



KÜTAHYA İLİ ÇEVRESİNDE BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM* (TYZZER,1907)  
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Balca AKALIN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2018

KÜTAHYA İLİ ÇEVRESİNDE BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM* (TYZZER, 1907)  
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Balca AKALIN

Dumlupınar Üniversitesi  
Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca  
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Anıl İÇA

Haziran-2018

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Balca AKALIN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Kütahya İli Çevresinde Buzağılarda *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907) Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

13/06/2018

Prof. Dr. Önder UYSAL  
**Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü**

Prof. Dr. Hayri DAYIOĞLU  
**Bölüm Başkanı, Biyoloji Bölümü**

Prof. Dr. Anıl İÇA  
**Danışman, Biyoloji Bölümü**

**Sınav Komitesi Üyeleri**

Prof. Dr. Anıl İÇA  
**Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi**

Dr. Öğretim Üyesi Aycan Nuriye GAZYAĞCI  
**Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Kırıkkale Üniversitesi**

Doç. Dr. Cüneyt Nadir SOLAK  
**Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurumu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %4 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Prof. Dr. Anıl İÇA

Balca AKALIN

## KÜTAHYA İLİ ÇEVRESİNDE BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM* (TYZZER, 1907) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Balca Akalın

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2018

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Anıl İÇA

### ÖZET

Cryptosporidiosis ve bu hastalığa neden olan protozoan parazit *Cryptosporidium* spp.'nin önemi gittikçe artan bir şekilde anlaşılmaktadır. Bağırsak hücrelerine intraselüler-ekstrasitoplazmik yerleşim gösteren bu protozoon parazitler zoonotik bir enfeksiyona sebep olmasıyla bilinmektedir. Başta insan ve evcil hayvanlar olmak üzere vahşi hayvanların da dahil olduğu geniş bir konak potansiyeline sahiptir. Bu hastalık etmenlerinden en bilineni zoonotik tür olan *Cryptosporidium parvum*'dur.

Çalışmamızda Kütahya yöresinde yaş aralığı 1 gün ila 4 ay arasında değişen sığır gruplarından 100 dışkı örneği toplanmış ve PCR-Nested PCR ve RFLP yöntemleri kullanılarak bu örneklerin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Kütahya yöresinde buzağılarda bulunan türler bulunma oranlarına göre sırasıyla; *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis* ve *Cryptosporidium ryanae*'dir. Pozitif izolatların Kimura-2 parametre metodu ile filogenetik analizi sonucunda tespit edilen türlerin başta Çin olmak üzere dünyanın bir çok yerinde ve Türkiye'de önceden belirlenen suşlarla aynı kümede buldukları tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium*, Kütahya, RFLP, SSU rRNA.

**INVESTIGATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* ( TYZZER, 1907 ) SPECIES WITH  
MOLECULAR METHODS IN CALVES IN AROUND OF KUTAHYA PROVINCE**

Balca Akalın

Biology, M. S. Thesis, 2018

Thesis Supervisor: Prof. Anıl İCA

**SUMMARY**

The protozoan parasite *Cryptosporidium* spp. is causing Cryptosporidiosis and this disease is getting increasingly importance. These protozoan parasites which are found to be at intracellular-extracytoplasmic area in intestinal cells, are known to cause a zoonotic infection. It has a large host potential, including wild animals, especially human beings and pets. *Cryptosporidium parvum* species is the most known zoonotic species of this disease.

In our study, 100 stool specimens were collected from calf groups age ranging from 1 day to 4 months in around of Kutahya province and molecular characterization of these samples was done by using PCR-Nested PCR and RFLP methods. *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis* and *Cryptosporidium ryanae* are the species found in calves in the region of Kütahya, respectively. These identified species were found to be in same cluster with predetermined strains in many parts of the world primarily in China and also in Turkey as a result of phylogenetic analysis of positive isolates by using the Kimura-2 Parameter method.

**Key Words:** Calf, Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium*, Kutahya, RFLP, SSU rRNA.

## TEŞEKKÜR

Konumun seçiminde, yapım aşamasında her türlü desteği ve olanağı sağlayan her konuda sabır gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Anıl İÇA'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Araştırmalarımın yürütülmesi konusunda deneyim, bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Tuba İÇA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecimin en başında analizlerim için pozitif örnek gönderen ve yazım aşamam boyunca referans aldığım Sayın Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Saha çalışmalarında -örneklerin toplanması, ulaşım ve gidilen köylerde hayvan sahipleriyle işbirliğinin sağlanması- gerekli desteği sağlayan Kütahya Damızlık Sığır Birliği ekibine teşekkür ederim. Tezimin son aşamasında tanıştığım, keşke daha çok çalışabilseydik dediğim, bana her zaman yardımcı olan Hakan BURHAN'a emekleri için, laboratuvarında geçirdiğimiz vakit süresince kibarlığı ve yardım severliği ile daima yanımda olan Barış KÜÇÜKAKSOY'a teşekkürlerimi sunarım. Farklı şehirlerde yaşamamıza rağmen bu süreç boyunca manevi destek sağlayan tüm arkadaşlarıma ve her daim bana inanan, güvenen ve sınırsız destekleriyle yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi minnetle sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
SUMMARY .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Taksonomi .....	3
1.2. Morfoloji .....	6
1.2.1. Polar halkalar ve konoid .....	6
1.2.2. Roptriler ve mikronem .....	6
1.2.3. Dense granüller .....	7
1.2.4. Pelikül .....	7
1.2.5. Mikroporlar .....	8
1.3. Yaşam döngüsü .....	8
1.4. <i>Cryptosporidium</i> -Konak İlişkisi .....	12
1.4.1. <i>Cryptosporidium</i> 'un virülans faktörleri .....	12
1.5. Tarihçe .....	14
1.6. Epidemiyolojisi .....	15
1.6.1. Sığırlarda epidemiyoloji .....	16
1.7. Bulaşma Yolları ve Tanı .....	18
1.7.1. Bulaşma yolları .....	18
1.7.2. Tanı .....	20
1.8. Patogenez ve Klinik Belirtiler .....	28
1.9. Genotip ve Filogenetik Analizleri .....	30
1.10. Zoonotik Önemi .....	32
1.11. Korunma Yolları .....	33
2. MATERYAL VE METOT .....	35
2.1. Materyal .....	35
2.1.1. Kullanılan malzemeler .....	35
2.1.2. Kullanılan cihazlar .....	36



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
2.1.3. Solüsyonların hazırlanışı .....	37
2.2. Metot .....	37
2.2.1. Dışkının toplanması .....	37
2.2.2. Modifiye Kinyoun asit-fast boyama .....	37
2.2.3. İşleme tabi tutulacak dışkının potasyum dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) ile saklanması .	38
2.2.4. Dışkının koruyucu maddelerden arındırılması ve DNA ekstraksiyonu .....	38
2.2.5. DNA ekstraksiyon hazırlık aşaması .....	38
2.2.6. DNA ekstraksiyonu .....	39
2.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	40
2.2.8. Nested PCR .....	41
2.2.9. Restriksiyon Fragment Uzaklık Polimorfizmi (RFLP) .....	42
2.2.10. Agaroz Jel Elektroforezi .....	43
2.2.11. Sekans analizi .....	44
3. BULGULAR .....	45
3.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. 'nin PCR ve Nested-PCR Yöntemi ile Tespiti .....	45
3.2. PCR-RFLP ile <i>Cryptosporidium</i> izolatlarının genotiplendirilmesi .....	47
3.3. Sekans ve Filogenetik Analizler .....	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	55
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Apicomplexa</i> alt şubesine ait genel morfolojik yapı .....	7
1.2. Ekskiste olmamış dört sporozoitli <i>Cryptosporidium parvum</i> ookistinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü .....	10
1.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un çeşitli gelişim aşamaları .....	10
1.4. <i>Cryptosporidium</i> yaşam döngüsü .....	11
1.5. Konak epitel hücreleri ile <i>Cryptosporidium</i> ookistleri ve sporozoitlerinin başlangıç etkileşim süreci ve bu süreci yöneten virülans faktörler .....	14
1.6. 2005 yılı itibariyle rapor edilen cryptosporidiosis vakaları .....	18
1.7. Modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle boyanan dışkı örneklerinde gözlemlendiğimiz <i>Cryptosporidium</i> ookistleri .....	21
1.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışma akışı .....	23
1.9. Nested PCR çalışma akışı .....	25
1.10. Konak hücrelerini parazit istilası .....	29
1.11. İleum kriptlerinde <i>Cryptosporidium</i> un çeşitli gelişim aşamaları .....	30
1.12. SSU rRNA gen bölgesine göre <i>Cryptosporidium</i> türlerinin filogenisi .....	32
2.1. Saha çalışması yapılan köyler .....	35
3.1. <i>Cryptosporidium</i> varlığının incelenmesi açısından modifiye Kinyoun asit-fast yöntemi kullanılarak hazırlanan preparatların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü ....	45
3.2. PCR'ın 1. aşamasında elde edilen bant görüntüleri ve yaklaşık büyüklükleri .....	46
3.3. Nested PCR neticesinde elde edilen pozitif bant paternleri ve yaklaşık büyüklükleri ...	46
3.4. Bazı pozitif izolatlarda SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin MboII ve Sspl restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin agaroz jel elektroforezde görünümü .....	47
3.5. Örneklerin toplam tür dağılım oranları.....	48
3.6. <i>Cryptosporidium</i> genel dağılım .....	49
3.7. Yerleşim yerine göre <i>Cryptosporidium</i> dağılımı .....	49
3.8. Yerleşim yerlerinde belirlenen pozitif örneklerin tür dağılım oranları .....	50
3.9. Kütahya yöresinde tespit edilen <i>Cryptosporidium</i> izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer bazı izolatların SSU rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları .....	53

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1. <i>Cryptosporidium</i> 'un sınıflandırması .....	3
1.2. Bilinen <i>Cryptosporidium</i> türleri.....	5
1.3. Moleküler ve immünolojik yöntemlerle tanımlanan olası <i>Cryptosporidium</i> virülans faktörleri .....	13
1.4. Türkiye'deki <i>Cryptosporidium</i> vakalarının dağılım tablosu.....	16
1.5. Sık kullanılan <i>Cryptosporidiosis</i> tanı metotları .....	27
1.6. Parazit türleri ve hayvan konakların arasında değişen <i>Cryptosporidium</i> enfeksiyonu ile ilgili dokuları özetlemektedir .....	29
2.1. Kullanılan primerlerin açıklmaları.....	36
2.2. PCR protokol programı .....	41
2.3. Nested PCR protokol programı.....	42
3.1. Kütahya ili merkez ilçesine bağlı 25 köyden saha çalışmaları .....	48
3.2. Yaş gruplarına göre <i>Cryptosporidium</i> dağılımı .....	50
3.3. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>Cryptosporidium</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler .....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><u>Simge</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
amps	Amper
°C	Santigrat Derece
g	Gram
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Potasyum dikromat
Mg <sup>+2</sup>	Magnezyum
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
mg/ml	Miligram/ Mililitre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
T <sub>m</sub>	Erime Sıcaklığı
■ :	Sığır izolatları
○ :	Buzağı izolatları
◇ :	Dış Grup

<b><u>Kısaltma</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
BSA	Bovin serum albumin
Bp	Baz çifti
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiniükleotit trifosfat
ELISA	Enzim İlintili İmmün Test
ETEC	Enterotoksigenik <i>Escherichia coli</i>
g	Gravite
kb	Kilobaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ(devam)**

<b><u>Kısaltma</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
SSU rRNA	Küçük alt ünite ribozomal ribonükleik asit
TBE	Tris Borat Etilendiamintetraasetik asit
TAE	Tris Asetat Etilendiamintetraasetik asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
POCT	Point of Care Testleri



## 1.GİRİŞ

*Cryptosporidium*; tüm omurgalı sınıflarının gastrointestinal sistemine yerleşerek sindirim sistemi bozukluklarına ve ekonomik kayıplara neden olan, medikal ve veterinerlik alanında dünya çapında öneme sahip zoonotik bir protozoon parazittir (Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012; Ryan ve Hijjawi, 2015).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2004 yılında düzenlenen İhmal Edilmiş Hastalıklar Girişimi'nde "ihmal edilmiş patojen" olarak tanımlanan *Cryptosporidium*'un önemi gittikçe artan bir şekilde anlaşılmaktadır (Chalmers ve Davies , 2010).

Dünyada *Cryptosporidium* cinsi ilk olarak J.J. Clarke tarafından 1895 yılında farelerin mide epitelleri üzerinde bulunan "spor kümesi" olarak gözlenmiştir. Daha sonraki yıllarda Edward Ernest Tyzzer evcil farelerin mide bezleri üzerinde sıklıkla karşılaştığı "spor kümesi"ni *Cryptosporidium* olarak tanımlayan, net bir şekilde betimleyen ve bununla ilgili yayın yapan ilk insan ünvanına sahip olmuştur (İtik-Ekinci, 2012). Tyzzer 1907 yılında bu protozoon parazitin eşeyli ve eşeysiz üreme aşamalarıyla ilgili ilk makalesini yayınlamıştır (İtik-Ekinci, 2012). Ülkemizde ise *Cryptosporidium* ile ilgili ilk çalışmalar 1984 yılında Ayşe Burgu tarafından yapılmıştır (Burgu, 1984).

*Cryptosporidium*, küçük ookiste sahip bir cinstir. Genel olarak küresel ve eliptik şekile sahip olmakla beraber 2 ila 6 µm çapındadırlar. Boyutları türler arası ve çoğalma aşamalarında farklılıklar göstermektedir (O'Donoghue, 1995). Bulunduğu konağın gastrointestinal epitelinin mikrovillus sınırında bulunan epitel hücreleri enfekte edebilme yeteneğine sahip bu protozoon, bir parazitofor vakuol içerisinde intraselüler-ekstrasitoplazmik yerleşim yeri bakımından diğer hücre içi parazitlerden ayrılır (Fayer, 2004; Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012). Nadiren, Peyer plaklarında intrasitoplazmik invazyonlarda oluşmaktadır (Chalmers ve Davies, 2010).

Uzun yıllar *Coccidia* sınıfına dahil olduğu düşünülen *Cryptosporidium* türleri, sıradışı otoenfektif, ookisti konak hücrelerle kurdukları garip bağlantı ve anti-coccidial ilaçlara gösterdikleri direnç nedeniyle aslında her zaman atipik görünmüşlerdir (Barta ve Thompson, 2006).

*Cryptosporidium* türleri, insanlarda, çiftlik hayvanlarında ve diğer hayvanlarda Cryptosporidiosis adı verilen dünya çapında görülen önemli ishalleri enfeksiyona neden olmaktadır (Thompson, 2005; Sakarya vd., 2010). Hayvanlarda; bazı kanatlılarda solunum sistemi, bursa fabricius ve konjunktivada, maymunlarda safra kesesi, safra yolları ve pankreasta ayrıca

buzağılarda üriner sistemde de görülmektedirler. Bunun dışında insanlarda ise gastrointestinal sistem dışında insanlarda solunum sistemi ve konjunktivada görülmüştür (Thompson vd., 2005; Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012).

