitli su kaynaklarından toplanan örneklerde Modifiye Zielh-Neelsen (MZN) boyama yöntemi ile *C. parvum*, direkt mikroskopi yöntemi ile de *G. intestinalis* aranmıştır. *C. parvum*' un varlığının doğrulanması için IFA tekniği kullanılmıştır. Toplanan 40 su örneğinin 13' ünde (% 32,5) direkt mikroskopi ve MZN boyama sonrasında *C. parvum* olabileceği tahmin edilmiştir. Ancak IFA tekniğinin uygulanması sonucunda 13 şüpheli örneğin 6' sında (% 15) *C. parvum* varlığı kesin olarak doğrulanmıştır. Direkt mikroskopi sonrası 8 örnekte (% 20) *G. intestinalis* kistlerine rastlanmıştır (Aysal, 2004).

Mersin ilinde yapılan bir çalışmada ise, 44 içme suyu, 2 kullanma suyu, 19 atık su ve 35 deniz suyu *Cryptosporidium spp.* ookistlerinin varlığını açısından 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) *Cryptosporidium* ookistine rastlanmıştır (Çeber vd., 2005).

Yine Mersin' de il merkezi ve semtlerinde bulunan dört ilköğretim okulunda öğrenim gören çocuklarda yapılan başka bir çalışmada ise, 8-12 yaş gurubu çocuklardan alınan toplam 72 dışkı örneği Modifiye Kinyoun'un Aside Dirençli boyama yöntemi (MKSA) ve Auramin-O boyama yöntemi ile boyanarak *Cryptosporidium* ookisleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, suları kirli olan okuldaki 4 (% 5,5) öğrencide enfeksiyona rastlanırken, suları temiz olan okullardaki çocuklarda enfeksiyon belirlenmemiştir (Otağ vd., 2007).

Kolören ve Kaya 2010 yılında Ordu ilindeki çevresel sularda *Giardia* ve *Cryptosporidium* parazitlerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla MAF ve native-lugol yöntemlerini birlikte kullanılmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda *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 edilmiştir. Yapılan çalışma

sonucunda nüfusu kalabalık yerleşim yerlerinde ookist sayısının fazla olabileceği kanısına varılmıştır (Kolören ve Kaya, 2010).

Yine Kolören ve arkadaşlarının Ordu bölgesinde 2011 yılında yapmış oldukları bit diğer çalışmada *Cryptosporidium* spp.' nin varlığını tespit etmek amacıyla, farklı su kaynaklarından alınan toplam 70 su örneğini IFT, LAMP ve Nested PCR yöntemlerini kıyaslayarak kullanmışlardır. 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* ookisti ile kontamine edilmiştir. Bu örneklerin hepsi LAMP tekniğinde pozitif bulunurken, Nested PCR yöntemiyle sadece 7 örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Buna dayanarak, LAMP yönteminin Nested PCR ve IFT yöntemine göre daha hassas sonuçlar verebildiği gösterilmiştir (Kolören vd., 2011)

Van ilinde, 440 farklı istasyondan 5 L' lik su örneği toplanmış ve MAF boyama yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmada toplanan 440 su numunesinin % 1,13' ünde *Cryptosporidium* spp. ookistleri görülmüştür. İçme suyu olarak kullanılan 191 yüzeysel kaynak suyunun % 1,57' sinde, şehir merkezi ve ilçelerden alınan 241 adet 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 (Çiçek vd., 2011).

2011 yılında Özçelik ve arkadaşları Sivas'a bağlı 23 ilçeden ve 69 köyden toplanan toplamda 92 su örneğinde *Cryptosporidium* ve *Giardia* varlığını Asit-fast boyama, ELISA ve DFA yöntemleri ile araştırmışlardır. Örneklerden 83 tanesi musluk suyu olup geri kalan 9' u kaynak, kaplıca ve dere sularından oluşmaktadır. Çalışma sonucunda, ELISA tekniği ile 18 (% 19,6) su örneğinde, DFA tekniği ile ise 4 (% 4,35) su örneğinde *Cryptosporidium* saptanırken; toplam 2 (% 2,2) su örneğinde ise *Giardia* belirlenmiştir. ELISA ile 83 musluk suyundan 14' ü *Cryptosporidium* açısından pozitif saptanırken 9 kaynak suyundan 4' ü pozitif saptanmıştır. DFA yöntemi ile 83 musluk 4' ü pozitif sonuç verirken 9 kaynak suyundan pozitif sonuç alınamamıştır. Direkt ve asit-fast boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlardan ise

yapılan mikroskopik incelemelerde tipik bir parazit yumurta ya da kistlerine rastlanamamıştır (Özçelik vd., 2011).

Diğer bir çalışmada ise Mersin iline ait farklı su kaynaklarında *Cryptosporidium* oocistlerinin varlığı belirlenmiş ve aynı zamanda tiplendirilmesi de yapılmıştır. 2007 Mart ve 2009 Mayıs tarihleri arasında Mersin şehir merkezi ve ilçelerine ait 135 farklı su kaynağından toplanan örnekler Modifiye Kinyoun'un aside dirençli boyama yöntemi (MKSA) ve PCR ile saptanmış aynı zamanda PCR-RFLP yöntemiyle de tiplendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda MKSA yöntemiyle 3, PCR ile de 7 örnekte *Cryptosporidium*' un varlığı tespit edilmiş ve tüm suşlar *C. parvum* olarak belirlenmiştir. MKSA boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* oocistlerinin belirlendiği 3 örnek PCR ile de pozitif olarak bulunurken buna karşın PCR-RFLP tekniği ile *C. parvum* olarak tiplendirilen dört örnek MKSA ile negatif sonuç vermiştir. Çalışmada, PCR-RFLP yönteminin MKSA yöntemine göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. (Aslan vd., 2012).

Yine, Ordu ili Melet Irmağı'nın farklı noktalarından alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin varlığını göstermek amacıyla LAMP metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, LAMP yöntemiyle Melet Irmağı' nın tüm noktaları pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu duruma buzağılar tarafından Melet Irmağı' nın içme suyu olarak kullanılması ve buzağuların ırmak içine dışkılamalarının neden olabileceği düşünülmektedir (Kolören ve Demirel 2013).

Kütahya'da yapılan bir çalışmada ise 30 ayrı noktadan su numuneleri toplanmış ve toplanan numuneler Kinyoun karbol fuksin boyası ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. İnceleme sonucunda su örneklerinin % 3,3' ünde (1/30) oocist tespit edilmiştir (Akdemir, 2013).

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

Samsun ve Giresun illerinde yapılan diğer bir bir çalışmada ise toplam 45 istasyondan 420 çevresel ve 120 içme suyu rneğinde *Cryptosporidium* parazitinin varlığı mikroskopik ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Mikroskopik araştırma kapsamında, Giresun ilinden alınan su rnekleri 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' nde (% 89,16) 1-85 *Cryptosporidium* ookisti/L pozitif bulunmuştur. Moleküler alışmalar kapsamında ise Giresun il ve ilçelerinden alınan içme suyu ve çevresel sular da dahil olmak üzere toplam 240 su rneğinde LAMP yöntemiyle % 30,8, Nested PCR ile % 29,1 oranında *Cryptosporidium*' un varlığı tespit edilmiştir. Samsun il merkezi ve ilçelerinde belirlenen istasyonlarda aynı zaman periyodunda alınan 240 çevresel su rneği ile içme suyu ve çevresel sular dahil toplam 300 su rneğinde LAMP yöntemiyle %33,6, Nested PCR ile % 30,6 oranında *Cryptosporidium*' un varlığı saptanmıştır (Ayaz 2015).

2015 yılında Kaçmaz' ın yaptığı çalışmada Diyarbakır il sınırında (merkez, ilçe ve köyler) zellikle hayvancılığın yapıldığı bölgelerdeki su kaynaklarından toplanan örneklerde *Cryptosporidium* ve *Giardia* türleri aranmıştır. Toplam 34 su örneğinin 22 (% 64,71) tanesi kuyu suyu, 3 (% 8,82) tanesi dere suyu, 5 (% 14,71) tanesi çay suyu olarak toplanmıştır. *Giardia* için Trikrom, *Cryptosporidium* için Modifiye Asit-Fast boyama tekniği kullanılmıştır. Kesin tanı için de IFAT testi kullanılmıştır. Test sonucunda 2 (% 5,9) dere suyu rneğinde *Cryptosporidium*' a rastlanmıştır (Kaçmaz, 2015)

Erzurum' da yapılan çalışmada MAF tekniği kullanılarak toplanan 120 su örneğinin 18' inde (% 15,0) *Cryptosporidium* ookisti tespit edilmiştir. Bu pozitif örneklerin 6' sı şehir suyu sistemi, 12' si eşme ve kuyulardan elde edilmiştir. Mevsimsel olarak pozitif örneklerin dağılımı, Mayıs ayında 7 (% 17,5) Nisan ayında 9 (% 22,5), Temmuz ayında ise 2 (% 5,0) olarak belirlenmiş ve Nisan-Mayıs aylarında *Cryptosporidium* oosistlerine daha yüksek oranda rastlanılmıştır (Yılmaz vd, 2016).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

PCR cihazı	:	Bio-Rad C1000 Touch
Santirfüj	:	Hanil Smart R17
Mikrosantirfüj	:	Smart 15
Elektroforez tankı	:	Termo Owl easycast B2-BP
Vorteks	:	Heidolph Reaxtop
Hassas Terazi	:	Shimadzu ATX 120
Otomatik pipet	:	Epperndorf Research Plus
Magnetik Karıştırıcı	:	Heidolph MR Hei-Standart
Buzdolabı	:	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	:	Arçelik
Ultra-Low dondurucu (-80 °C)	:	Haier, New Brunswick
Mikrodalga fırın	:	Arzum
Jel Görüntüleme cihazı	:	Vilber Lourmat Quantum ST5
Üçlü çelik vakum	:	Sartorius
Vakum pompası	:	Sartorius

3.2. Örneklerin Toplanması

Su numuneleri 140 farklı noktadan 5 litre olacak şekilde toplanmıştır. Toplanan örnekler en kısa sürede laboratuara getirilerek filtrasyon yapılmıştır.

3.3. Filtrasyon

Laboratuvara getirilen su örnekleri numuneler membran filtrasyon yöntemi ile 0,45µm por çaplı selülöz membran filtreden geçirilerek süzölmüştür. Filtre temiz bir tüpe alınmış aynı su örneğinin 20 ml' si içine aktarılarak vortekslenmiştir. Böylece filtre üzerindeki partikülat filtreden uzaklaştırılmıştır. Bu numune 2100 rpm de 10 dakika santirfüj edilmiştir. Üstte kalan kısım atılarak son hacim 10 ml olacak şekilde üzeri distile su ile tamamlanmıştır.

3.4. Örneklerin Saflaştırılması (Sükroz Gradient Yöntemi)

0.1 M PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH: 7,2) ve sükroz çözeltisi (500 g sükroz, 6,5 g fenol, 320 ml saf su) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler kullanılarak sükroz/PBS oranı 1/2 olan A solüsyonu ve sükroz/PBS oranı 1/4 olan B solüsyonu hazırlanmıştır. A ve B çözeltilerine maximum 4'er damla % 1' lik tween 80 damlatılmıştır. 50 ml' lik steril falkon tüpünün içine önce 15 ml A solüsyonu konulup üzerine de 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.

3.5. DNA İzolasyonu

Sükroz gradient yöntemiyle saflaştırılan örneklerden DNA izolasyonu yapabilmek için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) protokolü Karanis vd.,' ne (2006) göre modifiye edilerek uygulanmıştır. İlk olarak örneklerin üzerine lizis tamponu eklenerek dondurup-çözme işlemi peş peşe 15 döngü olacak şekilde yapılmıştır. Dondurma işlemi örnekler -80 °C' de 4 dakika, çözme işlemi ise kaynama sıcaklığında olan su banyosunda 1 dk bekletilerek yapılmıştır. Bu işlem yardımıyla ookist duvarlarının tamamen kırılması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra kit protokolü sırayla takip edilmiştir. Son olarak DNA 50 µl TE tampon içinde toplanmıştır ve ardından PCR ve LAMP tekniklerinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.6. PCR Tekniği

PCR reaksiyon karışımı 25 µl son hacimde hazırlanmıştır. PCR için Hot Start Taq DNA Polimeraz kiti (Qiagen) (10x PCR tamponu, 5x Q solüsyonu, 25mM MgCl₂, 5U hot start taq DNA polimeraz), 25mM dNTP mix, 10 pmol SAM-1 genine ait F3 ve B3 primerleri ve 2 µl örnek kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri Tablo 3.1’ de verilmiştir. Reaksiyon karışımı vortekslenip PCR cihazında inkübasyona bırakılmıştır. Uygulanan PCR protokolü Tablo 3.2’ de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri

Primer tipi	Sekans (5’-3’)	Uzunluk	Hedef Bölge
F3	ATTTGATRGACAAAGAACTA G	22	S-adenosylmethionine Synthetase (SAM) geni
B3	CGATTGACTTTGCAACAAG	19	

Tablo 3.2. PCR reaksiyonu döngü şartları

İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Kapak ısısı	105 °C		
İlk denatürasyon	95°C	15 dakika	1
Denatürasyon	94°C	45 saniye	
Bağlanma	54°C	60 saniye	40
İlk uzama	72°C	1 dakika 15 saniye	
Final uzama	72°C	10 dakika	1

3.7. LAMP Tekniği

LAMP reaksiyonu için Optigene İzothermal Amplification Mix kullanılmıştır. 15 µl 1 X LAMP reaksiyon tamponu 5 µl primer karışımı [FIB, BIP (20 pmol), F3, B3 (5 pmol), LB, LF (10 pmol)], 5 µl örnek eklenerek reaksiyon karışımı 25 µl’ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı vortekslenip PCR cihazında 63°C’de 1 saat, 85°C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Her bir test için pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Oluşan ürünler ethidium bromidle boyanmış %1’ lik agaroz jelle

yüklenmiştir. Jel elektroforezde 100 V'da 60 dk yürütüldükten sonra UV altında bantlar görüntülenmiştir. *C. parvum* için kullanılan LAMP primerleri SAM-1 genine ait olup gen dizilimi Tablo 3. 3' de belirtilmiştir.

Tablo 3.3. LAMP reaksiyonu için kullanılan primer dizileri

Primer tipi	Sekans (5'-3')	Uzunluk	Hedef Bölge
F3	ATTTGATRGACAAAGAACTAG	22	S-adenosylmethionine Synthetase (SAM) geni
B3	CGATTGACTTTGCAACAAG	19	
FIP(F1c-F2)	TTGCGCCCTGTTAATCCAGCAT-TAATTAATCCATCTGGCAGRTTT	45	
BIP(B1-B2c)	TTGTAGATACATACGGAGGATGGG TCTACTTTAGTTGCATCTTTCC	46	
LF	CTGCTGGCCCMCCAATTG	18	
LB	CATGGRGGTGGTGCATTTAG	20	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Erzincan ilinde 2016 yılı Mart ve Ağustos ayları arasında, 6 ay boyunca 37' si merkez mahalle, köy ve beldelerinden, 30' u İliç ilçesine bağlı köylerden, 32' si Tercan ilçesine bağlı köylerden, 20' si Refahiye ilçesine bağlı köylerden, 18'i Kemaliye ilçesine bağlı köylerden ve 3' ü de Kemah ilçesine bağlı köylerden olmak üzere 140 içme ve kullanma suyu örneği toplanmıştır.