Patojen türlerin oluşturduğu enfeksiyonların şiddeti ve süresi, konağın immün sistemine ve yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Enfeksiyonların bazıları kendi kendini sınırlayan (self-limiting) tarzda ve akut tipte iken, bazıları ise kronik tiptedir. İmmünyetmezliği olan ve immün sistemi baskılanmış konaklarda hastalık daha şiddetli seyrederek ve ölümle sonuçlanabilir. İnsan ve hayvan sağlığı açısından önemli olan *Cryptosporidium* türleri daha çok bağırsak ve mideye yerleşmektedir. Bazı türler konağa özgü iken bazıları ise çok sayıda konakta enfeksiyona sebep olabilirler (Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012).

*Cryptosporidium*; su, toprak, hava ve gıdalar yoluyla bulaşabilmektedir. Buna karşılık kan yoluyla bulaşmadığı bilinmektedir. (Fayer vd., 2000; Mor vd., 2010; Gormley vd., 2011). Cryptosporidiosis bulaşma döngüsü özellikle kırsal bölgelerde enfeksiyonu taşıyan buzağı ve kuzu gibi genç hayvanların dışkılama yoluyla çok sayıda ookist atması ile başlar. Dışkı yolu ile yayılan bu ookistler dış ortamda uzun süre canlı kalabilmekte ve hijyenin kötü olduğu bölgelerde içme suyu kaynaklarının kontaminasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca ookistlerin dezenfektanlara ve sıcaklık değişikliklerine dayanıklı olmaları su arıtma işlemlerinde önemli sorunlar oluşturmaktadır. Bu sebeplerden dolayı ookistlerle kirlenmiş suların içilmesi içme suyu kaynaklı epidemilere sebep olmaktadır (Fayer, 2004; Thompson vd., 2005; Nichols, 2008; İtik-Ekinci, 2012). Dünya çapında bilinen en büyük epidemiyi 1993 yılında ABD’de Milwaukee/Wisconsin’de görülmüş 403.000 kişiyi etkilemiş ve 100 kişinin de ölümüne neden olmuştur (Drisdelle, 2010). Ülkemizde ise Danimarkalı ve İsveçli yazarlar tarafından 1998 yılında Marmaris’e gelen yabancı turistlerin çoklu mikrobiyal ajanların (çoğunlukla *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 ve enterotoksigenik *Escherichia coli*-ETEC) sebep olduğu su kaynaklı salgına yakalandığı bildirilmiştir (De Jong vd., 1998). Daha sonra 2005 yılında İzmir’de meydana gelen su kaynaklı cryptosporidiosis ve *Cyclospora* koenfeksiyon salgını sonrasında *Cryptosporidium*, Bulaşıcı Hastalıklar İhbarı ve Bildirim Sistemi’nde bildirilmesi zorunlu enfeksiyon etkeni olarak yer almaya başlamıştır (Aksoy vd., 2007).

İnsan ve hayvanların önemli intestinal protozoon enfeksiyon etkenlerinden olan *Cryptosporidium* türlerinin son yüzyılda belirlenmiş olmaları, dönem dönem salgınlara neden olmaları, zoonotik yönü, immün yetmezlik durumlarındaki önemleri ve özellikle buzağılarda neden oldukları ekonomik kayıpları ile dikkat çekmektedirler (Thompson vd., 2005; Nichols, 2008; İtik-Ekinci, 2012;).

## 1.1. Taksonomi

Parazitin taksonomik yeri; evrim, biyoloji, patogenezi, kaynaklar ve patojenlerin bulaşımının anlaşılmasında önemli olduğu kadar teşhis ve tedavi açısından da önemlidir (Chalmers ve Katzer, 2013).

*Cryptosporidium* cinsi, ökaryotların *Mioza* şubesi, *Apicomplexa* alt şubesi, *Cryptogregarina* alt sınıfı, *Cryptogregarida* takımı ve *Cryptosporidiidae* ailesine mensup protozoan parazittir gibi bir tanımlama yapılsa da *Cryptosporidium*'un taksonomisi ve filogenetik ilişkileri sürekli değişim halindedir (Olson vd., 2004). Bilinen en güncel sınıflandırması şu şekildedir (Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** *Cryptosporidium*'un Sınıflandırması (Taxonomicon, 2018).

- ❖ Domain *Eucaryota* Chatton, 1925 - eucaryotes
- ❖ Kingdom *Chromista* Caval.-Sm. (1981) - chromists
- ❖ Subkingdom *Harosa* Cavalier-Smith, 2010
- ❖ Infrakingdom *Halvaria* Cavalier-Smith, 2010
- ❖ Superphylum *Alveolata* Cavalier-Smith, 1991
- ❖ Phylum *Mioza* Cavalier-Smith, 1987
- ❖ Subphylum *Myzozoa* Cavalier-Smith & Chao, 2004
  - Infraphylum *Apicomplexa* Levine, 1970
  - Superclass *Sporozoa* Leuckart, 1879
  - Class *Gregarinomorpha* Grassé, 1953
  - Subclass *Cryptogregarina* Cavalier-Smith, 2014 [monotypic]
    - Order *Cryptogregarida*<sup>T</sup> Cavalier-Smith, 2014 [monotypic]
    - Family *Cryptosporidiidae* Léger, 1911 [monotypic]
    - Genus *Cryptosporidium*<sup>T</sup> Tyzzer, 1907

Genomik ve biyokimyasal veriler, *Cryptosporidium*'un apicoplast organelleri ve plastid ve mitokondri genomlarını kaybederek diğer apicomplexanlardan ayrıldığına işaret eder (Zhu ve Guo, 2014). Karakteristik olarak *Apicomplexa* türleri konak spesifitesi, endojen safha konumu ve morfolojisi ile tanımlanmaktadır. *Cryptosporidium* spp. ise genel olarak konak spesifite çeşitliliği ve ookist morfolojisinin diğer *Apicomplexalara* göre daha küçük, yani 4-6 µm çapında küresel ile daha büyük 7-5 µm çapında daha oval skalasında değişim göstermesi ile ayırt edilir (Chalmers ve Katzer, 2013).

*Cryptosporidium* diğer tüm coccidianlardan kendine has bazı özellikler ile ayrılır;



1) *Cryptosporidium*'un konak hücre içindeki yerleşimine baktığımızda endojen gelişim aşamalarının konak hücrenin apikal yüzeylerinde toplanmış olduğunu görürüz (intraselüler ekstrasitoplazmik yerleşim).

2) Parazitin konak hücreye tutunması, konak hücreden besinleri almayı kolaylaştırmak için, parazitofor vakuolün tabanında besleyici organel ya da multi membranlı tutunma olarak şekillenmiştir.

3) Ookistlerin kalın ve ince cidarlı olmak üzere iki morfo-fonksiyonel tipi vardır. Bunlardan ince cidarlı olanlar enfekte olmuş konakta otoenfektif döngüyü başlatmaktadır.

4) Küçük boyutlu ookistin içinde sporokist, mikrofil ve polar granüller gibi morfolojik yapılar bulunmamaktadır.

5) Bugüne kadar test edilmiş tüm anti-coccidial ajanlara karşı dayanıklıdır.

6-) Gregarin yaşam döngüsünde bulunanlara benzer yeni gamont benzeri hücre dışı aşamaların varlığı anti-cryptosporidial monoklonal antikorun gregarinlerle çapraz reaksiyonu sonucunda gözlemlenmiştir.

Moleküler çalışmalar *Cryptosporidium*'un coccidianlardan ziyade ilkel/basit apicomplexan gregarine parazitleriyle daha yakın bağlantılı olduğunu göstermiştir. Yakın zamanda *Cryptosporidium* ile *Ascogregarina taiwanensis* arasında yapılan karşılaştırmalı genom analizi bu filogenetik bağlantıyı desteklemektedir.

Buna rağmen *Ascogregarina* ve *Cryptosporidium* aynı zamanda bir çevresel ookist aşaması, Tip I yağ asiti ve poliketit sentetik enzimler ve bir dizi korunmuş hücre dışı protein yapılanması gibi metabolik yolların dahil olduğu *Coccidia* türleriyle birleştiren özelliklere de sahiptir.

Diğer gregarin parazitlerinin gelecek genomik araştırmalarında, *Cryptosporidium* cinsinin daha doğru taksonomik yerleşiminin net bir şekilde anlaşılacağı düşünülmektedir (Ryan ve Hijjawi, 2015).

Gregarinlerdekine benzer yeni gamont benzeri gelişim aşamalarının ileri karakterizasyonu da *Cryptosporidium*'un kontrolü açısından önemli olan çevresel ekolojisinin anlaşılmasına katkı da sağlayacaktır (Barta ve Thompson, 2006). Ayrıca, *Cryptosporidium* ve gregarinler arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması, *Cryptosporidium*'un patogenezi, epidemiyojisi, tedavisi ve kontrolünün araştırılması yeni yaklaşımlara yol açacaktır.

Bilinen en güncel haliyle geçerli olan 28 tür Çizelge (1.2) 'de belirtilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Bilinen *Cryptosporidium* türleri (Šlapeta, 2013; Ryan ve Hijjawi, 2015).

<b><i>Cryptosporidium</i> Türleri</b>	
<b>Kuşlar</b>	<i>Cryptosporidium meleagridis</i> , <i>Cryptosporidium baileyi</i> ve <i>Cryptosporidium galli</i>
<b>Memeliler</b>	<i>Cryptosporidium muris</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium pestis</i> , <i>Cryptosporidium wrairi</i> , <i>Cryptosporidium felis</i> , <i>Cryptosporidium andersoni</i> , <i>Cryptosporidium canis</i> , <i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>Cryptosporidium suis</i> , <i>Cryptosporidium bovis</i> , <i>Cryptosporidium fayeri</i> , <i>Cryptosporidium macropodum</i> , <i>Cryptosporidium ryanae</i> , <i>Cryptosporidium xiaoi</i> , <i>Cryptosporidium ubiquitum</i> , <i>Cryptosporidium cuniculus</i> , <i>Cryptosporidium tyzzeri</i> , <i>Cryptosporidium viatorum</i> , <i>Cryptosporidium scrofarum</i> ve <i>Cryptosporidium erinace</i>
<b>Amfibiler</b>	<i>Cryptosporidium fragile</i>
<b>Sürüngenler</b>	<i>Cryptosporidium serpentis</i> ve <i>Cryptosporidium varanii</i>
<b>Bahıklar</b>	<i>Cryptosporidium molnari</i> ve <i>Cryptosporidium huwi</i>

Moleküler epidemiyolojik çalışmalara göre insan içeren en az iki farklı yaşam döngüsü bulunmaktadır. Bu çalışmalar parazitin başta konağa uyum sağlamış gibi görünen türlerinin bir dizi farklı bulaşma döngüsü olduğunu göstermektedir. *Cryptosporidium parvum*'un insan ve sığır genotipinden elde edilen bu kapsamlı moleküler bilgi ve bu iki morfolojik olarak benzer yapıların artmakta olan biyolojik verilerinin birleşmesinin sonucu olarak antropotik insan genotipi "*Cryptosporidium hominis*" adı altında son dönemlerde farklı bir tür olarak kabul edilmektedir (Olson vd., 2004).

Sığırlarda *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* ve *Cryptosporidium andersoni* olmak üzere dört tür bulunmuştur. Bunlardan sadece *C. parvum* yeni doğan buzağılarda ve altı haftadan büyük sığırlarda görülen klinik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Thomson vd., 2017). Yaşa bağlı dağılım gösterme eğilimi olan *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri süttten kesilmiş buzağuların ince bağırsaklarını enfekte etmektedir. *Cryptosporidium andersoni* ise buzağılardan çok yetişkin sığırların abomasumunu enfekte etmektedir (Şimşek, 2011; Thomson vd., 2017).

## 1.2. Morfoloji

Apicomplexa alt şubesine bağlı olan *Cryptosporidium*, bu şubenin diğer üyeleri ile ortak morfolojik karakterler ve yaşam döngüsü özelliklerini paylaşmaktadır (Tetley vd., 1998; Borowski vd., 2009). Bu parazitler buldukları alt şube de ayırt edici olarak kabul edilen çeşitli morfolojik özellikler göstermektedirler. Uzunlamasına bir şekle ve belirgin apikal bölge özelleşmesine sahiptirler (Morrissette ve Sibley, 2002). Farklı özelliklerinin bir çoğu, apikal kompleks olarak adlandırılan benzersiz organellerin bir koleksiyonunu oluşturmaktadır (Morrissette ve Sibley, 2002). Bu organeller;

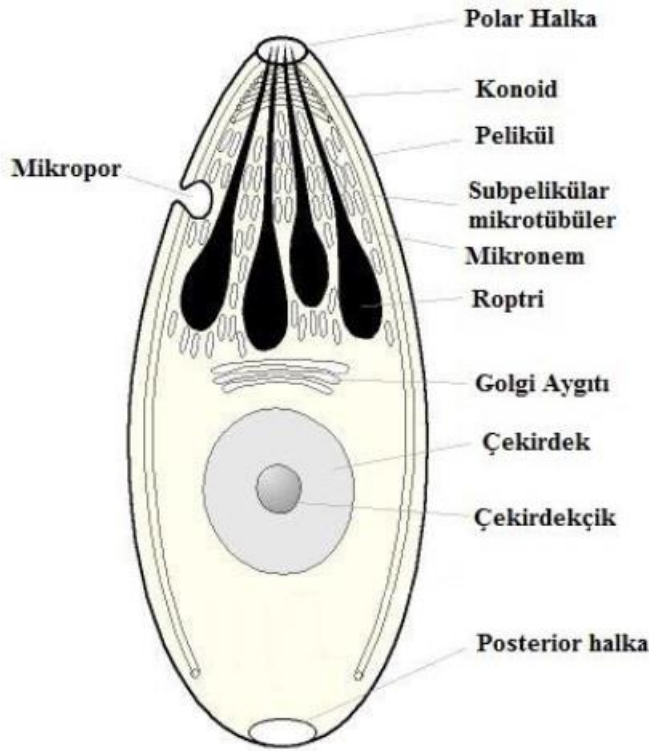
- 1) Polar halkalar ve Konoid
- 2) Roptriler ve Mikronem
- 3) Yoğun granüller
- 4) Pelikül (ör: iç membran kompleksi)
- 5) Mikroporlardır (Şlapeta ve Morin-Adeline, 2011).

### 1.2.1. Polar halkalar ve konoid

Konoid, tanımlanamayan filamentlerin spiral şeklini almasıyla oluşan, küçük, koni şekilli bir yapıdır. Konak hücrelerin istilasında mekanik bir rol aldığı düşünülmekte ve sadece bazı apicomplexanlarda bulunmaktadır (Morrissette ve Sibley, 2002). Polar halkaları, pelikülün iç membran tabakasından oluşmaktadır. Genelde bir adet bulunmasına karşılık bazı cinslerde iki veya üç adet olduğu da rapor edilmiştir. Mikrotübüller ise polar halkaya bağlıdır. Fonksiyonu tam olarak bilinmese de konoidin hareketinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Scholtyseck, 1979).

### 1.2.2. Roptriler ve mikronem

Roptriler ve Mikronemler, motilite, konak hücrelere yapışma, konak hücrelerin istilası ve parazitofor vakuol oluşması için gereken ürünleri içeren benzersiz salgı organelleridir (Morrissette ve Sibley, 2002). Roptrilerin sayıları yaşam döngülerine ve türlere göre değişmektedir. *Cryptosporidium* sporozoitleri sadece bir tane bulunduğu rapor edilmiştir. Roptriler yoğun granüllü madde içeren, membrana bağlı organellerdir. Mikronemler ise roptrilere yoğun granüllü madde içermeleri ve membrana bağlı olmaları bakımından benzerler de daha küçük, iğsi veya şişe benzeri şekilli ve genellikle sayı bakımından daha fazladır (Blackman ve Bannister, 2001). Mikronemler konak hücreyi tanıma ve ona tutunmada görev alırlar (Mercier vd., 2005).