Çalışmada *C. parvum*, protozoonlar için en ideal tanımlama sistemi olan moleküler yöntemlerden LAMP ve PCR yöntemleriyle tanımlanmış ve bu iki yöntemin sonuçları kıyaslanmıştır. Aylara göre PCR ve LAMP analizi sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6' da verilmiştir. Ayrıca PCR jel görüntüleri Şekil 4.1' de, LAMP jel görüntüleri de Şekil 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Mart ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları

Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP	Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP
1 İzeetpaşa Mah.	-	-	13 Hürrempalangası Köyü	-	-
2 Karaağaç Mah.	-	-	14 Keklikkayası Mah.	-	-
3 Geçit Beldesi	-	-	15 Başpınar Köyü	-	-
4 İnönü Mah.	-	-	16 Kavakyolu Beldesi	-	-
5 Yavuz Selim Mah.	-	-	17 B.Çakırman Köyü	-	-
6 Mimar Sinan Mah.	-	-	18 Üzümlü Beldesi	-	-
7 Bahçeyazı Köyü	-	-	19 Çağlayan Beldesi	-	-
8 Yaylabaşı Beldesi	-	-	20 Derebik Köyü	-	-
9 Elmaköy Köyü	-	-	21 Mertekli Köyü	-	-
10 Yeşilçat Köyü-Merkez	+	+	22 Çiftlikköy köyü	-	-
11 Çatalarmut Bucağı	-	-	23 Kayacık Köyü	-	-
12 Ballı Köyü	-	-	24 Çörekli Köyü	-	-

Tablo 4.2. Nisan ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları

Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP	Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP
25 Koçyatağı Köyü	-	-	38 Yeşilyayla Köyü	-	-
26 Gümüştarla Köyü	-	-	39 Yukarıumutlu Köyü	-	-
27 Kayacık Köyü	-	-	40 Karapınar Köyü	-	-
28 Elmalı Köyü	-	-	41 Akçalı Köyü	-	-
29 Kuruçay Köyü	-	-	42 Kemaliye	-	-
30 Bağıştaş Köyü-İliç	+	+	43 Çakırtaş Köyü	-	-
31 Çayyaka Köyü	-	-	44 Aslanoba Köyü	-	-
32 Bozyayla Köyü	-	-	45 Buğdaypınar Köyü	-	-
33 Çöpler Köyü	-	-	46 Aksöğüt Köyü	-	-
34 Akyurt Köyü	-	-	47 Yayladamı Köyü	-	-
35 Sabırlı Köyü	-	-	48 Kutluca Köyü	-	-
36 Dostal Köyü	-	-	49 Yeşilyamaç Köyü	-	-
37 Adak Köyü	-	-			

Tablo 4.3. Mayıs ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları

	Numune Alınan	PCR	LAMP		Numune Alınan	PCR	LAMP
	Noktalar				Noktalar		
50	Yakaköy Köyü	-	-	63	Yeşilyayla Köyü	-	-
51	Başarı Köyü	-	-	64	Altınkaya Köyü	-	-
52	Avcı Köyü	-	-	65	Yazıören Köyü	-	-
53	Tuğlu Köyü	-	-	66	Söğütözü Köyü	-	-
54	Dolunay Köyü	-	-	67	Turgutlu Köyü	-	-
55	K.Armutlu Köyü	-	-	68	Yardere Köyü	-	-
56	Doruksaray Köyü	-	-	69	Ekmekli Köyü	-	-
57	Çilesiz Köyü	-	-	70	Yeniköy Köyü	-	-
58	Altıntaş Köyü (İliç)	-	-	71	Pekmezli Köyü	-	-
59	Çaylı Köyü	-	-	72	Atma Köyü(iliç)	-	-
60	Küçükağa Köyü- Tercan	+	+	73	Atma köyü -Kemah	-	+
61	Karakaya Köyü	-	-	74	Ortatepe Köyü- İliç	+	+
62	B.Armutlu Köyü	-	-	75	Beşsaray Köyü	-	-

Tablo 4.4. Haziran ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları

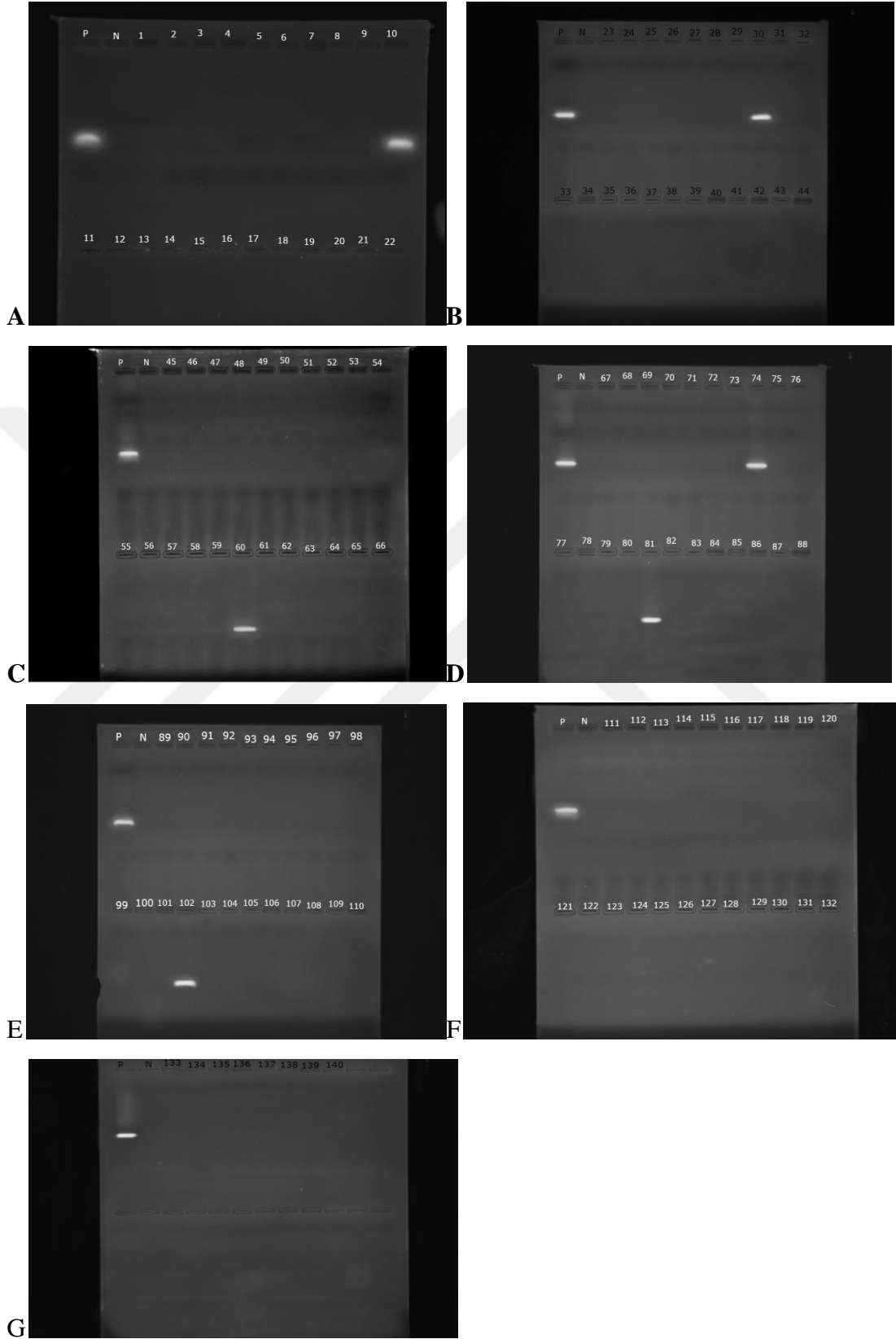
Numune Alınan	PCR	LAMP	Numune Alınan	PCR	LAMP		
Noktalar			Noktalar				
76	Çadırkaya Köyü	-	-	88	Elaldı Köyü	-	-
77	Ganiefendiçiftliği K.	-	-	89	Daritepe Köyü	-	-
78	Gedikdere Köyü	-	-	90	Müftüoğlu Köyü	-	-
79	Beşgöze Köyü	-	-	91	Yaylacık Köyü	-	-
80	Sağlıca K.-Tercan	-	+	92	Mustafabey Köyü	-	-
81	Esenevler K.-Tercan	+	+	93	Yaylayolu Köyü	-	-
82	Tepebaşı Köyü	-	-	94	Karacakışlak Köyü	-	-
83	Küllüce Köyü	-	-	95	Beykonak Köyü	-	-
84	Kalecik Köyü	-	-	96	Aktaş Köyü-Kemah	-	+
85	Gökpınar Köyü	-	-	97	Beşkaya Köyü	-	-
86	Başbudak Köyü	-	-	98	Yalıntaş Köyü	-	-
87	Fındıklı Köyü	-	-				

Tablo 4.5. Temmuz ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları

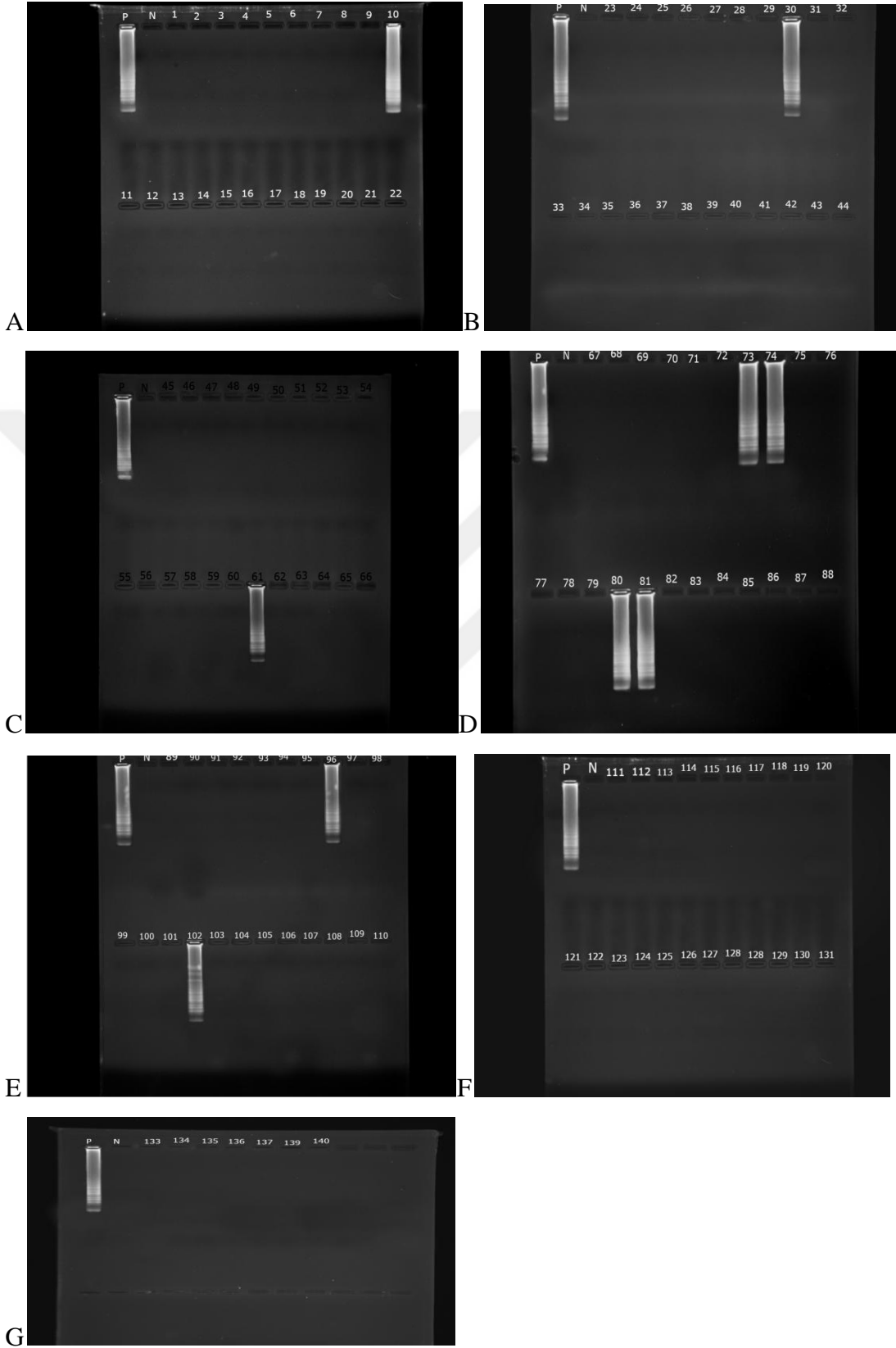
Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP	Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP
99 Sarıkaya Köyü	-	-	110 Yukarıyeniköy Köyü	-	-
100 Kuzuören Köyü	-	-	111 Kozluca Köyü	-	-
101 Dallica Köyü	-	-	112 Çatlı Köyü	-	-
102 Karacaören Köyü-Tercan	+	+	113 Üçören Köyü	-	-
103 Göktaş Köyü	-	-	114 Kozören Köyü	-	-
104 Çatak Köyü	-	-	115 Aşağısütlü Köyü	-	-
105 Kırantepe Köyü	-	-	116 Tabanlı Köyü	-	-
106 Karayaprak Köyü	-	-	117 Akçayazı Köyü	-	-
107 Kuzuluk Köyü	-	-	118 Bağcağız Köyü	-	-
108 Aşut Köyü	-	-	119 Kuranköy Köyü	-	-
109 Ören Köyü	-	-	120 Büyükgümüşlü K.	-	-

Tablo 4.6. Ağustos ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları

Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP	Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP
121 Sütlüce Köyü	-	-	131 Altköy Köyü	-	-
122 Yalınöz Köyü	-	-	132 Sütözü Köyü	-	-
123 Küçükgümüşlü K.	-	-	133 Tandırlı Köyü	-	-
124 Yılmaz Köyü	-	-	134 Topalhasan Köyü	-	-
125 Biçer Köyü	-	-	135 Gönye Köyü	-	-
126 Alapınar Köyü	-	-	136 İldere Köyü	-	-
127 Dolaylı Köyü	-	-	137 Cevizli Köyü	-	-
128 Damlaca Köyü	-	-	138 Baltaş köyü	-	-
129 Gökseki Köyü	-	-	139 Onurlu Köyü	-	-
130 Perçem Köyü	-	-	140 Ekinci Köyü	-	-



Şekil 4.1. PCR jel görüntüleri A:1-22 P pozitif, N negatif, B:23-44 ,C:45-66,D:67-88, E:89-110, F:111-132, G:133-140



Şekil 4.2. LAMP tekniği jel görüntüleri A:1-22 P pozitif, N negatif, B:23-44 ,C:45-66,D:67-88, E:89-110, F:111-132, G:133-140

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda PCR tekniği ile il merkezine bağlı Yeşilçat köyü, İliç ilçesine bağlı Bağıştaş ve Ortatepe köyleri, Tercan ilçesine bağlı Esenevler, Küçükağa ve Karacaören köylerinden alınan sular *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunurken, LAMP tekniği ile il merkezine bağlı Yeşilçat köyü, İliç ilçesine bağlı Bağıştaş ve Ortatepe köyleri, Kemah ilçesine bağlı Atma ve Aktaş köyleri, Tercan ilçesine bağlı Sağlıca, Esenevler, Küçükağa ve Karacaören köylerinden alınan sular *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunmuştur.

Su kaynaklarında *Cryptosporidium* ookisti varlığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, ülkelerin coğrafik yapısına, iklimine, bölgede bulunan hayvan popülasyonuna göre etkenin saptanma oranının yüzeysel su kaynaklarında % 4,4-100, içme sularında % 7,0-37,0 atık sularda ise % 25,5-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (Smith ve Rose, 1998).

Erzincan ilinine bağlı ilçe ve köylerde en önemli geçim kaynağı tarım ve hayvancılıktır. Özellikle çalışma sonucunda *Cryptosporidium* açısından en yüksek orana sahip olan Tercan ilçesinde geçim kaynağı büyükbaş hayvancılıktır. İşlem görmemiş atık sularda, filtrelenerek işlenen atık sularda, kanalizasyonda, yer altı sularında, yeryüzü sularında ve işlem görmüş içme suyunda ookistlerin tespit edilmesi; suların dışkı ile kirlendiğini göstermektedir (Fayer, 2000; Köktürk, 2002; Saygı, 1997). Bu nedenle kırsal kesimlerden alınan su örneklerinin pozitif olması, enfekte hayvan dışkılarının çevreye bırakılması ve tarımda kullanılan atık suların çevresel sular aracılığı ile su kaynaklarına ulaşması sonucu dışkı ile meydana gelen kirliliği akla getirmektedir.