Şekil 1.1. *Apicomplexa* alt şubesine ait genel morfolojik yapı (Wiser, 2018).

### 1.2.3. Dense granüller

Dense granüller aynı mikronem ve roptriler gibi salgı organelidir. Sayı bakımından, tür ve üreme aşamalarında boyut ve şekil bakımından çeşitlilik gösteren yoğun granül içeriğine sahip zarlı veziküllerdir. Enine elektron mikrografik kesitlerde mikronem ve roptrilerle kolayca karıştırılabilirler (Blackman ve Bannister, 2001). Dense granüller, parazitin çoğaldığı konakta parazitofor vakuol olgunlaşmasında görev alırlar (Mercier vd., 2005).

### 1.2.4. Pelikül

Sporozoit, merozoit gibi hareketli evrelerin hücre çeperleri (pelikülleri), bir plazmalemma (dış zar) ve birbirine sıkı bir şekilde bağlı iki ünite zar yapısına sahip iç membran tabakasından oluşmaktadır. (Scholtyseck, 1979) Plazma zarı bütün hücreyi kapsayan kesintisiz bir yapı gösterirken iç membran kompleksi, plazma zarının hemen altında bulunmakta ve parazitin hem ön hem de arka kısımlarında kesintiye uğramış, düzleşmiş sisternaların birleşiminden oluşmaktadır (Scholtyseck, 1979; Mercier vd., 2005). İç membran tabakası endoplazmik retikulumdan köken alır. Polar halkalardan köken alan peliküler mikrotübüller ise

*Apicomplexa*'nın birçok yaşam döngüsünde hücre çeperinin altında yer alır. Mikrotübüllerin sayısı buldukları cins ve türe özgüdür (Scholtyseck, 1979).

### 1.2.5. Mikroporlar

Mikroporlar, *Apicomplexa*'nın neredeyse bütün gelişim evrelerinde mevcuttur ve pelikülden köken alırlar. Beslenme mikroporlar aracılığıyla sağlanır (Scholtyseck, 1979).

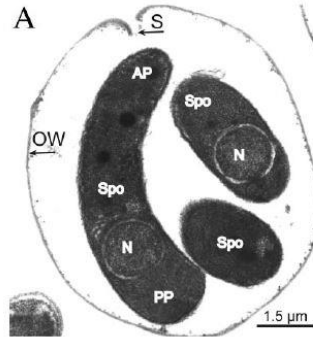
*Cryptosporidium* türleri mide ve bağırsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarında, ekstrasitoplazmik alanda yerleşim göstermesi nedeniyle diğer hücre içi protozoonlardan ayrılırlar. Parazitin yerleştiği ve konak hücreden köken alan bu alana "parazitifer vakuol" adı verilir (Hazer, 2007; Şimşek, 2011). *Cryptosporidium*'un parazitifer vakuölü, intraselüler olarak düşünülmesine rağmen ekstrasitoplazmik kalması açısından yani başka bir deyişle epitelyal hücrelerin üstünde konak kökenli parazitifer vakuol zarı içindeki konumunu koruması nedeniyle benzersizdir (O'Hara ve Chen, 2011). Parazitifer vakuol, parazit ile konak hücre arasında bağ oluşmasına neden olur ve bu bağ sayesinde parazitin, konak hücre teması gerçekleşir (Fayer, 2008b). *Cryptosporidium* türlerinin boyutları tür bazında ve üreme safhalarında değişim göstermektedir.

### 1.3. Yaşam döngüsü

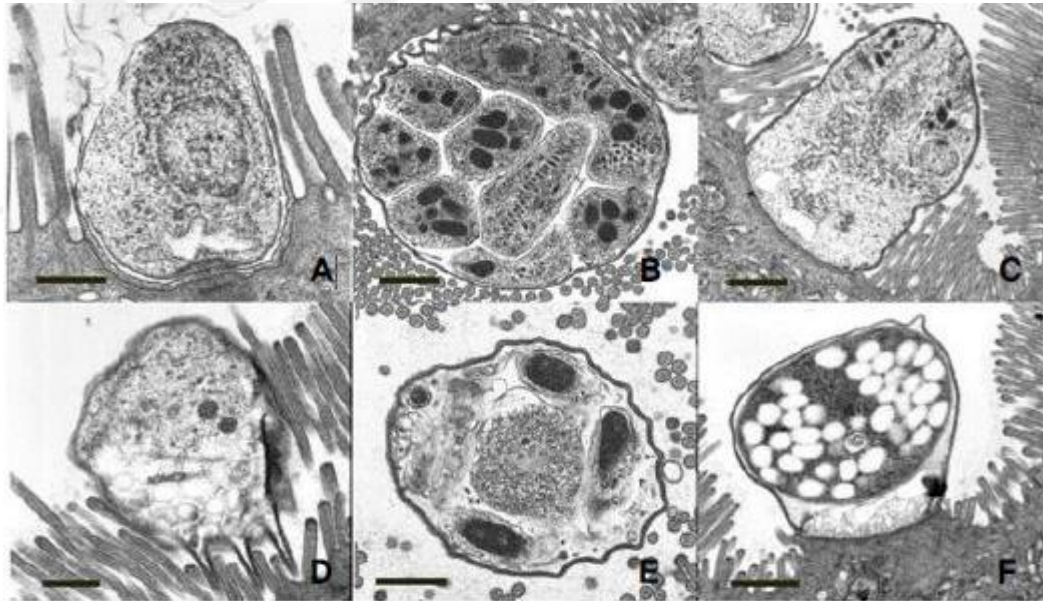
*Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü, enfekte konağın dışkı ile dış ortamda yayılan sporlanmış ookistlerin uygun konaklar tarafından solunum veya ağız yoluyla alınmasıyla başlar (Fayer ve Ungar, 1986; Thompson vd., 2005). Sporlanmış ookist sadece konak dışı safhada (eksojen safha) bulunur. Dış ortama dayanıklı ookist duvarı ile çevrilidir. Dışkı, mukus gibi yollarla dış ortama atılan sporlanmış ookistler 2-6µm çapında kalın duvarlı yapıya sahip olup, içlerinde 4 adet sporozoit bulundurlar (Şimşek, 2011; İtik-Ekinci, 2012). Diğer coccidian parazitlerden farkı ookistlerin içerisindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistleri yoktur (Fayer vd., 2008a; Şimşek, 2011). Sporozoitler 5,2 x 1,2 µm çapında virgül şeklinde, ince cidarlı ve hareketli yapılardır (Thompson vd., 2005; Fayer, 2008b). Uygun konağa ağız yoluyla alınan bu ookistler sindirim veya solunum sistemi içinde eksiste olur ve enfektif sporozoitleri serbest bırakır (Reduker ve Speer, 1985; Thompson vd., 2005).

Sindirim sisteminde serbest kalan sporozoitler, hızlı bir şekilde ince bağırsak epitel hücrelerini işgal eder ve burada yaşam döngüsünün konak içindeki safhasını (endojen safha) başlatır (Current ve Reese, 1986; Thompson vd., 2005). Sporozoitler dairesel şekil alarak tek çekirdekli trofozoit yapısına dönüşür. Trofozoitler 2-2,5 µm çapında yuvarlak veya oval yapı göstermekte olup sporozoit ve merozoit arasında bir geçiş formudur (Thompson vd., 2005; Şimşek, 2011; İtik-Ekinci, 2012). Trofozoit içerisindeki çekirdek merogoni (şizogoni) vasıtasıyla

bölünerek 6-8 çekirdek meydana getirir ve bunların her birinden 6-8 merozoit oluşur. Bu bölünme parazitin eşeysiz (aseksüel) bölünme aşamasıdır. Merozoitleri taşıyan hücreye meront (şizont) denir. Genel olarak iki tip meront tanımlanmıştır. Ancak *C.parvum*' da 2 tip meront bulunurken *C. baileyi*' de 3 tip meront bulunmaktadır (Thompson vd., 2005; Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012). Tip I merontların her biri 8 adet merozoit taşır ve olgunlaştıklarında parazitofor vakuollerinden merozoitler serbest kalır ve yeni hücreleri enfekte ederler. Tip I merontların çatlaması sonucu serbest kalan Tip I merozoit yapıları oval veya yarım ay şeklinde yaklaşık 1,5 µm çapındadırlar (Thompson vd., 2005; Fayer, 2008b; İtik-Ekinci,2012). Enfekte ettikleri hücrelerde yeni bir merogoni (şizogoni) başlatırlar ve Tip I meront veya Tip II meront a dönüşürler (Şimşek, 2011; İtik-Ekinci, 2012). Tip II merontlar 4 adet, 2-3,5 µm sivri şekilli ya da 1,5-1,6 µm pleomorfik şekilli Tip II merozoitleri oluşturular. Bu tip II merozoitler, serbest kaldıktan sonra gametlerin oluşmasına yani parazitin yaşam döngüsünde ki eşeyli fazın (gametogoni) başlamasına neden olur (Thompson vd., 2005; Şimşek, 2011; İtik-Ekinci, 2012). Tip II merontlardan serbest kalan merozoitler, Tip I merontlardan serbest kalan merozoitler gibi yeni bir merogoni döngüsü başlamasına neden olmaz, farklı konak hücrelerinin içine girdikten sonra makro ve mikrogamontlara dönüşürler. Tip II merozoitlerin başka hücrelere girmesiyle başlayan eşeyli çoğalma döneminde 4-5 µm çapında dairesel şekilli mikrogamontlar ve iki kat zara sahip, 3,2-5 µm çapında makrogamont formları bulunur (Thompson vd., 2005; Fayer, 2008b). Mikrogamontların her birinden 14-16 kamçısız, 1,6-2,2 µm çapında hareketli sperm hücreleri mikrogamet, makrogamontların her birinden yalnızca bir adet 4-6 µm büyüklüğünde makrogamet oluşur ve mikrogamet mikrogamet ile birleşmesiyle zigot oluşur (Current ve Reese, 1986; Thompson vd., 2005; Hazer, 2007; Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012).



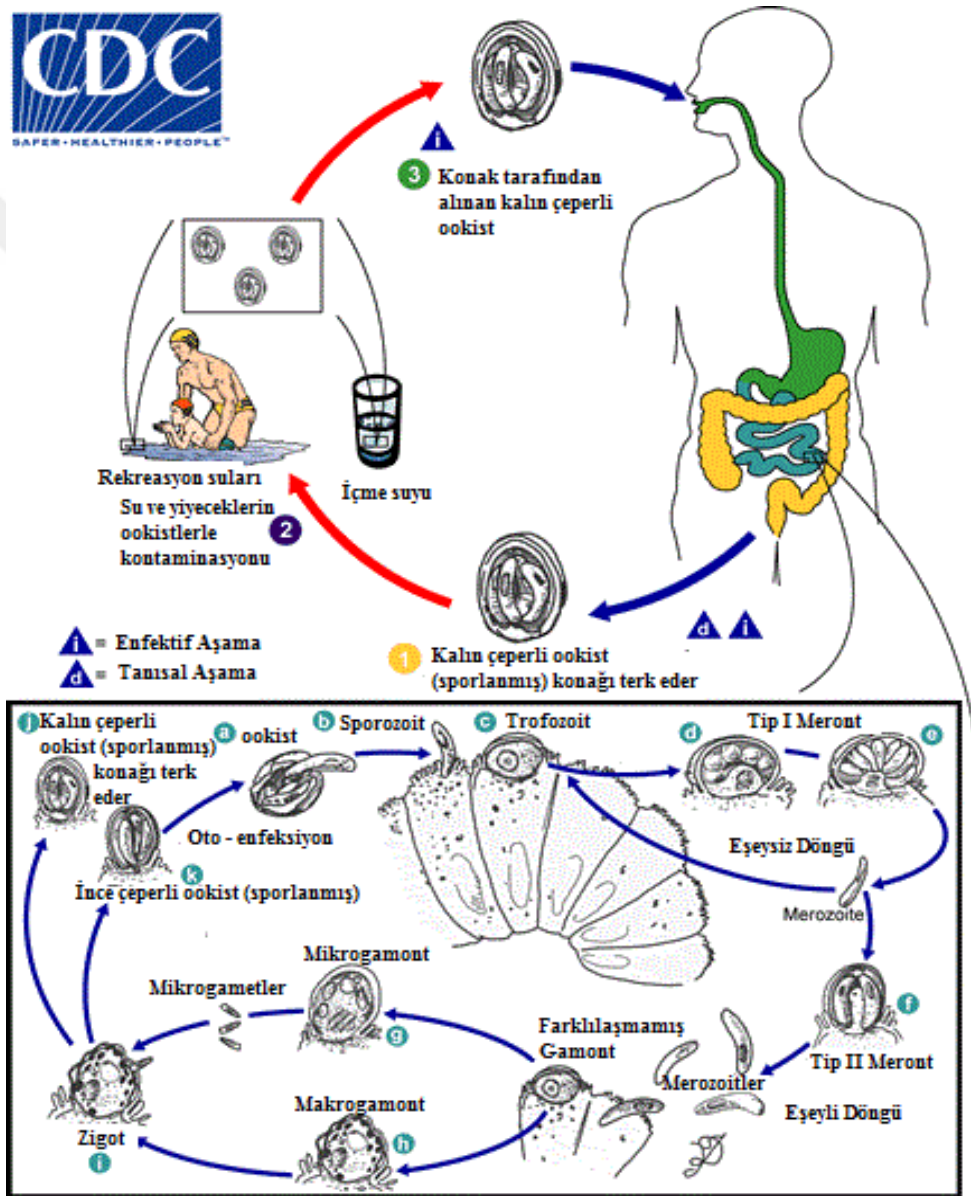
**Şekil 1.2.** Ekskiste olmamış dört sporozoitli *Cryptosporidium parvum* ookistinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü. Dört sporozoitten 3 tanesi görünür halde, bunlardan biri boylamsal düzlemde diğer ikisi ise transversal düzlemde konumlanmaktadır. OW, Hücre duvarı; Spo, Sporozoit; N, Çekirdek; S, Yarık; AP, Ön Kutup; PP, Arka Kutup (Snelling vd., 2007).



**Şekil 1.3.** *Cryptosporidium parvum*'un çeşitli gelişim aşamaları; A- Genç trofozoit B- Tip I Meront C- Endopoligeni gösteren meront D-Makrogametosit E- Mikrogametosit F- Olgunlaşmamış ookist (Yu, 2010).