Aylara göre değerlendirildiğinde ise Mart ayında alınan 24 numuneden 1' i, Nisan ayında toplanan 25 numuneden 1'i, Mayıs ayında alınan 26 numuneden 3'ü, Haziran ayında alınan 23 numuneden 3' ü, Temmuz ayında alınan 22 numuneden 1'i *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunurken ve Ağustos ayında alınan 20 numunede *Cryptosporidium* tespit edilmemiştir. Erzincan'ın 1926- 2016 yıllarında gerçekleşen aylara göre ortalama yağış dağılımı Tablo 4.7' de verilmiştir. En çok

yağış alan aylar ilkbahar aylarıdır. Bu nedenle Hashwey ve arkadaşlarının da (1997) belirttiği gibi, fazla yağın yağmur ve nemli havanın, içme suyu ve çevresel sularda daha fazla kontaminasyona sebep olduğu düşünülmektedir. Çalışmamız sonuç olarak Kaya'nın 2011 yılında Ordu il merkezinde belirlenen 5 istasyondan belirli aralıklarla topladığı su örneklerini *Cryptosporidium* türlerine ait ookistler bakımından MAF, LAMP ve PCR teknikleri ile incelediği ve yüzey sularıyla temas halindeki üç istasyonda *Cryptosporidium* ookistlerini tespit edip en yüksek değerlerine ilkbahar mevsiminde rastladığı çalışma ile paralellik göstermektedir.

Tablo 5.1. Erzincan ili 1926 – 2016 yılları arasında gerçekleşen ortalama yağış değerleri

Aylar	Ortalama Yağışlı Gün Sayısı	Aylık Toplam Yağış Miktarı Ortalaması (kg/m ²)
Ocak	9,4	27,5
Şubat	8,9	30,8
Mart	11,2	41,8
Nisan	12,6	52,6
Mayıs	13,8	52,6
Haziran	8,7	30,8
Temmuz	3,3	11,0
Ağustos	2,4	6,4
Eylül	4,2	15,3
Ekim	8,2	40,7
Kasım	8,3	35,8
Aralık	9,3	28,2

Erzincan il merkezi, ilçe ve köylerden topladığımız 140 su örneğinin *C. parvum* açısından 9' u (% 6,4) LAMP ile pozitif bulunurken, PCR ile sadece 6 (% 4,3) örnek pozitif sonuç vermiştir. Aradaki farkın Alhassan ve arkadaşlarının (2007) belirttiği gibi su numunelerinde bulunan olası PCR inhibitörlerinin mevcudiyetinden ve PCR inhibitörlerinin LAMP üzerine etki etmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamız Karanis ve arkadaşlarının, 2007 yılında yaptığı daha önce IFA ile *Cryptosporidium* varlığı pozitif olarak rapor edilen 7 nehir suyu örneğini LAMP ve PCR tekniği ile inceledikleri ve analizler sonucunda tüm su örneklerini LAMP tekniği ile pozitif bulurken PCR ile pozitif sonuç alamadıkları ve yine Alhassan ile arkadaşlarının 2007 yılında Bulgaristan'da yaptıkları çalışmada 7 ırmaktan alınan su

örneklerinde *Cryptosporidium* türlerini tespit etmek amacı ile LAMP ve PCR tekniklerini karşılaştırılmalı olarak kullandıkları, sonucunda su örneklerinden 7' sini LAMP yöntemi ile *Cryptosporidium* açısından pozitif bulurlarken, PCR yöntemi ile hiçbir örnekte *Cryptosporidium* belirlemedikleri çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışma sonucunda LAMP yöntemi ile Kolören ve arkadaşlarının da (2010), belirttiği gibi *C. parvum* gibi parazitlerin kısa zamanda tespit edilebildiği, tekniğin ekonomik, kolay uygulanabilir ve yüksek duyarlılığa sahip olması nedeni ile birçok alandaki tanı laboratuvarlarında kullanımının mümkün olduğu ve standart bir PCR çalışması için harcanan sürenin üçte biri kadar daha kısa bir sürede sonuç almanın mümkün olduğu söylenebilir.

İnsan yaşamının olmazsa olmazı olan su sınırlı bir kaynaktır. Dünyadaki nüfusun ve sanayi üretiminin hızla artışına rağmen su kaynaklarının sınırlı olması bu kaynakların zamanla kirlenmesine ve tüketilmesine neden olmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %40'ının yaşadığı 80 ülke şimdiden su sıkıntısı çekmektedir. Bu sebeple su kaynakları çok iyi değerlendirilmeli ve alınacak önlemlerle kirlenmesi engellenmelidir (Çeber vd., 2005).

Su, *Cryptosporidium*' un taşınmasında en önemli araçlardan biri olarak görülmektedir (Millar, 2002). *Cryptosporidium*' un içme sularında kontrol edilmesi gereken yeni ve en önemli kontaminantlardan biri olduğu tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* ookistlerinin sulara geniş yayılım gösterdiği ve dokunulmamış yüzey sularında, filtre edilmiş yüzme havuzu suyunda, hatta klorlanmış veya filtre edilmiş içme suları gibi her tip suda bulunabildiği belirtilmiştir (Chen vd., 2002).

Ülkemizde su kökenli *Cryptosporidium* spp. varlığını saptamaya yönelik çalışmalar yok denecek kadar az bulunmaktadır. Bu çalışma Erzincan ili içme ve kullanma suyu örneklerinde *C. parvum*' un varlığını moleküler yöntemler ile göstermek için yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma gelecekte planlanan epidemiyolojik çalışmalarla *Cryptosporidium* spp. genotiplendirilmesi, filogenetik ilişkinin belirlenmesi ve bulaş kaynaklarının saptanmasında yararlı olacaktır. Çalışmamız; elde edilen veriler ile

toplum sağlığının korunması, iyileştirilmesi ve yaşam kalitesinin arttırılmasına katkı sağlamaktadır.

C. parvum enfeksiyonlarının gerçekleşmemesi için öncelikle su kaynaklarının kontrol edilmesi gerekmektedir. Ookistlerin yok edilmesi enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir (Aysal, 2004). Bu nedenle su kaynaklı *C. parvum*' un kontrolü için, filtrasyon ve dezenfeksiyon işlemleri birlikte uygulanmalıdır. Diğer taraftan *Cryptosporidium* ookistlerini elimine etmek için, yalnızca klorlama işleminin yeterli olmadığı bildirilmiştir (Korich vd., 1990). Ülkemizde de içme ve kullanma suyu dezenfeksiyonunda klorlama işleminin uygulandığı göz önüne alınırsa, nlem amacı ile risk altında olan bölgelerdeki içme sularının en az 1 dakika süre ile 72 C'de tutularak ookistlerin aktivitelerini yitirmeleri sağlanmalıdır (Dillingham, 2002).

Cryptosporidium türlerinin dışkı kontaminasyonu ile su kaynaklarının kirlenmesi sonucu yayıldığı gözönüne alınırsa kurumlar bu konuda bilgilendirilmeli ve bu kurumların kanalizasyon atıklarını arıtıma sistemleri kullanarak ya da içme suyu kaynaklarından uzak yerlere boşaltarak nlem almaları tavsiye edilmektedir.

Sonuç olarak; sudan kaynaklanan cryptosporidiosis vaka ve salgınlarının önlenmesi ve dolayısıyla halk sağlığının korunmasında *C. parvum*' un ookistlerinin hangi su kaynaklarında bulunduğu ve bu su kaynakları için kontaminasyon nedenlerinin belirlenerek gerekli önlemlerin alınması ve mücadele yöntemlerinin belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abd El Kader, N.M., Blanco, M.A., Ali-Tammam M, Abd El Ghaffar Ael, R., Osman, A., El Sheikh, N., Rubio, J.M., de Fuentes, I., (2012) “Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in human patients in Cairo, Egypt”, *Parasitol Res*; 110: 161-6.

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.

Aksoy Ü., Erbay A., Akısü Ç., Apa H., Özkoç S., Öztürk S., (2003) “ Intestinal parasites in children with neoplasms”, *The Turkish Journal of Pediatrics*, 45:129-132 .

Alhassan, A., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M.Y., Mbat, 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) “Uluabat Gölü’nün mikrobiyolojik seviyesinin belirlenmesi” , *Ekoloji Çevre Dergisi*, 9 (33): 3-5.

Altıntaş K., (2002) “Tıbbi Parazitoloji” , *Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları*, 170- 172.

Akşehirlİ, Ş.,G., (1995) “Kayseri’de 0-5 grubu ishallerde çocuklarda *Cryptosporidium*’un araştırılması”, Doktora Tezi , *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Mikrobiyoloji AD.

Aküzüm, T., Çakmak, B., Benli, B., (1999) “Yirmi birinci yüzyılda dünyada su sorunu”, 7. *Kültürteknik Kongresi*, Nevşehir.

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.

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.

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**, Eskişehir, 1650.

Ayaz E., (2015) “Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *cryptosporidium parvum*’un moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi” (Yüksek lisans) **Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** , Ordu.

Aysal S., (2004) “Isparta bölgesindeki çeşitli su kaynaklarında *Cryptosporidium parvum*, Giardia intestinalis, Entero hemorrajik, E.coli ve diğer Entero patojenlerin araştırılması”, (Yüksek Lisans), **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.

Bakır B., Tanyuksel M., Saylam F., (2003) “Investigation of waterborne parasites in drinking water sources of Ankara”, **J Microbiol**; 41(2): 148-51.

Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M., (1994) “Methods for identification of etiological agents of infectious disease” **In.Diagnostic Microbiology** 9 th ed. London: Mosby Year Book.

Berger, SA. (2006) “Human Parasitic Diseases Sourcebook” **Jones and Bartlett Publishers**, 116-121

Boch, J.V., Göbel, J.H., Brandler, U., Schloemer, L., (1982) “Kryptosporidien-Infektion bei Haustieren”, **Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.**, 95:361-367.

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.

Butler B.J., Mayfield C.I., (1996) “*Cryptosporidium* spp. - A Review of the Organism, the Disease, and Implications for Managing Water Resources”, **Waterloo Centre for Groundwater Research**, Waterloo, Ontario, Canada.

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 .

Carpenter, .C, Fayer, R., Trout, J., Beach, M. J., (1999) “Chlorine Disinfection of Recreational Water for *Cryptosporidium parvum*”, **Emerging Infectious Disease**, 5: 579-584.

Carraway, M., Tzipori, S., Widmer, W., (1996) "Identification of Genetic Heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* Ribosomal Repeat", *Appl Environ Microbiol*, 62: 712-716.

Casemore, D.P., (1991) "Laboratory methods for diagnosing kriptosporidiyoz", *Journal of Clinical Pathology*, 44: 445-45.

Casemore D.P., Sands R.L. and Curry A., (1985) "*Cryptosporidium* species a new human pathogen. J. Clin", *Pathol*, 38: 1321-1326.

Castro-Hermida J.A., Garcia-Prevedo, 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-Prevedo, I., Almeida, A., Gonzales-Warleta, M., Mezo, M., (2010) "*Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain", *Water Research*, 44: 5887-5896.

Chalmers, R.M., Katzer, F., (2013) " Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis", *Trends in Parasitology*, 29(5):237-251.

Chen, X., Keithly, J.S., Paya, C.V., Russo, L., Nicholas, F., (2002) "Cryptosporidiosis, The New England" *Journal of Medicine*, 346(22): 1723-1731.

Cheng, H.W., Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Broaders, M.A., Tamang, L., Connolly, M., (2009) "Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments", *Parasitol Res* 105: 689-96.

Clark DP., (1999) "New insights into human cryptosporidiosis", *Clin Microbiol Rev* , 12:554-563.

Coupe S., Delabre K., Pouillot R., Houdart S., Santillana-Hayat M., Derouin F., (2006) "Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study", *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medicine Microbiology*, 47: 351-359.

Current, W.L., Long, P.L., (1983) "Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos", *J. Infect. Dis.*, 146-6:1108-1113.

Current, W.L., (1986) "*Cryptosporidium*: its biology and potential for environmental transmission", *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 17:21-29.

Current W.L., Reese, N.C., (1986) "A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice", *J. Protozool*, 33:98.

Current W.L., Bick P.H., (1989) “Immunology of *Cryptosporidium* spp”, *Pathology and Immunopathology Research*, 8: 141-160.

Current W.L. and Garcia L.S., (1991) “Cryptosporidiosis. Clin”, *Microbiol. Review*, 4(3), 325-358.

Çeber K., Aslan G., Otağ F., Delialioğlu N., Öztürk C., Babür C., Emekdaş G., (2005) “ Mersin İlinde İçme Suyu, Kullanma Suyu, Atık Su ve Deniz Sularında *Cryptosporidium* spp. Ookistlerinin Araştırılması” , *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29 (4): 224-228.

Çetinkaya, F., (2004) “Cryptosporidium parvum’un Bulaşmasında Su ve Gıdaların Rolü” *Uludağ Üniversitesi Vet. Fak. Der.*, 23(1-2-3): 103-109.

Çiçek, M., Körkoca, H., Akkaş, Ö., (2011) “Van ili içme sularının *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden incelenmesi”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (3): 122 – 126.

Daniels, M.E., Shrivastava, A., Smith, W. A., Sahu, P. Odagiri, M., Misra, P.R., Panigrahi, P., Suar, M., Clasen, T., and Jenkins , M.W., (2015) “*Cryptosporidium* and *Giardia* in Humans, Domestic Animals, and Village Water Sources in Rural India” , *Am J Trop Med Hyg.* 93(3): 596–600.

Delibaş, S., Kurugöl, Z., Pektaş, B., Vardar, F., Özen, S., Turgay, N., (2001) “Case report: Diarrhea due to *Cryptosporidium* in a hypogamaglobulinemic child”, *Acta Parasitologica Turcica* 25: 113-114.

Deveci, C., (2014) “Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi’ne gelen hastalardan alınan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. varlığının mikroskopik bakı ve elisa ile araştırılması”, Yüksek lisans tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Parazitoloji anabilim dalı.

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.

Dietz, V., Vugia, D., Nelson, R., (2000) “Active, Multisite, Laboratory-based Surveillance For *Cryptosporidium parvum*” *Am J Trop Med Hyg* 62: 368–372 .

Dillingham, R.A., Lima, A.A., Guerrant, R.L., (2002) “Cryptosporidiosis: epidemiology and impact” *Microbes and Infection*, 4: 1059-1066.

Dirim, E.D., (2003) “İnsanlarda Cryptosporidiosis Tanısında Dışkı Örneklerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Yeri”, Uzmanlık Tezi, *Ege Üniversitesi*, İzmir, 116 .

- Dirim, D., Turgay, N., Alkan, M.,Z., (2003) “Bir cryptosporidiosis olgusunun kinyoun asit-fast boyası ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile takibi”, **T. Parazitol. Derg.**, 27(4):237239.
- Doğan, N., Akgün, Y., (1998) “İshalli olgularda *Cryptosporidium* oocystlerinin araştırılması”, **T. Parazitol. Derg.**, 22(3): 243-246 .
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., (2009) “Emerging food-borne parasites” **Vet Parasitol** 163: 196-206.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R., (1990) “Cryptosporidiosis of man and animals”, **CRC Press**, Boca Raton, 199.
- Eckert, J., Protozoa. *In*: Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel RM (eds), (2005) “Medical Microbiology”, **Thieme**, New York, USA 476-542.
- Eisenberg, J.N.S., Lei, X., Hubbard, A.H., (2005) “The Role of Disease Transmission and Conferred Immunity in Outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* Outbreak in Milwaukee, Wisconsin”, **Am J Epidemiol** 161: 62–72.
- Erman, N., Beyazıt, A., Öz, İ., (2000) “İzmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda cryptosporidiosisin yaygınlığı”, **Bornova Vet. Kontr. ve Araşt. Enst. Derg.**, 25(39):33-38.
- Ergüven, S., Arıkan, S., Akyön, Y., Yurdakök, K., Günalp, A., (1998) “Hipogama-globulinemili bir hastada *Cryptosporidium*, *Giardia* ve *Hymenolepis* koenfeksiyonu”, **Ankara Mikrobiyoloji Bülteni Derg.** 32(1), 85- 91.
- Fayer, R., Ungar, B.L., (1986) “*Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis”, **Microbiol. Rev.** 50(38), 458-486
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., (2000) “Epidemiology of *Cryptosporidium*:transmission, detection and identification”, **International Journal for Parasitology**, 30: 1305-1322
- Fayer, R., (2000) “Waterborne and foodborne protozoa: Foodborne Diseases Handbook”, Eds: Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O, **New York.**, 289-322 .
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., (2008) “*Cryptosporidium ryanaen* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*)”, **Veterinary Parasitology**, 156: 191-198.
- Fukuda, S., Takao, S., Kuwayama, M., Shimazu, Y., Miyazaki, K. (2006) “Rapid detection of Norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription–loop-mediated isothermal amplification assay”, **J. Clin. Microbiol**, 44(4): 1376–1381.

Garcia, L.S., Bruckner, D.A., (1997) "Diagnostic Medical Parasitology. ASM Pres", *Washington DC, Third edition*, 59-63.