Zigotun etrafı, üç katlı ookist cidarıyla çevrilidir. Döllenen makrogametlerden olgunlaşmamış ookistler oluşur (Fayer, 2008b; Şimşek, 2011; İtik-Ekinci, 2012). Olgunlaşmamış ookistlerin gelişmesiyle içerisinde enfektif dört adet sporozoit oluşur. Sindirim sistemindeki ookistler dışkı ile dışarı atılırken, solunum sistemindeki ookistler solunum ve nazal akıntılarla konağı terk eder (Fayer, 2008b; İtik-Ekinci, 2012). Sindirim sisteminde bulunan ookistlerin %80

kalın cidarlı olup konaklar arasında bulaşmada rol oynarken, geri kalan %20 oranındaki ince cidarlı ookistler konağı terk etmeden bağırsak boşluğunda açılır. Serbest kalan sporozoitler yeni hücrelere girerek enfeksiyonun devam etmesine neden olur. Buna oto-enfeksiyon adı verilir (Thompson vd., 2005; Hazer, 2007; Fayer, 2008b; İtik- Ekinci, 2012 ). Oto enfeksiyon, eşeyli ve eşeysiz çoğalmanın aynı konak üzerinde fekal-oral yol ve ara konak olmadan kesintisiz bir şekilde enfeksiyonun devam etmesidir (Thompson vd., 2005; Hazer, 2007; Fayer, 2008b).



Şekil 1.4. *Cryptosporidium* yaşam döngüsü (CDC, 2015a).



## 1.4. *Cryptosporidium*-Konak İlişkisi

### 1.4.1. *Cryptosporidium*'un virülans faktörleri

*Cryptosporidium* enfeksiyonun başlaması, yerleşimi ve devam etmesinden sorumlu faktörleri tanımlamak adına çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Cryptosporidium* normal bir şekilde sistematik enfeksiyona neden olmak ya da derin dokuya nüfuz etmek yerine bağırsak epitelinin üst yüzeyindeki hücre zarı bölmesinde kendine yer edinir. Böylece bağırsağın emilim ve salgılama işlevlerinde önemli anormalliklere neden olur. Bu hasar, komşu epitel hücreleri etkilemesiyle doğrudan veya yangı hücreleri ve sitokinlerin enfeksiyon bölgesine dahil olmasıyla dolaylı gerçekleşebilir. Virülans faktörler, parazitin konakta başlattığı ve hastalığı devam ettirdiği süreçler ve maddeler olarak düşünülür. Bu faktörler, yaşam döngüsü boyunca parazitin vücuda girip öldüğü veya döngüsünü tamamlayıp çıkana kadar geçen herhangi bir zaman diliminde konağa etki edebilir (Bouزيد vd., 2013).

Bugüne kadar, *Cryptosporidium*'a özgü virülans faktörler, gerek konağa verdikleri zararı kesin bir şekilde ortaya koyma bakımından gerekse delesyon ve inaktivasyon sonuçlarının konakta hastalık şiddetinin azalması ile ilişkisini kanıtlama noktasında karakterize edilmemişlerdir. Bunun nedeni ise *Toxoplasma* ve *Plasmodium* gibi diğer Apicomplexan parazitlerde uygulanan in vitro kültür ve reverse genetik tekniklerinin *Cryptosporidium* söz konusu olunca daha zor olmasındandır (Bouزيد vd., 2013).

*Cryptosporidium* için varsayılan virülans faktörler, eksistasyon, kayma motilitesi, bağlanma, invazyon, parazitofor vakuol oluşumu, hücre içi bakım ve konak hücre hasarını da içeren, konak epitel hücreleri ile *Cryptosporidium* ookistleri ve sporozoitlerinin başlangıç etkileşim süreçlerine dahil olan genler olarak tanımlanmıştır (Bouزيد vd., 2013).

#### Adherens faktörü

Enfeksiyon oluşumundaki parazitin konak hücreye tutunması kritik bir başlangıç aşamasıdır. İki sınıf protein, yani müsin benzeri glikoproteinler ve trombospon ile ilişkili adheziv proteinler karakterize edilmiş ve adhezyona aracılık yaptığı gösterilmiştir. Bu proteinlerin özellikleri Çizelge 1.3'te özetlenmiştir (Bouزيد vd., 2013).

#### Hücresel hasar

Tek katmanlı enterositlerdeki hücre hasarı, sıkı hücre bağlantılarının dağılımı, bariyer işlevinin kaybı, laktat dehidrogenaz salınımı ve artmış hücre ölüm oranları ile belgelenmiştir *Cryptosporidium* enfeksiyonu esnasındaki hücre hasarına neden olan mekanizmalar

bilinmemektedir. Bununla birlikte fosfolipazlar, proteazlar ve hemolizinler gibi birkaç molekül doğrudan hasara neden olabilir (Bouzid vd., 2013).

**Çizelge 1.3.** Moleküler ve immünolojik yöntemlerle tanımlanan olası *Cryptosporidium* virülans faktörleri (Bouzid vd., 2013).

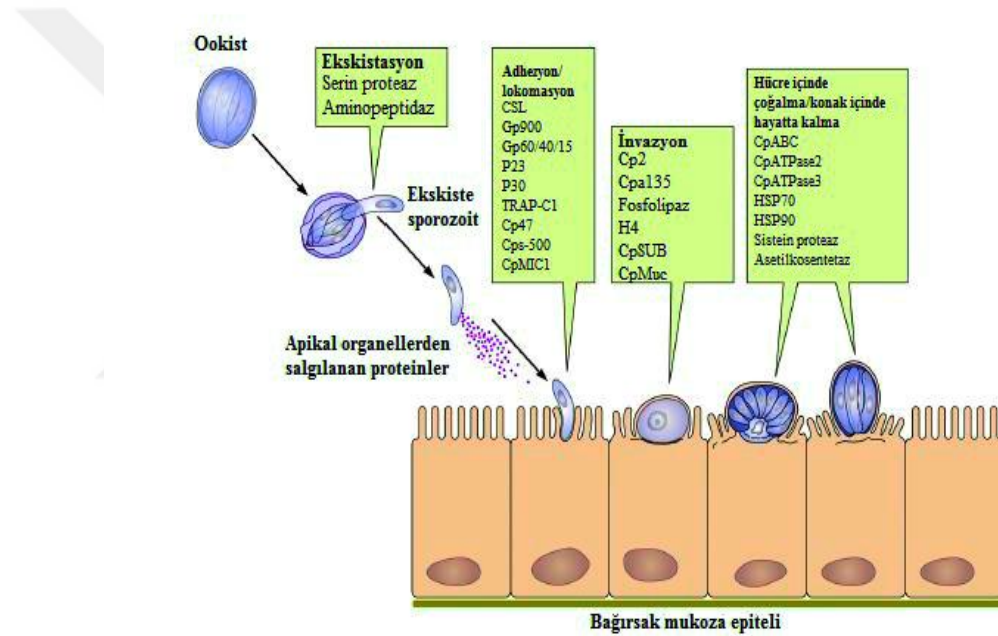
Virülans Faktör	Olası Fonksiyonu
Serine protease	Ekskistasyon
Aminopeptidase	Ekskistasyon
CSL	Adhezyon
gp900	Adhezyon
gp60/40/15	Adhezyon
P23	Adhezyon. Lokomasyon
P30	Adhezyon
TRAP-C1	Adhezyon, lokomasyon
Cp47	Adhezyon
CPS-500	Adhezyon, lokomasyon
Cp2	İnvazyon, zar bütünlüğü
Cpa135	İnvazyon
Secretory phospholipase	İnvazyon, hücre içi yerleşim
Hemolysin H4	Zar lizisi
CpABC	Taşıma, besin taşınımı
CpATPase2	Biyomembran, ağır metal taşıyıcısı
CpATPase3	Biyomembran, iyon veya fosfolipid taşıyıcısı
HSP70	Gerilim koruması
HSP90	Gerilim koruması
CpPKS1	Bilinmeyen işlev
Cysteine protease	İmmün/sitokin modülasyonu
Acetyl cosynthetase	Yağ asitleri metabolizması
CpSUB	İnvazyon
CpMIC1	Adhezyon, lokomasyon
CpMuc	İnvazyon

### Isı-şok proteinleri

Isı şoku proteinleri, korunmuş büyük bir protein ailesidir. Genellikle yaygın olarak bilinen HSP65 ve *Cryptosporidium* cinsi için HSP90 ve HSP70 protein ailelerinin görünür moleküler ağırlıkları sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tanımlanır (Bouzid vd., 2013). Isı-şok proteinlerinin sentez seviyesi, özellikle HSP70'in, stres durumlarında keskin bir şekilde artmaktadır. Bu gibi durumlara ani sıcaklık değişimi, besine ulaşılabilirlikte azalma ve immün ataklar neden olur. Isı şok proteinleri diğer proteinler için hücre içi şaperonlar olarak görev alır; protein-protein etkileşiminde önemli bir rol oynar ve yeni oluşan proteinlerin taşınması, katlanması, birleştirilmesi, biyosentezi ve salınmasını kolaylaştırır. (Okhuysen ve Chappell, 2001)

## Koşula bağlı genler

Esas olarak hücre için gerekli olan temel fonksiyonları daimi olarak yerine getiren housekeeping genlerine karşılık koşula bağlı genler yüksek derecede çeşitlidir. Koşula bağlı genler, viral, bakteriyel, fungal ve protozoan patojenlerinde dahil olduğu patojenik mikroplar içinde yaygındırlar (Bouزيد vd., 2013). Bu genler, genomdaki diğer bütün genlerin sahip olduğu spontane rekombinasyon oranından daha yüksek oranlara sahiptir. Bu mutasyonal olaylar konak içinde hayatta kalmaya ve üremeye ve hızlı fenotip değişimlerine olanak verir. Ökaryotik patojenlerde, koşula bağlı genler sık sık telomerler ile ilişkilendirilir (Barry vd., 2003).



**Şekil 1.5.** Konak epitel hücreleri ile *Cryptosporidium* ookistleri ve sporozoitlerinin başlangıç etkileşim süreci ve bu süreci yöneten virülans faktörler (Bouزيد vd., 2013).

### 1.5. Tarihçe

Dünya çapında bulunan bu protozoan parazit, ilk olarak 1895 yılında Clarke tarafından laboratuvar farelerinin mide bez epitelini üzerinde bulunan spor topluluğu olarak rapor edilmiştir (Current ve Garcia, 1991). 1907 yılında ise Amerikalı parazitolog Ernest Edward Tyzzer tarafından betimlenen bu küçük coccidian parazit *Cryptosporidium* adını verdiği yeni bir cinse dahil edilmiş ve *Cryptosporidium muris* türü olarak yayınlanmıştır. Tyzzer'in bu cinse "gizli sporokist" anlamına gelen *Cryptosporidium* adını vermesini sebebi, bilinen coccidiaların aksine bu parazitin ookistleri sporozoitlerinin etrafında sporokist bulundurmamasından ileri gelmektedir (Current ve Garcia, 1991).

Tyzzer, 1910 yılında *C. muris*'in yaşam döngülerinin birçok aşamasını tanımlamış ve 1912 yılında laboratuvar faresinin ince bağırsağında bulunduğu, daha küçük ookistlere sahip yeni türü ise *Cryptosporidium parvum* olarak isimlendirmiştir (Xiao vd., 2004; Fayer, 2008b; Fayer, 2010; İtik-Ekinci,2012). 1929 yılında, Tyzzer, tavukların sekum epitelindeki *Cryptosporidium* türlerinin *C.parvum*'la aynı olduğunu raporlamıştır. 1955 yılında Slavin tarafından, hindilerde, bilinen *Cryptosporidium* türleri arasında ilk defa hastalık ve ölüm sebebi olan *Cryptosporidium meleagridis* yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (Fayer ve Ungar, 1986; Hazer, 2007; Fayer, 2008b).

İshalli buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin teşhisi ilk olarak Panciera ve arkadaşları (1971) tarafından kronik zayıflama, dehidrasyon ve ishal görülen bir buzağıda tespit edilmiş olup bu enfeksiyonun buzağılarda ilk defa *Cryptosporidium* alt türlerinin hastalık ve ölümle ilişkili olabileceğini göstermiştir (Panciera vd., 1971; Spano ve Crisanti, 1999; İtik-Ekinci, 2012). İkinci defa ise, Meuten ve arkadaşları (1974), iki haftalık bir buzağı nekropsisinde ileum ve kolonlarda görülen lezyonların incelemeleri sonucu farklı gelişim aşamalarında olan *Cryptosporidium* gözlemlenmişlerdir (Burgu, 1984; Santín ve Trout, 2008). İlk defa 1976' da iki grup tarafından insanlarda iki ayrı cryptosporidiosis vakası rapor edilmiştir. Bu ilk iki vakadan biri 3 yaşındaki bir çocuk diğzerinin ise 39 yaşında bağışıklık sistemi baskılanmış bir şahıs olduğu belirtilmiştir. AIDS epidemisinin 1983 yılında başlamasıyla birlikte *Cryptosporidium* özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde hayat tehdit eden bir parazit olarak kabul edilmeye başlamıştır. Bu durum ABD'de bu parazitin özellikle insanlar açısından öneminin kavranmasına neden olmuştur (Tzipori ve Ward, 2002; Hazer, 2007; Nichols, 2008; İtik-Ekinci, 2012).

*Cryptosporidium*'un halk sağlığı problemi olarak tanınmasına neden olan, 1993 yılında ABD'de 403.000 kişiyi etkileyen ve su kaynaklı bilinen en büyük salgın Milwaukee/Wisconsin'de görülmüştür (Mac Kenzie vd., 1994; Nichols, 2008; İtik-Ekinci, 2012).

Türkiye'de ise buzağılarda *Cryptosporidium* varlığı ile ilgili ilk çalışma Ayşe Burgu tarafından 1984 yılında yapılmıştır (Burgu, 1984).

## 1.6. Epidemiyolojisi

Sığırlarda görülen *Cryptosporidium* enfeksiyonunun epidemiyolojisinde birkaç önemli faktör bulunmaktadır. Bunlar;

1. *Cryptosporidium* ookistleri son derece dayanıklıdır ve ekstrem şartlarda hayatta kalabilmektedir ve ayrıca güvenli seviyelerde kullanılan dozlarda uygulanan dezenfektanlara da dayanıklıdır.

2. Sahip oldukları küçük ookist boyutları kontamine sulardan filtre edilmelerini zorlaştırır.
3. Enfektif dozu düşüktür ve insanlara hastalığın bulaşabilmesi için sadece dokuz ookistin yeterli olduğu kanıtlanmıştır. Buzağılarda bu sayı 50 ookist olarak bildirilmiştir. Buna karşılık enfekte konak  $10^{10}$  kadar ookist atabilir.
4. Sporlanmış ookistler, dış ortama bırakıldığında enfektif formdadırlar. Bu durum yeni konağın sporlanmış ookisti aldığı anda enfekte olacağına işaretir.
5. Zoonotik bulaşma doğrudan kontak ya da kontamine olmuş su, yiyecek, eşya veya yüzeyler vasıtası ile kolayca gerçekleşebilir (Silverlås, 2010).

### 1.6.1. Sığırlarda epidemiyoloji

*Cryptosporidium* enfeksiyonunun sığırlardaki yayılımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu enfeksiyon dünya çapında bulunmakta olup raporlanan yayılım oranları %0-100 aralığında ve örnek alınan hayvanların yaş aralığına göre değişim göstermektedir. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarda genel olarak en önemli riski yaş dağılımıdır. Enfeksiyonun yaş arttıkça daha az görüldüğü bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar enfeksiyonun 21 günlük buzağılarda %92 oranında görüldüğünü ve bir sürü içinde cryptosporidiosis görülüyorsa bu sürüde ki bütün buzağuların süttten kesilmeden enfeksiyonu kapabileceklerine işaret etmektedir. Mikroskopik bakıya dayalı eski çalışmalar muhtemelen süttten kesilmiş buzağılardaki *C. parvum* yayılımını olduğundan fazla tahmin etmektedir. Günümüzde moleküler yöntemeye dayalı çalışmalar bu türün süttten kesilmiş buzağılarda daha nadir olduğunu göstermiştir. Bunun yerine *C. parvum* benzeri tür olan *C. bovis* ve *C. ryanae*, *C. andersoni* ile baskın olup, *C. bovis* genç sığırlarda daha çok görülürken *C. andersoni* yetişkin sığırlarda daha yaygındır. Yetişkin hayvanlarda yaşa bağlı intestinal mukozanın olgunlaşması ile oluşan dayanıklılık nedeniyle subklinik enfeksiyon ve düşük seviyede seyreden *Cryptosporidium* yayılımı görülür (Silverlås, 2010; Arslan, 2012).