Garcia, L.S., Shimizu, R.Y., Bernard, C.N., (2000) "Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay", *J Clin Microbiol*; 38: 3337-3340.

Gasser, R.B., O'Donogue, O., (1999) "Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*", *International Journal of Parasitology*, 29: 1379-1413.

Gilles, H., (1999) "Cryptosporidiosis. In: Hart CA", ed. Protozoal Diseases. *New Oxford University Press*, 592-606.

Gödemerdan, A., Kalkan, A., Özkellekçi, A., Erensoy, A., Kılıç, S., Sırrı A., (1999) "İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklığı", *Türkiye Parazitoloji Derg.* 23:2

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.

Hashimoto, A., Sugimoto, H., Morita, S., Hirata, T., "Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts in sewage by semi-nested PCR and direct sequencing" *Water Research*, 40, 2527 – 2532 (2006)

Hashwey, R., Smith, N.H., Cron, S., Graviss, E.A., Chappell, C.L. and White, A.C., (1997) "Cryptosporidiosis in Houston, Texas a report of 95 cases", *Medicine*, 76(2), 118-139

Heine, J., (1982) "Eine einfache Nachweismethode für kryptosporidien im Kot", *Zbl. Vet. Med. B*, 29:324-327 .

Heine, J., Pohlenz, J.F., Moon, H.W., Woode, G.N., (1984) "Enteric lesions and diarrhea in genotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species (Abstract)", *The journal of Infectious diseases*, 150, 5.

Hijjawı, N., (2003) "*Cryptosporidium*: in vitro cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture", Ed. Thompson, R.C.A., Armson, A., Ryan, U.M., from molecules to disease. Amsterdam: *Elsevier*, 233-253.

Howe, A.D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn K.S., Wright P., Hunter, P.R., (2002) "*Cryptosporidium* Oocysts in a Water Supply Associated with a Cryptosporidiosis", *Outbreak. Emer. Infect. Dis.*, 8: 619-624.

Hurst, C.J., Toranzus, G.A. (1997) "Water microbiology in public health. In: Hurst CJ (ed) Manual of environmental microbiology", *ASM Press*, Washington, D.C., pp 133–242.

Ignatus, R., Lehman, M., Mıksıts, K., Regnath, T., Arvand, M., Engelmann, E., Futh, U., Hahn, H., Wagner, J., (1997) “A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens” *J. Clin. Microbiol* , 35(2):446-449.

Irmak, H., (2008) “Giriş Sularla ilişkili hastalıklar” **Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü** Ankara, 7.

İnternet: (2005) Türk Standartları Enstitüsü “Sular–İnsani tüketim amaçlı sular” <https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx>

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.

Kaçmaz, M., (2015) “Diyarbakır yöresinde çeşitli su kaynaklarında cryptosporidium ve Giardia türlerinin araştırılması”, Yüksek Lisans, **Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Kars.

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

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.

Kaske, M., Kunz, H.J. (2003) “Handbuch der Durchfallerkrankungen der Kälber”, **Osnabrück, Germany**: Kamlage Verlag, ISBN: 3-9806688-3-5 , Pp. 9-17,29-31,36–80,109–139 ,

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**, Ordu.

Kaypmaz, A., Vehid, S., Köksal, S., Can, G., Toprak, N., Yurtsever, E., (2001) “Çevre Sağlığı” , Halk Sağlığı Ders Notları , **Nobel Tıp** , 570-592.

Kehl, K.S.C., Cicirello, H., Havens, P.L., (1995) “Comparision of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species”, *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2): 416-418.

Kolören, Z., Kaya, D., (2010) “Ordu ve çevresindeki ilçelerin yüzeysel sularında *Cryptosporidium parvum* ve *Giardia lamblia*’nın yaygınlığı” **4. Ulusal Limnoloji Kongresi**, Bolu. s 8 .

Kolören, Z., Avşar, C., Şekeroğlu, A.Z., (2010) “Protozoonların tanısında ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (LAMP) “ *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34: 207-11.

Kolören, Z., (2011) Delioğlu B.K., “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.

Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R., (1990) “Effects of Ozone, Chlorine Dioxide, Chlorine and Monochloramine on *Cryptosporidium* parvum Oocyst Viability”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1423-1428 .

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.

Kurşun, Ö., (2003) “ Ankara’ daki değişik su kaynakları ile kasaplık sığır ve koyun dışkılarında *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin varlığı”, doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Lechevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G., (1991) “Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2610-2616.

Lechevallier M.W., Norton W.D., (1996) “Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Raw and Finished Drinking Water”, *J. Am. Water Works Assoc.*, 87: 54-68.

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.

Liu, C., Zheng, W., Zhang, H., Hou, Y., Liu, Y., (2009) “Sensitive and rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula by loopmediated isothermal amplification method”, *J. of Food Safety*, 29: 83-94

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

Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., (1994) “A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply”, *N Engl J Med*, 331:161–167

MacPherson, D.W., McQueen, R., (1993) “Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods”, *J. Clin. Microbiol*, 31(2):198-202

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”, Ed. Weiss, L.M., Philadelphia, *Churchill Livingstone*, 3237-3257

Marcial M.A., Madara, J.L. (1986) “*Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interaction in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells”, *Gastroenterology*, 90:583

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

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

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.

Millar, B.C., Finn, M., Xiao, L., Lowery, C.J., Dooley, J.S.G., Moore, J.E., (2002) “*Cryptosporidium* in foodstuffs an emerging aetiological route of human foodborne illness”, *Trends in Food Science & Technology*, 13: 168-187.

Miller, D.L., Ligett, A., Radi, Z.A., Branch, L.O., (2003) “Gastrointestinal Cryptosporidiosis in a puppy”, *Vet. Parasitol*, 115, 199-204.

Mohammad-Reza Mahmoudi, M.R., Kazemi, B., Mohammadiha, A., Mirzaei, A., Karanis, P., (2013) “ Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran”, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107 (8): 511-517.

- 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
- Morgan, U. M., Xiano, L., Fayer, R., Altaf, A.L., and Thompson Andrew, R.C., (2000) "Epidemiology and Strain Variation of *Cryptosporidium parvum*", **Cryptosporidiosis and Microsporidiosis**, 6: 116-139
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notomi, T., (2004) "Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA", **J Biochem. Biophys. Methods**, 59: 145–157,
- Mtombo, M.M.A., Nash, A.S., Blewett, D.A., Wright, S., (1992) "Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens", **Vet. Parasitol**, 45: 49-57
- Muhid, A., Robertson, I., Ng, J., Ryan, U., (2011) "Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium sp.* infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia", **Experimental Parasitology**, 127:534- 538
- Mülazımoğlu, L., Vahapoğlu, H., Gürgün, Ö., Yıldırım, Semerci, Taşer, B., (1993) "Beş yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı", **Tıbbi Mikrobiyal. Cem. Derg.** 23: 113-115
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., (2002) "Accelerated reaction by Loopmediated isothermal amplification using loop primers", **Molecular and Cellular Probes**, 16: 223-9
- 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'Donoghue, P.J., (1995) "*Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int", **J. Parasitol**, 25: 139-195
- O'Handley, R.M., Olson, M.E., (2006) "Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants" Ed. Ballweber, L.R., Smith, R.A. , **Veterinary Clinics of North America**, Food Animal Practice – Ruminant Parasitology 22:623 – 639
- Ok, U.Z., Balcıoğlu, İ.C., (2007) "Cryptosporidiosis" Ed. Özcel, M.A., Özbel, Y., Ak, M., "Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları", **Meta Basım Matbaacılık**, 388-91
- Ok, U.Z., Girginkardeşler, N., Kilimcioğlu, A., Limoncu, E., (1997) "Diğer Tanı Materyalleri ve Uygun Tanı Parazit Hastalıklarında Tanı", Editorler, Ozcel, M.A. ve Altıntaş, N., **Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın**, İzmir, 15: 1-148

Ok, Ü.Z., Üner, A. ve Korkmaz, M., (1995) “İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları”, Türk Parazitoloji Derneği, **Ege Üniv. Basımevi** İzmir. 12: 98

Oktun, M., Yüce, K., (1995) “İzmir bölgesinde ishallerde dört bakteriyel etken: Salmonella türleri, Shigela türleri, Enteropatojen E.coli ve ısıya duyarlı toksin üreten enterotoksinojen E.coli Inf”, **Gerg.**, 9(4), 357-360