**Çizelge 1.4.** Türkiye'deki *Cryptosporidium* vakalarının dağılımı tablosu (Berger, 2017).

Yıl	Bölge	Çalışma Grubu	%	Açıklama
2008*	Van	Sığır	13,19	%13,9 Van Yöresindeki buzağılarda
2008*	Erzurum	Sığır	%22,8	%22,8 Erzurum Yöresindeki buzağılarda
1999*		Çocuklar	3,5	%3,5 diyareli çocuklarda
2002*		Çocuklar	4	%4 çocuklarda asemptomatik
2004-2006	Van	Çocuklar	4,9	%4,9 diyareli çocuklarda
2007*	Mersin	Çocuklar	5,5	%5,5 çocuklarda asemptomatik
2008*		Çocuklar	12,35	%12,35 1-14 yaş arası lenfoma veya lösemi hastası çocuklarda
2009*	Mersin	Çocuklar	2,8	%2,8 sosyal hizmet merkezindeki çocuklarda
2012*	Mersin	Çocuklar	13,3	%13,3 ishali çocuklarda
2013*	Şanlıurfa	Çocuklar	0	Şanlıurfa'daki yyetimhanedeki çocuklarda

**Çizelge 1.4.** (Devam) Türkiye’deki *Cryptosporidium* vakalarının dağılım tablosu (Berger, 2017).

Yıl	Bölge	Çalışma Grubu	%	Açıklama
2013*	Adana	Mutfak Personeli	0	Adana’daki mutfak personeline
2013*	Van	Mutfak Personeli	1,27	%1,27 mutfak personeline semptomatik
2008-2015		Bağışıklık yetersizliği olan	35	%35 yaygın değişken immün yetersizlik sendromu hastalarında
2008-2015	Malatya	Hastalar	1,5	%1,5 Malatya’daki ishal vakalarında
1995*		Hastalar	17	%17 tümürlü ve ishallerde
2008*	Kocaeli	Hastalar	3,37	%3,37 mide-bağırsak şikayeti olan hastalarda
2008-2009	Adana	Hastalar	5,19	%5,19 ishallerde
2011*	Ankara	Hastalar	0	Acil departmanına getirilen ishallerde
2012-2013	Kocaeli	Hastalar ve diyalize girenler	2,1	%2,1 diyaliz hastalarında
2009*	Kars	Domuzlar	8,8	%8,8 domuz dışkı örneklerinde
2008*		Koyunlar	38,8	%38,8 Kars Yöresi’ndeki kuzularda
2003-2007	Eskişehir	Dışkı numunesi	4,5	%4,5 Oranında parazit, üniversitenin tıbbi
2009-2010	İzmir	Dışkı numunesi	33,47	%33,47 laboratuvarında incelenen dışkı numunelerinde
2006	Ege	Öğrenciler	0,6	%0,6 ilköğretim öğrencilerinde asemptomatik tesisindeki dışkı örneklerinde bulundu
2007*	Ankara	Organ nakli alıcısı	13	%13 ishallerde böbrek veya karaciğer nakledilmiş hastalar
2008*	Van	Çeşitli	1,1-13,2-10,7-8,1	%1,1 kesimhane çalışanlarında, %13,2 koyunlarda, %10,7 keçilerde ve %8,1 sığırlarda
2007-2009	Mersin	Su	5,2	%5,2 Mersin’deki su örneklerinde
2011	Ordu/Sinop	Su	60,3-61,4	%61,4 Ordu ve %60,3 Sinop deniz suyu örneklerinde

Türkiye’de önemi anlaşılmadığı için cryptosporidiosis vakaları çok geç rapor edilmeye başlanmıştır (Berger, 2017). Bu neden çoğu veri ilk raporlandığı yıl olan 2005 yılından sonra olsa da 1999 yılı gibi istisnalar da bulunmaktadır.



Şekil 1.6. 2005 yılı itibariyle rapor edilen Cryptosporidiosis vakaları (Berger, 2017).

## 1.7. Bulaşma Yolları ve Tanı

### 1.7.1. Bulaşma yolları

Enfeksiyonun; su, toprak, hava ve pişmemiş veya enfekte insan ve hayvan dışkıyla temas etmiş çapraz kontaminasyona uğramış gıda yoluyla bulaştığı bilinmektedir (Carpenter vd., 1999; Fayer vd., 2000; Mor vd., 2010; Gormney, 2011; Kelley, 2014). Enfeksiyon etkeni ağız yolu ile alınıp yutulduğunda vücuda girebilmektedir. Özellikle yüzme havuzlarının da dâhil olduğu eğlence amaçlı kullanılan tatlı sular ile düzenli vücut teması olanlar arasında yaygındır (Carpenter vd., 1999; Kelley, 2014).

*Cryptosporidium*' a maruz kalma riski yüksek olan bazı gruplar şunlardır;

- Çocuk bakıcıları
- Enfekte olmuş çocuğun ebeveynleri veya enfekte kişiyle ilgilenmek durumunda kalan insanlar
- Uluslararası seyahat edenler
- Filtre edilmemiş, arıtılmamış su içen dağcılar, kamp yapanlar
- Yüzücülerinde dâhil olduğu kontamine kaynaklardan su içen insanlar

- Enfekte çiftlik hayvanlarıyla ilgilenen veteriner teknisyenleri, çiftlik çalışanları veya hayvan sahipleri
- Cinsel ilişki yoluyla insan dışkısına maruz kalmış insanlar
- AIDS hastaları
- Enfekte evcil hayvan sahipleri (Carpenter vd., 1999; Kelley, 2014; CDC, 2015c).

### Sığırlarda bulaşma yolu ve enfeksiyon

#### *Çiftlik içinde bulaşma*

Genç buzağılar için enfeksiyon kaynağını tespit etmek bulaşma döngüsünü kırmak için önemlidir. Yetişkinlerin *Cryptosporidium parvum* ookisti attığı göz önüne alındığında bulaşma, doğrudan buzağılama/emzirme alanının etrafındaki setler yoluyla ve dolaylı olarak buzağılama alanındaki kontaminasyon yoluyla meydana gelebilir. Pre-patent döneminin 3 gün civarında olduğu düşünüldüğünde, sadece birkaç gün içinde ookistleri atmaya başlayan buzağılara dair kanıtlar vardır. Buzağıdan buzağıya bulaş hem doğrudan hemde kontamine buzağı yaşam alanı yoluyla olmaktadır. Akut olarak enfekte buzağılardan yüksek oranlarda atılan ookistler (pik prevelansı ve atılma yoğunluğu 1-3 haftalıklarda gerçekleşir) ve düşük infeksiyöz doz ve çevrede bulunan dayanıklı yapıya sahip ookistler düşünüldüğünde buzağıdan buzağıya bulaşmanın çok önemli bir bulaşma yolu olması muhtemeldir. İçeride buzağılanan süttan kesilmemiş sürüler, kirlilik birikimi nedeniyle buzağılama mevsimi ilerledikçe, hastalıkta bir artış olduğunu bildirilir. Bireysel ya da gruplandırılmış süt sığırları için yapılan bir çalışma geçici, geçit tarzı buzağı ağıllarının düzenli olarak yer değiştirdiği çiftliklerin, sınırlı sayıdaki sabit, beton ağıllara sahip çiftliklere kıyasla çok daha düşük bir pozitif hayvan prevalansına sahip olduğunu bulmuştur (Hotchkiss vd., 2015). Teoride, buzağılar yetişkin koyun ve geyik gibi diğer hayvanlardan ve kontamine su kaynaklarından da enfekte olabilmektedir. Wells ve arkadaşları (2015), araştırmalarında hassas işleme yöntemleri ile bahsi geçen kaynaklarda *C.parvum* tespit etmiş ancak genç ruminantlar tarafından yoğun bir şekilde atılan ookistlere kıyasla çok miktarda ki ookistlerin yarı-kantitatif değerlendirmesinde riskin düşük olduğu önerilmiştir. Kuzularda yüksek *C.parvum* prevelansı vardır. Enfeksiyon rezervuarı olarak davranabilirler ve çevresel kontaminasyona katkıda bulunurlar (Hotchkiss vd., 2015).

#### *Çiftlikler arası bulaşma*

Moleküler çalışmalar yerel çiftliklerin aynı suşları ya da genotipleri paylaşıp paylaşmadığını tespit edebilir. Teorik olarak, çiftlikler arasındaki bulaşma çiftlik içi hareketler veya ookist atan hayvanların (potansiyel olarak uzun mesafeler üzerinde) satın alınması veya



yerel su şebekeleri, yakın veya ortak otlatma ve serbest dolaşan yaban hayatı yoluyla gerçekleşebilir. Biyogüvenlik ve hayvan alımını kısıtlama göz önüne alındığında, özellikle genç çiftlik hayvanları, hayati önem taşımaktadır. Hayvanları satın alan çiftliklerin birden fazla suş ve genotipik barındırması daha olasıdır. Bu suşların profili kapalı sürüler ile karşılaştırıldığında daha az stabildir. (Brook vd, 2009; Hotchkiss vd., 2015).

### 1.7.2. Tanı

*Cryptosporidium* enfeksiyonunun tanısı, dışkı örneklerinin tinktoryal ve floresan boyama ya da antijen ve nükleik asit tespiti yolu ile analiz edilmesi temeline dayanmaktadır. Organizmaların in-vitro ortamda çoğaltılması mümkün değildir. Serolojik testler, hem semptomatik hem de asemptomatik enfeksiyon sonrasında spesifik antikor yanıtları geliştiği için epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir araçtır. Mikroskopi reaktiflerin düşük maliyetleri nedeniyle önemli bir tanı yöntemi ancak iyi boyama ve görsel beceri gereklidir. Modifiye asit-fast boyama, immünofloresan antikor boyamaya göre %70 oranında daha hassas olmasına karşılık moleküler tanı yöntemleriyle kıyaslandığında vakaların yarısından çoğunu gözden kaçırmamıza sebebiyet verebilir (Checkly vd., 2015).

Floresan mikroskopide, ışık yayan diyot ışık kaynakları gibi teknik iyileştirmeler ve maliyet düşüşleri geleneksel modifiye asit-fast boyamadan daha hassas olan auramine-rhodamin gibi floresan boya ile test yapılmasına olanak sağlar, ancak spesifikite ile ilgili problemler ortaya çıkabilir (Checkly vd., 2015).

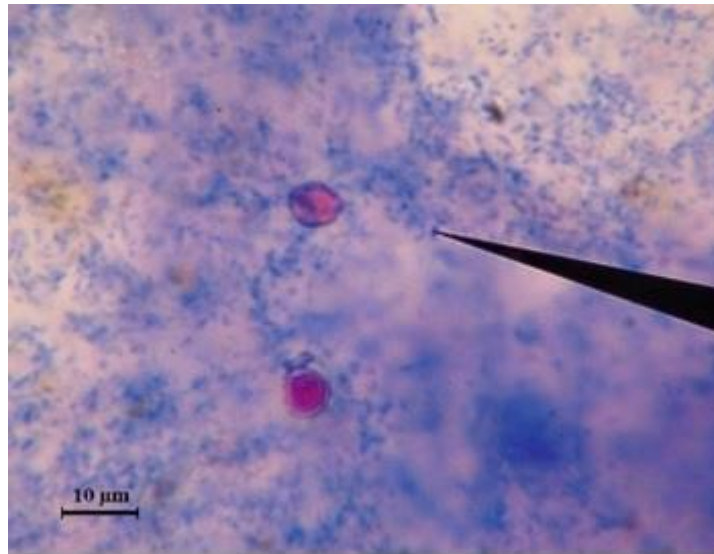
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), *Cryptosporidium* ve diğer enterik patojenlerin tanımlanması için araştırma laboratuvarlarında gittikçe artan oranlarda kullanılan ve yüksek derecede hassasiyete sahip bir tanı yöntemidir. Bu amaçla en yaygın olarak SSU-rRNA gen bölgesi kullanılır. Bunun dışında 18S rRNA yı kodlayan genin amplifikasyonu da yaygın bir şekilde kullanılmakta olup, hedeflenen başka genlerde bulunmaktadır. Moleküler analizler *Cryptosporidium* türlerini birbirinden ayırmak için elzemdir. Bu nedenle 18S rRNA yı kodlayan genin yaklaşık 800 bp lik fragmentinin sekanslanması ile PCR, yaygın olarak spesifikasyon için kullanılmaktadır. Tanımlanmış daha küçük fragmentler için gerçek zamanlı testler kullanılmaktadır. *C. hominis* ve *C. parvum* DNA sekans seviyesinde %96 oranında benzer oldukları için gp60 geni türler içinde alt tiplene amaçlı kullanılmaktadır. Multilokus yöntemlerinin kullanımı cazip olmasına rağmen standartlaştırılmadığı bildirilmektedir. DNA ekstraksiyonu öncesinde boncuk atma, dondurma-çözme, kaynatma veya kimyasal eritme gibi yöntemler kullanılarak ookistlerin bozulması gereklidir. Bununla birlikte basitleştirilmiş ekstraksiyon yöntemlerini kullanabilen moleküler point-of-care testleri (POCT)

geliştirilmektedir. Enteropatojenler için kullanılan multipleks moleküler teşhislerin, diyareli ve sağlıklı kontrol bireylerinde sıklıkla yetersiz kaldığı belirtilmiştir. Bazı veriler *Cryptosporidium*'un kantitatif yükü ile artan hastalık şiddeti arasında korelasyon olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle nicel testlerin gelecek çalışmalar ve ilaç rejimlerinin değerlendirilmesi için önem taşıyacağı bildirilmektedir (Checkly vd., 2015).

#### Modifiye Kinyoun asit-fast boyama

En sık kullanılan tanı yöntemidir. Taze dışkı örneklerinden veya zenginleştirilmiş örneklerden hazırlanan yayma preparatların bu teknikle boyanmasıdır. Karbol fuksinle boyanan ve aside dirençli *Cryptosporidium* ookistleri metilen mavisi ile boyanmış zemin üzerinde genelde pembe, koyu pembe, mor renkte yuvarlak/oval yapıları ile tanınırlar. 100x objektif ile immersiyon yağı yardımı ile incelenir. Olgun ookistlerde 4 adet kadar sporozoit gözlenebilir. Bazı ookistler ise boya almayabilir ya da kısmen boyanmış olabilirler. Bu ookistlere hayalet ookist adı verilir (Doğruman-Al, 2011; T.C.Sağlık Bakanlığı, 2014). Bu yöntemin hasasiyet oranının %70, spesifitesinin %78 oranında olduğu belirtilmektedir (Mirhashemi vd., 2015).

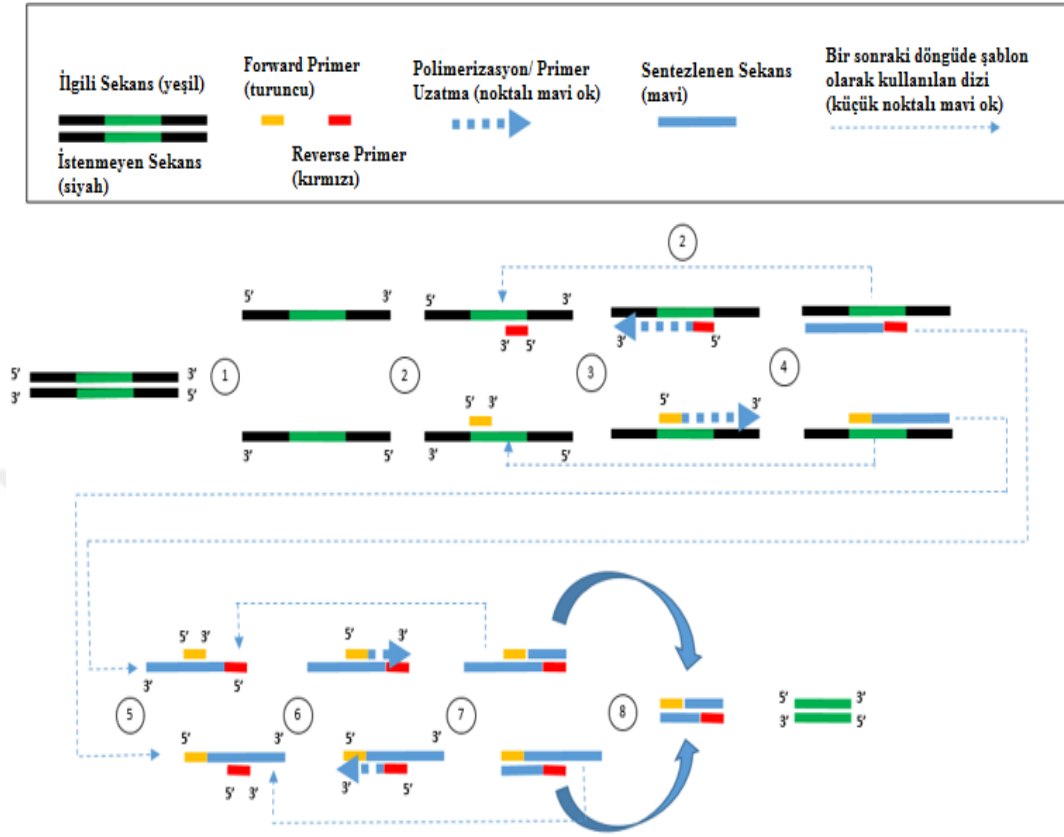
Yalnızca tek bir dışkı örneğinin incelenmesi ile *Cryptosporidium* enfeksiyonlarını yalnızca %50 oranında teşhis etmek mümkündür. İlk örneğin negatif olması tanıyı geçersiz kılmaz, kesin negatif sonuç için 1-2 gün arayla tekrar dışkı incelemesi yapılmalıdır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2014).



**Şekil 1.7.** Modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle boyanan dışkı örneklerinde gözlemlendiğimiz *Cryptosporidium* ookistleri (100x) (Orijinal).

### Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR, ortamda polimeraz enzimi ve sentez için uygun moleküller bulunması durumunda bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin seçilip tanınması ve çoğaltılması temeline dayanmaktadır (Bişkin vd., 2011; Sevindik ve Abacı, 2013). Bu işlem DNA polimeraz, deoksiriboz nükleotidleri (dNTP'ler), ve hedefe özgü spesifik komplementer oligonükleotidler yani primerler kullanılarak in vitro olarak DNA hedef dizilerini çoğaltmaktadır (Grody vd., 2010; Bişkin vd., 2011). PCR, temelde üç aşamadan oluşmaktadır. İlk basamak çift iplikçikli DNA molekülünün 90-95°C'de denaturasyonu sonucu tek iplikçik haline gelmesi ile sonlanır. İkinci basamak ise 37-60 °C sıcaklıklar arasında primerlerin birinci basamakta oluşan tek iplikçikli DNA'ya bağlanma aşamasıdır (Sevindik ve Abacı, 2013). Üçüncü basamakta ise DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz) ,uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında istenilen DNA bölgesi çoğaltılır (Bişkin vd., 2011; Sevindik ve Abacı, 2013). Bu basamaklar 30 ila 50 defa tekrar edilir ve her tekrarda DNA 2 katına çıkar. Sonuç olarak baştaki hedef DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılmaktadır. (Grody vd., 2010; Bişkin vd., 2011 Sevindik ve Abacı, 2013). RNA viral nükleik asit hedefleri PCR işlemine başlamadan önce, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) olarak bilinen komplementer DNA'ya (cDNA) ters transkribe edilmelidir. PCR işlemi karmaşıktır ve amplikasyon reaksiyonunun her bir unsuru sonucun etkinliğini ve başarısını etkilemektedir. Primerlerin, kalıpların, dNTP'lerin ve Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonun, kullanılan polimeraz tipi,kalıp G+C içeriği ve döngü parametreleri gibi faktörlerin optimum performans için dengede olması gerekmektedir. PCR ürünlerinin tespiti jel elektroforezi ile boyutlarına ayırma ve ya diziye özgü işaretli haberci problemlerin hibridizasyonu yöntemlerinin kullanılması ile gerçekleştirilebilmektedir (Grody vd., 2010).



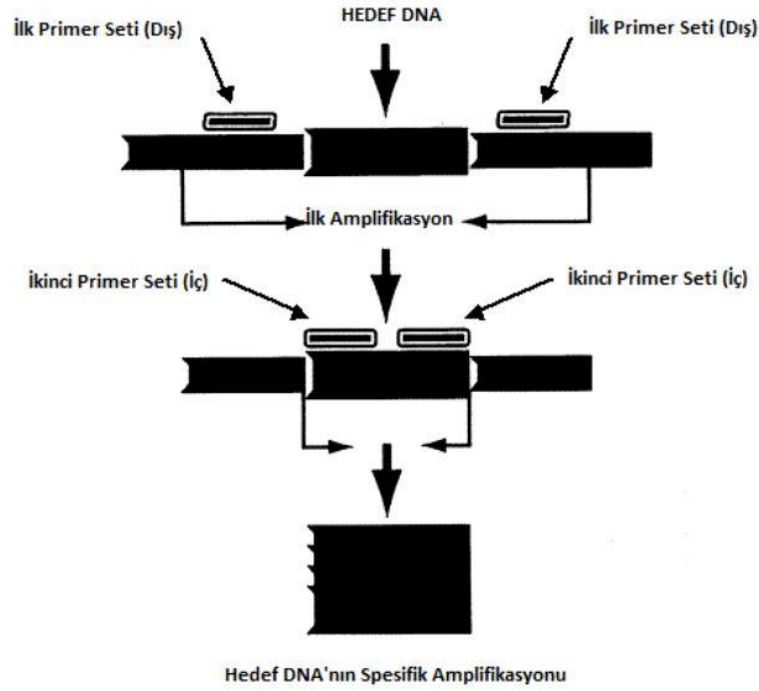
**Şekil 1.8.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışma akışı (Wikipedia, 2013).

- 1) DNA çift sarmal yapısı 90 °C 'nin üstündeki sıcaklıklarda erir ve DNA zincirleri birbirinden ayrılır.
- 2) Sıcaklık kullanılan her iki primerin  $T_m$  değerinin biraz altına düşer ve her iki primer uygun zincire bağlanır. Bu primerler sadece dizilerin geri gelmediğinden ve birbirlerine bağlanmadıklarından emin olmak için fazladan tedarik edilmektedir.
- 3) Polimerizasyon (uzatma) DNA polimeraz vasıtasıyla her bir DNA zincirinde  $5' \rightarrow 3'$  yönüne doğru gerçekleşir.
- 4) Eklenen yeni nükleotidler önceki ilgili diziyi genişleterek yeni dizilerin oluşmasını sağlar.
- 5) Önceden polimerize edilmiş zincirler diğer primer için şablon görevi görür. (Eğer ilk forward primer bağlandıysa, reverse primer hemen tam tersi olarak bağlanır).

- 6) Polimerizasyon her bir zincirde 5'→3' yönünde DNA polimeraz vasıtasıyla gerçekleşir ve ilgili sekansın sonuna kadar gider.
- 7) Eklenen yeni nükleotidler yalnızca ilgili sekansı kodlayan yeni zincirler meydana getirir.
- 8) İlgili diziyi kodlayan sentezlenmiş iplikçikler son ürünün oluşturulması için birbirlerine bağlanırlar (Wikipedia, 2013)

### Nested PCR

Nested PCR, PCR tekniğinin özgünlüğü ve hassasiyetini arttırmak için geliştirilen yöntemlerden biridir. Nested PCR reaksiyonlarında iki primer seti ve ardışık iki polimeraz zincir reaksiyonu bulunmaktadır. Başlangıç aşaması için kullanılacak primeler hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü dizayn edilen birinci set primerler ile uzun bir bölgenin çoğaltılmasını sağlar. İlk PCR setinden elde edilen ampliconlar ikinci bir primer seti ile ikinci bir amplifikasyon aşaması için şablon olarak kullanılır. İkinci amplifikasyon aşamasında 1. Aşamada amplifiye edilen dizilerin iç bölgesi çoğaltılır. Bu teknikle DNA amplifikasyonunun özgünlüğü ve hassasiyetinin  $10^4$  kat kadar arttığı düşünülmektedir. İkinci aşamadan sonra ortamda istenilmeyen DNA dizisi kalmadığı belirtilmiştir. İkinci PCR aşamasında kullanılan primelerin 3' ucunda bulunan iki veya üç nükleotidik dizi yöntemin hassasiyetini belirlemektedir. Bahsi geçen 3' dizisi hedef DNA dizisinin tamamlayıcısı değilse amplifikasyon gerçekleşmemektedir. Böylece hedef olmayan dizilerin çoğaltılmasının önüne geçilmiş olur. Bununla birlikte reaksiyonun kontaminasyon potansiyeli amplicon ürünlerinin ek manipülasyonu nedeniyle artmaktadır. Kontaminasyon riskini en aza indirmek için işlemin farklı aşamaları fiziksel olarak, tercihen farklı odalarda yapılarak birbirinden ayrı tutulmalıdır (Grody vd., 2010; Sevindik ve Abacı, 2013).



**Şekil 1.9.** Nested PCR çalışma akışı (Sevindik ve Abacı, 2013).

### Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizleri genellikle spesifik kısa bölgelerde ortaya çıkan mutasyonlar üzerine bilgi toplamak amacıyla dolaylı yoldan kullanılan bir yöntemdir. RFLP, DNA sekans seviyesinde olan polimorfizmleri tespit etmek için uygun bir yöntem olup birinci sınıf genetik belirteçlerdir ve yüksek oranda doymuş linkaj haritalarının yapımına olanak sağlar. Bu yöntem, organizmanın, DNA'larının bölünmesinden elde edilen kalıpların analizi ile ayırtedilebilmesi için kullanılır. Eğer iki organizma belli bir restriksiyon endonükleazının bölünme tarafı arasındaki mesafesi bakımından farklılık gösteriyorsa, üretilen fragmentlerin uzunluğu DNA restriksiyon enzimi ile kesildiğinde farklılık gösterecektir. Üretilmiş kalıpların benzerliği türleri hatta suşları bile bir diğerinden ayırmak için kullanılabilir (Marwal vd., 2014).

### Direkt floresan antikor testi

Dışkı örneklerindeki organizmaların yüzeyindeki antijenlerin immünolojik olarak saptanmasında kullanılan monoklonal antikor yöntemine dayalı bir yöntemdir. Cryptosporidiosis tanısı için modifiye asit-fast boyama yöntemine göre daha yüksek hassasiyete sahiptir. Bu tekniğin santrifüj sonrası incelemelerde kullanılması tanı şansını arttırmaktadır. Konsantre veya

konsantre olmayan dışkı örneklerinde fluorescein isothiocyanate (FITC) bağlı cinse özgül *Cryptosporidium* monoklonal antikorlarının dışkı örneğindeki ookistlerin yüzeyine bağlanarak görünür hale getimesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntem şüpheli numunedeki antijenlerin lam üzerine yayılması ve fikse edilmesi daha sonra bu antijenlerin üzerine özel işaretli antikorların konulması ve sonuç olarak şüpheli antijenlerin özel işaretli antikorların oluşmasına sebebiyet verip vermediğinin araştırılması şeklinde özetlenmektedir (T.C Sağlık Bakanlığı, 2014).

#### Enzim ilintili immün test (ELISA)

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde kullanılan immünolojik bir yöntemdir. Enzim İmmun Assay (EIA) olarak da isimlendirilmektedir. Bu yöntem oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli, antiglobulinin ilave edilmesi ve son olarak substratın eklenmesiyle renk oluşumunun varlığına bakılması esasına dayanır. Eğer renk oluşumu var ise ortamda antijenin de mevcut olduğu kanıtlanır. Renk oluşumu kimyasal bir olaydır ve enzimin aktivitesine bağlıdır. (İtik-Ekinci, 2012). Normalde “kesin tanı” yöntemi olan ELISA metotunda oluşabilecek “sınırdaki” pozitif değerler direkt floresan antikor testi ile doğrulanmalıdır (Uyar, 2014). Ancak hem hızlı hemde kolay bir yöntem olan ELISA yönteminin dışkıda *Cryptosporidium* ookistlerinin tespitinde kullanılacak uygun bir cihaza ihtiyaç duyulması v pahalı olması bu yöntemin kullanımını göreceli olarak sınırlamaktadır (Kehl vd., 1995).

Çizelge 1.5. Sık kullanılan cryptosporidiosis tanı metotları (Doğruman-AI, 2011).