Olson, M.E., O’Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A., (2004) “Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle”, **Trends in Parasitology** 20:185 – 191

Otağ, F., Aslan, G., Emekdaş, G., Aydın, E., Taylan Özkan, A., Çeber, K., (2007) “Mersin ilinde ilkokul öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin araştırılması” **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 31: 17-19

Över, U., (1996) “İshalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*’un rolü ve sağlıklı populasyonda seroprevalansı”, Doktora Tezi, **Marmara Üniv. Sağlık Bil. Enst.**,

Özcel, M.A., Altıntaş, N., (1997) “Parazit hastalıklarında tanı”, Türkiye Parazitoloji Derneği, 15

Özcel, M.A., Özbel, Y., Ak, M., (2007) “Özcel’in Tıbbi Parazit Hastalıkları” **Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın** , 22: 363-376

Özçelik S. , Değerli, S., Poyraz, Ö., Malatyalı, E., Alim, A., (2011) Cumhuriyet Üniv., Tıp Fak., Parazitoloji AD.; Mikrobiyoloji AD., Sivas; 3 İl Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı Lab. Md., “ Sivas çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* spp. varlığının ELISA ve DFA yöntemleriyle araştırılması”, **17. Ulusal Parazitoloji Kongresi**, Kars

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 buzağularında *Cryptosporidium*’ların varlığının araştırılması” **Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi**, 22(36): 15-22

Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V.L., Morita, K., (2008) “Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases”, **Rev.Med.Virol.**,18: 407-421,

Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S., Mac Kenzie, W.R., Lal, A.A., and Beard, C.B., (1997) “Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles”, **Emerg Infect Dis** 3: 567-573

Plutzer, J., Karanis, P., Domokos, K., Törökne, A., Marialigeti, K., (2008) “Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in hungarian raw,

surface and sewage water samples by IFT, PCR and Sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes”, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211-5,6: 524-533

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” , *Parasitol Research*, DOI 10. 1007 00436-009-1391-3

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

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., (2002) “Human Diseases Caused by Fungi and Protozoa: Cryptosporidiosis”, In: Microbiology, *The McGraw-Hill Companies*, USA., 952-3

Reisner, B.S., Spring, J., (2000) “Evaluation of a combined acid-fast-trichrome stain for detection of Microsporidia and *Cryptosporidium parvum*”, *Arch. Pathol. Lab. Med*, 124:777-779

Roberts, C.L., Morin, C., Eddiss, D.G., Wahlquist, S.P., Mshar, P.A., Hadler, J.L., (1996) “Factors influencing *Cryptosporidium* testing in Connecticut”, *J. Clin. Microbiol*, 34(9):2292-2293

Robertson, L.J., Gjerde, B., (2001) “Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway”, *Scand J Public Health* 29(3): 200-7

Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R.M., (2008) “Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhoea”, *Emerg Infect Dis*, 14:1800-2

Robin, H.J., Petry, F., (1999) “*Cryptosporidium parvum*: Structural components of the oocyst Wall”, *International Journal for Parasitology*, 85(5): 839-849

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

Saygi, G. , (1998) “Temel tıbbi parazitoloji”, *Esnaf Ofset Matbaacılık*, 78-80

Sears, C.L., Kirckpatrick, B.D., (2001) “In: cryptosporidiosis and isosporiosis, principles and practise of clinical parasitology” John Wiley & Sons Ltd. Pres, 139-164

Sharma, S., Sachdeva, P., Viridi, J.S., (2003) “Emerging water-borne pathogens” *Appl Microbiol Biotechnol*, 61:424–428

- Seckler, D.W., Barker, R. and Amarasinghe, U., (1998) “ Water scarcity in the twenty-first century” *Int. J. Water Resour. Dev*, 15: 29-43
- Sears, C.L., Kirckpatrick, B.D., (2001) “In: cryptosporidiosis and isosporiosis, principles and practise of clinical parasitology”, *John Wiley & Sons Ltd. Pres*, 139-164
- Silva, C.V., Ferreira, M.S., Gonçalves-Pires, M.R.F., Costa-Cruz, J.M., (2003) “Detection of Cryptosporidium-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay”, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 98(8):1097-1099
- 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
- Starling, C.R., Arrowood, M.J. (1993) “Cryptosporidia, In: parasitic protozoa” *Academic Pres*,. 6(65): 159-224
- Spano, F., Crisanti, A., (2000) “*Cryptosporidium parvum*: The many secrets of a small genome”, *International Journal for Parasitology*, 30: 553-565
- Sunnotel, O., Lowery, C.J., Moore, J.E., Dooley, J.S., Xiao, L., Millar, B.C., Rooney, P.J., Snelling, W.J , (2006) “*Cryptosporidium*”, *Letters in Applied Microbiology*, 43, 7-16
- Taş, B., Candan, A.Y., Can, Ö., Topkara, S., (2010) “Ulugöl (Ordu)’ün bazı fiziko-kimyasal özellikleri”, *Journal of Fisheries Sciences.com*, 4 (3): 254-263
- Terzi, G., (2005) “Gıda kaynaklı protozoon enfeksiyonların insan sağlığı açısından önemi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(2):47- 55
- Thompson, R.C.A., Palmer, C.S., O’Handley, R., (2008) “The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals”, *The Veterinary Journal*, 177:18-25
- 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
- Unat, E.K., Yücel, A., Atlaş, K., Samastı, M., (1995) “Unat’ın tıp parazitolojisi”, *İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları*, 5:595-600
- Ungar, B.L.P., (1995) “Infectious diseases and their etiologic agents, volume 2, section H, in Principle and Practise of Infectious Diseases” Ed., Mandell, G.L, Bennet, J.E., Dolin, R., , *Churchill livingstone, New York Churchill livingstone* 4: 2500-2546.

- Uslu, O., (2001) "Su kirliliği. Türkiye'nin çevre sorunları", *T.Ç.S.V Yayını*, Ankara,
- Usluca, S., Aksoy, Ü., (2006) "Su kaynaklı bir parazit: *Cryptosporidium*", Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi , 20(1): 65-74
- Üner, A., Tanrıverdi, S., Caner, A., Değirmenci, A., (2009) "Cryptosporidium'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar", Ed. Ozcel, M.A, Tanyuksel, M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. *Türkiye Parazitoloji Derneği* İzmir: 22: 631-43
- 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
- Widmer, G., (1995) "Suppression of Leishmania RNA Virus Replication by Capsid Protein Overexpression" *J. Virol.*, 69: 4122-4126.
- Xiao, L., Singh A., Limor, J., (2001) Graczyk, T.K., Gradus, S., Lal, A.. "Molecular characterization of cryptosporidium oocysts in samples of raw surface water and wastewater", *Appl Environ Microbiol*; 67: 1097
- Xiao, L., Feng, Y., (2008) "Zoonotic cryptosporidiosis", *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 309-23
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., (2004) "*Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health", *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 72-97
- Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A.A., (2000) "Identification of species an 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
- Yetkin, M.A. (1998) "İmmun yetmezlikli hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması" Uzmanlık Tezi, *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı*, Ankara.
- Yılmaz, A., Akkaş, Ö., Uslu, H., (2016) "Investigation of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in Erzurum's Potable Water on Different Months Middle Black Sea *Journal of Health Science* 2(3): 1-6
- Yıldız, M., Çöplü, N., Kılıç, S., Babür, C., Öncül, Ö., Esen, B., (2001) "İshali olan solid tümörlü olgularda *Cryptosporidium spp.* araştırılması", *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 25: 1-8
- Yücel, A., (1989) "Ülkemizde Yeterince İncelenmeyen Enterik Patojenler" ed. Töreci, K., *Anadolu Üniv. Basım evi*, Eskişehir 102

Zuckerman, U., Gold, D., Shelef, G., Armon, R., (1997) “The Presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Surface Waters and Effluents in Israel”, *Water Sci. Technol.*, 35: 381-384



ÖZGEÇMİŞ

Seçil Yalçın Kasım 1982’ de Ankara’ da doğdu. İlkokulu Elazığ’ da, ortaokul ve liseyi Ankara’ da tamamladıktan sonra Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2004 yılında mezun oldu. 2013 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ nde yüksek lisans eğitimine başladı. Yalçın evli ve iki çocuk annesidir. Halen Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Kurumu, Erzincan Halk Sağlığı Laboratuvarı ’nda Biyolog olarak çalışmaktadır.