Yöntem	Prensibi	Duyarlılık	Avantaj/Dezavantaj
<b>Aside dirençli boyama</b>	Ookistlerin modifiye, Kinyoun veya Ziehl-Neelsen yöntemleriyle boyama	IFA yöntemine göre 10 kat daha az duyarlı	Kolay ve diğer coccidian parazitlerde belirlenebilir. Spesifik değildir.
<b>IFA</b>	Floresan işaretli anti- <i>Cryptosporidium</i> antikorları ile boyama	10.000-50.000 ookist/g dışkı	Özgüllüğü yüksek Morfolojik olarak doğrulama Canlılık belirlenemez
<b>EIA</b>	<i>Cryptosporidium</i> antijen yakalama	IFA'dan daha az duyarlı	Spesifik ve hızlı Tüm gelişim aşamalarının antijenleri saptanır Morfolojik doğrulama yapılamaz
<b>İmmunkromatografi</b>	Kolorimetrik yöntemle <i>Cryptosporidium</i> antijenleri yakalanır	IFA'dan daha az duyarlı	Hızlı Kalite kontrolü ve kalite güvencesi hususunda sorunlara açık
<b>FISH</b>	Floresan işaretli tamamlayıcı DNA oligonükleotit problemleri kullanarak in situ hibridizasyon		Yüksek spesifite Canlılık testi olarak da kullanılabilir
<b>Nested PCR</b>	İki primer seti kullanılarak iki basamaklı PCR yapılması. Yaygın olarak kullanılan hedef gen bölgeleri: gp60, hsp70, 18S rRNA, COWP ve TRAP	Tek ookist	Yüksek duyarlılık ve <i>Cryptosporidium</i> türlerinin özgül olarak belirlenmesi Tür/genotip ayrımı için dizi analizi veya RFLP gereklidir
<b>PCR-RFLP</b>	Genomik DNA'nın amplikasyonundan sonra, ampikonun enzimle kesilip incelenmesi	Tek ookist	<i>Cryptosporidium</i> tür izolatlarının çoğunun tür veya genotip ayrımı yapılabilir Real-Time PCR yöntemine göre daha fazla zaman gereklidir.
<b>Real Time PCR</b>	Melezleme problemleri kullanılarak DNA'yı gerçek zamanlı belirleyebilme	Tek ookist	Hızlı, yüksek duyarlılık ve spesifite Rutin olarak kullanılabilir Tür ayrımında kullanılabilir Yüksek maliyet
<b>Mikrosatellit analiz</b>	Polimorfik belirteçler olarak kullanılan mikrosatellitlerin PCR ile çoğaltılması	Daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmakta	Aynı türdeki izolatlarındaki farklılıkları belirleyebilir İleri analiz gerektirmez
<b>Real Time RT-PCR</b>	mRNA'nın gerçek zamanlı olarak belirlenmesi	Genin kopya sayısına bağlı	Hızlı yüksek duyarlılığa sahip Canlılık testi olarak kullanılabilir Henüz rutin tanı aracı olarak kullanım için yeterince veri yoktur
<b>NASBA</b>	Kalıp olarak tek zincirli RNA'nın kullanıldığı, tamamlayıcı RNA'nın reaksiyon süresince sentezlendiği izotermal bir çoğaltma yöntemi	Beş ookist	Sade RNA örneklerinden yapılan çoğaltma ile ookist canlılığı belirlenebilir Isı döngü cihazı gerektirmez Tanı aracı olarak kullanımı için çalışmaların geliştirilmesine ihtiyacı vardır.

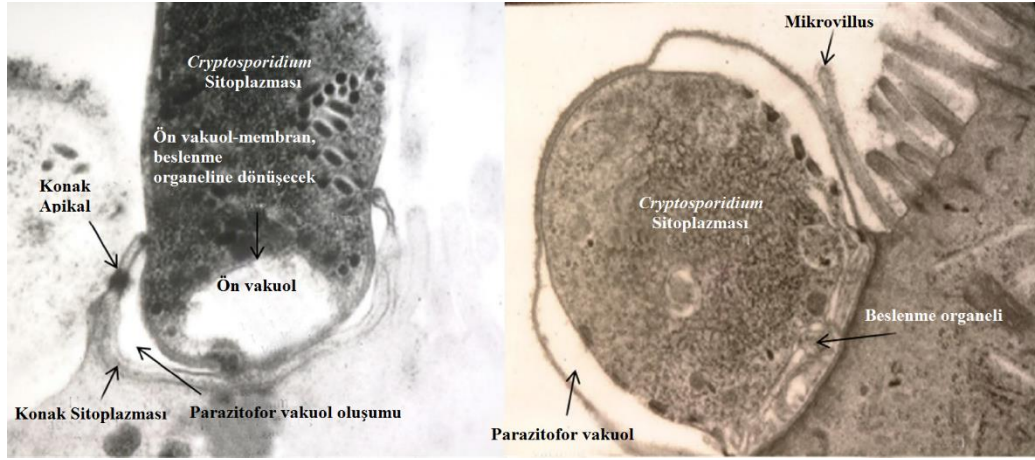


## 1.8. Patogenez ve Klinik Belirtiler

*Cryptosporidium* enfeksiyonlarında patogenez, eşeyli ve eşeysiz üremenin meydana geldiği enfekte hücrelerden çıkan kalın ya da ince duvarlı ookistlerden eksiste olan sporozoitlerin, bağırsak enterositlerindeki fırça kenarlı yapıya tutunmaları ile başlar. Bu konak-parazit bağlanma, invazyon ve parazitofor vakuol formu başlangıç etkileşimi çoklu parazit ligandlarının ve konak reseptörlerinin dahil olduğu kompleks bir süreçtir. Apicomplexaların invaziv aşamaları “apikal kompleks” olarak bilinen roptriler, mikronemler ve yoğun granüller gibi özelleşmiş salgı organellerine sahiptir. Konak-parazit etkileşimi başlangıcı esnasında bu organeller bağlanma, invazyon ve parazitofor vakuol oluşumunu kolaylaştıran proteinleri salgılar ve başarılı bir şekilde ekzositoz ederler. Bilinen bu yüzey yada apikal kompleks proteinleri şunlardır; CSL,GP900,p23/27,TRAPC1,GP15,CP15,CP60/15,cp47,gp40/45,gp15/Cp17 (Tzipori ve Ward, 2002). Bu ilk etkileşimin ardından ince ve kalın bağırsak boyunca enfeksiyonun bağırsak içinde yayılmasına yol açan endojen formlar daha güçlü hale getirilmiştir. Nadiren, mide mukozası, safra kanalı, safra kesesi ve solunum epitel dokusu da enfekte olur. Enfeksiyonun dağılımı klinik belirtilerin yoğunluğunu belirleyebilir çünkü proksimal ince bağırsağın enfeksiyonu sıklıkla sulu diyareye yol açarken, distal ileum ve kalın bağırsağa lokalize olan enfeksiyon sıklıkla asemptomatik görülür. Abomasum veya midenin pilorik bölgesinin enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir. Epitel dokunun invazyonu ve kolonizasyonu fırçamsı kenara sahip mikrovillusun yerini bozar. Villus kısalması ve füzyonunun yanı sıra kript hiperplazisi de epitel hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Epitelyum yüzeyinin kolonizasyonu, bağırsak yüzey alanı azalması, membrana bağlı sindirim enzimlerinin kaybı ve besin maddesi ve elektrolit taşınımının bozulmasına yol açar (Thompson vd., 2005).

Bu patolojik olayların neticesinde, *Cryptosporidium* ile enfekte olan konaklarda tekrar emilim yapabilen bağırsak yüzeyi daralır bu nedenle kötü emilim (mal-absorbsiyon) yani bağırsaklarda iyi emilim olmaması ve sıvı salgılanmasında artış görülür. (Thompson vd., 2005; Bilal, 2013) Sıvı sekresyonundaki artışın, mukozal bariyerin bozulması ve bağırsak epitel hücreleri içinde bulunan iyonların ve suyun tekrar bağırsak boşluğuna atılmasıyla oluştuğu bildirilmektedir (Thompson vd, 2005; İtik-Ekinci, 2012).

Patogenez söz konusu olduğunda konak ile parazit arasında kurulan bağ ve invazyon birinci derecede önemli etkileşimdir. *Cryptosporidium* türleri için konak-parazit arasındaki bağlanmayı etkileyen çeşitli faktörler ve bağlanmayla invazyonun yapısal özellikleri tanımlanmıştır. Ancak bu sürece dahil olan spesifik parazit ve konak molekülleri hakkında az bilgi vardır (Tzipori ve Ward, 2002; Thompson vd., 2005).



**Şekil 1.10.** Konak hücrelerini parazit istilası: *Cryptosporidium* sporozoiti konağın epitel hücrelerini istila ederken (sol resim). Parazitofor vakuolün içinde *Cryptosporidium* trofozoiti (sağ resim). (Thomson vd., 2017).

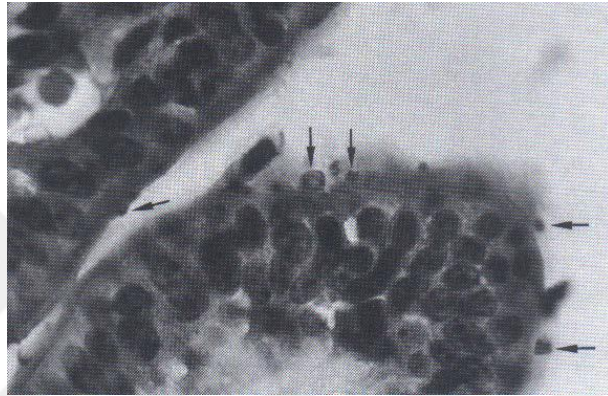
Karmaşık yaşam döngüsü, konakta ki parazitik formların çeşitliliği, farklı *Cryptosporidium* türleri ve farklı konak türlerinde farklı dokuların tercih edilmesi oluşu da *Cryptosporidium*'un konak-parazit ilişkisinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Ancak son dönemde, hayvan modellerinde yapılan çalışmalar hastalığın fizyopatolojisinin iç yüzünün ve klinik belirtilerinin daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur (Thompson vd., 2005).

**Çizelge 1.6.** Parazit türleri ve hayvan konakların arasında değişen *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile ilgili dokuları özetlemektedir (Thompson vd., 2005).

Parazit Türleri	Konak(lar)	Birincil doku	İkincil dokular
<i>C. hominis</i>	İnsan	İnce ve kalın bağırsak	Mide, safra kanalı, safra kesesi, solunum sistemi
<i>C. parvum</i>	İnsan, Sığır, koyun, keçi, domuz, fare	İnce bağırsak	Mide, safra kanalı, safra kesesi, solunum sistemi
<i>C. andersoni</i>	Sığır	Kırkbayır	-
<i>C. muris</i>	Fare	Mide	-
<i>C. meleagridis</i>	Tavuk, hindi	Bağırsak, kloak, bursa fabricius	Mide
<i>C. baileyi</i>	Tavuk	Trake, bronşlar, akciğer, hava keseleri	Bağırsak, kloak, Fabricius kesesi
<i>C. serpentis</i>	Sürüngenler	Mide	-
<i>C. nasorum, C. molnari</i>	Balık	Mide bağırsak	-

Cryptosporidiosis'in patojenitesi hakkındaki bilgiler genellikle canlılarda biyopsi ve ölenlerde otopsi bulguları şeklindedir (Hazer, 2007).

Buzağuların otopsisinde ince bağırsak mukozasındaki değişikliklerin ileumda çok şiddetli olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerde hiperemi ve özellikle ileumun bazı bölgelerinde şişlik ve hastalığın klinik şiddetine göre değişen oranda mukoza kalınlığında azalma görülmüştür. Ayrıca bağırsak villuslarında çeşitli derecelerde erime, ödem, yapışma ve atrofi şekillenmektedir (Thompson vd., 2005; İtik-Ekinci, 2012).



Şekil 1.11. İleum kriptlerinde *Cryptosporidium* un çeşitli gelişim aşamaları (Bilal, 2013).

### 1.9. Genotip ve Filogenetik Analizleri

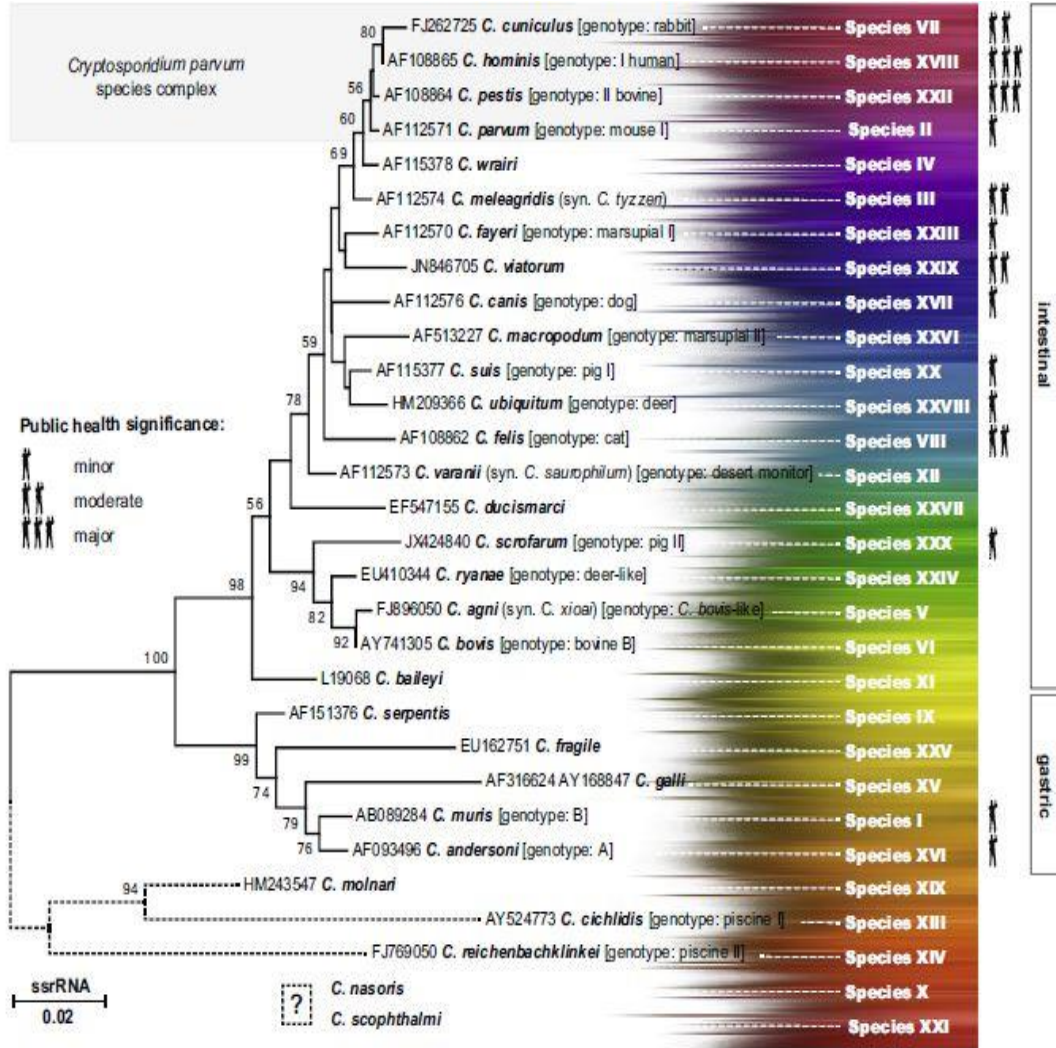
Morfolojik olarak ayırt edilemeyen *Cryptosporidium* spp. izolatları DNA sekanslarında oldukça heterojendir ve başlangıçta bir “genotip” statüsü kazananlardan birkaçı, daha sonra ayrı türler olarak tanımlanmıştır. *Cryptosporidium* spp. için kullanılan nomenklatür karmaşıktır. Bir tür ismi tanıtıldığında ve bir bulguyla özdeşleştirildiğinde uluslararası referans standartı haline gelir. Uluslararası standart, isimlerin sürekliliğinin ve istikrarının korunması amacı taşıyan bir dizi kurala sahiptir. Öte yandan “genotipler” için yeni örneklerin sunulması ve yeniden adlandırılması için hiçbir kural bulunmamakta ve böylece sürekli olarak değişikliğe izin verilmektedir. İstikrarlı nomenklatür kullanımı, *Cryptosporidium* spp. üzerine yayınlanan orijinal bilgilerle güncel ve gelecekteki araştırmaları birleştirmek için gereklidir (Şlapeta, 2013).

Son 10 yılda tür adlandırması sabit bir şekilde artmakta olup yaklaşık olarak her yıl bir yeni tür adlandırması yapılmıştır. Şu anda toplamda 30 adet isimlendirilmiş tür bulunmaktadır. Tanımlanan ve adlandırılan türler Dünya çapında yapılan moleküler ve deneysel çalışmaların sonucudur. Bununla birlikte adlandırılmış türler arasında spesifik türler olabilecek ya da olmayacak büyük çeşitlilikte kalıplar ya da genotipler bulunmaktadır. Bu sayı *Cryptosporidium* spp. için medikal ve veterinerlik açısından adil görünmektedir. Adlandırılan ve zaten bilinen

türler, dünya çapında yapılan moleküler araştırmalar ve deneysel çalışmaların ürünüdür. Bununla birlikte adlandırılmış türler arasında spesifik statüye layık olabilecek ve ya bu statüyü haketmeyen formlar ve genotiplerde bulunmaktadır (Šlapeta, 2013).

Herhangi bir türün geçerliliği, cins için geçerli olan test edilebilir bir tür kalıbına dayanmaktadır. Son 10 yılda 10 *Cryptosporidium* türü biyolojik ve genetik karakterlerine göre adlandırılmıştır. Temel parazitik özellik olan “konak özgüllüğü “ *Cryptosporidium* spp. için de kullanılmaktadır ancak güvenilirliğe sahip değildir. Hatta yakın zamanda isimlendirilen 10 *Cryptosporidium* türünden en az 5 tanesi insanlarda bulunmakla beraber, benzer olarak on türden beşinin sığırlar için deneysel olarak enfektif olduğu gösterilmiştir. Belirtilen durumların her ikisinde de bulunan parazitler insanlar ve sığırlarda sıkça görülen parazitler olmamasına rağmen nadir olarak adlandırılmak yerine bu iki konağın da yaygın olarak tanınmasının sebebi dünya çapında analiz edilen binlerce izolatin verilerine dayanmaktadır. Bazı deneyler doğal olmayan sonuçları içerebildiği için deneysel kanıtlar dikkatli yorumlanmayı gerektirir. Yinede belirgin parazit hataları bu türlerin plastisitesini gösterir ve “ekolojik uyum” olarak bilinen ekolojik bir kavramla tanımlanır. Kavram, bilinen ve deneysel olayların veya “uyum sağlayanlar” ın değişen çevrelerde tür topluluklarının oluşumuna olanak tanıyan güncel adaptasyonlar olduğunu önermektedir. “Uyum sağlayanlar”, değişen çevre faktörleri ile değişkenlik gösterebilirler (Ör: bir parazit rezervuarına yakınlık). Bunun dışında *Cryptosporidium scrofarum*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium fayeri*, *Cryptosporidium cuniculus* ve *Cryptosporidium parvum* gibi nispeten dar konak aralığı bulunan birkaç uzman türün daha önce aralarında bir ilişki olduğuna dair hiçbir kanıt bulunmayan insanları konak olarak seçtikleri tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* cinsinin sınıflandırılması ve filogenetik analizleri konak ve parazit işbirliğinin sonucu ile birlikte geçerli yaklaşım olarak kabul edilmektedir. İstikarlı adlandırmanın kullanılması, ortaya çıkan bulaşıcı bir hastalığın kökeninin tam olarak belirlenmesinde önem arz etmektedir. DNA işaretleyicileri, *Cryptosporidium* spp. araştırmalarında ön plandadır. Small subunit ribosomal RNA (ssrRNA, SSU-rRNA, SSUrRNA), *Cryptosporidium* için en sık kullanılan genetik işaretleyicidir. SSU rRNA, geçmişe dönük bir barkod işlevi görerek *Cryptosporidium* cinsinin tümünün filogenetik rekonstrüksiyonuna olanak sağlar. Bununla birlikte, birincil DNA veritabanlarından *Cryptosporidium* spp. için referans gösterilebilecek bir veri seti yüklemek için doğrudan yol yoktur. Aslında *Cryptosporidium* spp. sınıflandırması için birincil DNA veritabanları güvenilirmezdir. Bu durum bu tür veri tabanlarına karşı BLAST aramalarının yanıltıcı olacağı anlamına gelmektedir. Bu nedenle, nükleotid girdilerinin bir referans ve isimlendirilmiş *Cryptosporidium* spp dizilimi derlenmiştir. Öte yandan, tek lokus yazımına ilişkin sınırlamalar bilinmektedir (ör: SSU rRNA). Özellikle, SSU rRNA, alt tip tanımlama ve popülasyon

analizlerine izin vermeyen çok kopyalı bir genidir. SSU rRNA'ya dayanan filogenetik ağaç, birkaç dalda zayıf bir şekilde çözülmüştür. Filogeniyi yeniden yapılandırmak için aktin ve HSP70 gen dizilerinin eklenmesi, *Cryptosporidium* spp. için güçlü bir filogenetik sinyal sağlar (Şlapeta, 2013).



Şekil 1.12. SSU rRNA gen bölgesine göre *Cryptosporidium* türlerinin filogenisi (Şlapeta, 2013).

### 1.10. Zoonotik Önemi

*Cryptosporidium parvum* türlerinin neden olduğu hastalığa Zoonotik Cryptosporidiosis denilmektedir. Sığırlarda bulunan *C. parvum* türleri dışında bu protozoan parazitin bazı farklı genotipleri zoonotik cryptosporidiosis'e neden olmaktadır. Dünya'da bilinen paraziter zoonozlar cysticercosis, cystic echinococcosis, toxocariosis, trichinellosis, giardiosis, toxoplamosis ve cryptosporidiosis olarak bilinmektedir. Zoonotik hastalık görülmesinde ülkelerin gelişmişlik

düzeyi, ekonomik ve sosyo-ekonomik yapısı, buldukları ülkenin coğrafi konumu, beslenme alışkanlıkları, mevsim, iklim, gelir düzeyi, doğal afetler, savaşlar gibi etkenlerden bahsedilebilir (Arslan, 2015).

1980'li yıllardan itibaren sığırlar zoonotik cryptosporidiosis için önemli bir kaynak olarak görülmüşlerdir. Enfekte olmuş sığır ile temas veterinerlik öğrencileri arasında, araştırma teknisyenlerinde, tarım kamplarına katılan çocuklarda ve fuarlarda küçük çapta cryptosporidiosis salgınlarına sebebiyet vermiştir. Sığır dışkısı ile kontamine olmuş yiyecek ya da içeceğin ciddi oranda yiyecek ya da içecek kaynaklı cryptosporidiosis salgılarının nedeni olduğu belirtilmiştir (Xiao ve Feng, 2008). Vaka-kontrol çalışmalarında, enfekte sığır ile kontakt, Birleşik Devletler, Birleşik Krallık, İrlanda ve Avustralya' da insanlarda cryptosporidiosis'e neden olan risk faktörü olarak gösterilmiştir. Ülkemizde *Cryptosporidium* yayılımı hayvanların yaşı ve ishal derecelerine göre çeşitlilik göstermekte olup, bu oran %4-30 arasında değişmektedir (Arslan, 2015).

Sığırlardaki *C. parvum*'un insanlara direkt olarak bulaşmasının gözlenmesi sadece bulaşmanın bu yönde olduğuyla ilgili yanlış bir algı oluşturmaktadır. Aksine *C. parvum* bütün memelilerdeki cryptosporidiosis'ten sorumludur. Bahsediliği üzere sığırlarda görülen zoonotik cryptosporidiosis'in sorunlusu *Cryptosporidium parvum* iken insanlarda ise *Cryptosporidium hominis*'tir. Ancak bu durumun insanlarda yaşa bağlı değişim gösterdiği saptanmıştır; çocuklarda *C.hominis* yaygın iken 25 yaş üstü insanlarda *C. parvum*'un daha baskın olduğu gözlemlenmiştir (Arslan, 2015).

### 1.11. Korunma Yolları

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından önerilen kontrol yöntemleri genel olarak hijyen bazlıdır. Ancak uygulanacak kitle bakımından farklılıklar göstermektedir.

- Yemek hazırlamadan ve yemeden önce,
- Tuvalet kullandıktan sonra,
- Bez değiştirdikten ve ya tuvaleti kullanan çocuğun altını temizledikten sonra,
- Diyaresi olan bir hastayla ilgilenmeden önce ve sonra
- Özellikle çiftlik hayvanı ve ya onun dışkısıyla temasa geçtikten sonra,
- Bahçeye ilgilendikten sonra (eldiven giyilmiş olsa bile)

Ellerin akan su altında ıslatılması daha sonra, sabun kullanılarak 20 sn. kadar ovalanarak yıkanmasını yine ellerin durulandıktan sonra temiz havlu ya da hava yardımıyla kurutulması konusunda ve alkol bazlı el dezenfektanlarının *Cryptosporidium* paraziti öldürmekte yeterli olmadığı konusunda uyarılmaktadır. Bunun dışında çocuk bakım kuruluşlarında ishalleri olan

çocuğun çocuk bakım merkezinden ishali bitene kadar ayrı tutulması gerektiğini belirtmektedir. Havuz, su parkları gibi halka açık olan eğlence amaçlı su kaynaklarında ise diyareli iken yüzülmemesi gerektiğini ve eğer cryptosporidiosis teşhis edildiyse en az iki hafta ishal bitene kadar yüzülmemesi gerektiğini vurgulamaktadır. Yüzerken su yutulmamalı ve küçük çocukları her 30-60 dk. da bir mutlaka tuvalete götürülerek bezlerinin kontrol edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Seyahat esnasında karşılaşılabilecek çiğ ve ya iyi pişmemiş yiyeceklerden uzak durulmalıdır. Cinsel ilişki esnasında oluşabilecek herhangi bir bulaşma için ise mutlak surette korunma önerilmektedir. Bağışıklık yetersizliğine sahip olan hastalar için yukarıda bahsettiğim hijyen temelli bütün bu önemler daha katı dikkat gerektiren bir düzeydedir (CDC, 2015b)

Sığırlar için Cryptosporidiosis'ten korunmada en önemli faktör kolostrumdur. Kolostrum neo- natal buzağılarda kan yolu ile aktarılmayan antikörlerin ağızdan alınmasına yardımcı olur. Ağız yoluyla alınan antikörler buzağuları *Cryptosporidium* etkenlerine karşı korumaktadır. Kolostrum alımında süre çok önemlidir. En geç 12-24 saat zarfında mutlak suretle yeni doğanın kolostrum alması gereklidir.

*Cryptosporidium* ookistleri çevre koşullarına oldukça dayanıklı olduğu için dış ortamda uzun süre canlılıklarını devam ettirebilmektedirler. Bu nedenle enfeksiyonu kontrol altına alabilmek için ookistlerin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Unat (1995), ookistlerin etkinliğinin ancak -20 °C 'de 72 saat dondurulmak veya 45 °C- 55°C'de 20 dakika ısıtılmak koşulu ile patojenitesinin azaltılmakta ya da yok edilmekte olduğunu belirtmiştir (İnci, 2013).

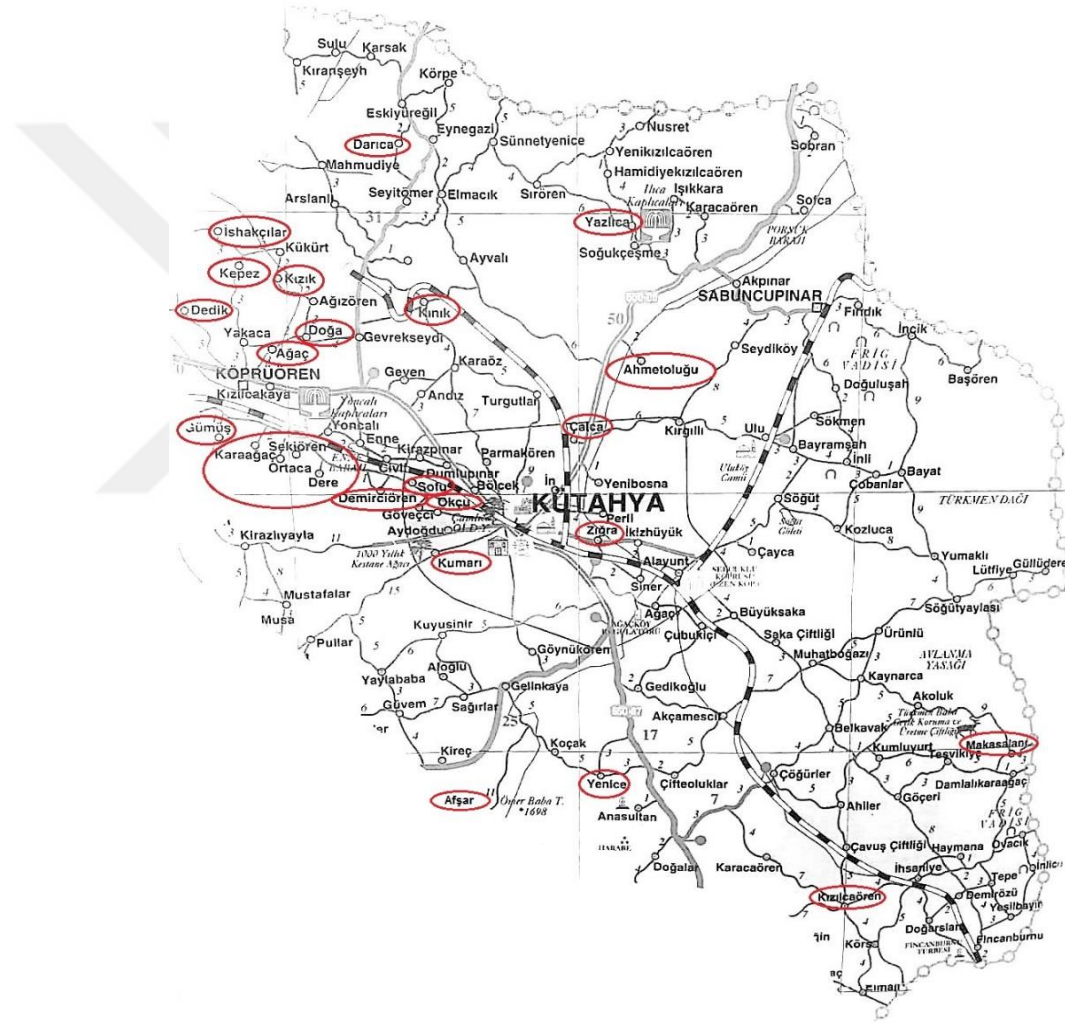
Ayrıca enfeksiyondan korunmada çiftlik yönetimi, sanitasyon ve hijyen kuralları çok önemlidir ve ciddiyle ele alınmalıdır. Doğum yapılan alan temiz ve kuru olması, yeni doğmuş buzağuların yeterli havalandırma sağlanan ancak hava akımı olmayan ve her türlü stres etkeninden uzak bir ortamda bulunması gerekmektedir. Bunun dışında enfeksiyonu taşıyan hasta sığır veya buzağı sağlıklı bireylerden izole edilmelidir (İnci, 2013).

Bu çalışma, Ege Bölgesi'nde bulunan Kütahya ili merkez ilçesine bağlı köylerde 2013-2014 yılları arasında yapılan saha çalışmaları sonucunda, 1-20 haftalık buzağılardan toplanan dışkı örneklerinin PCR-NESTED, PCR-RFLP moleküler yöntemleriyle *Cryptosporidium* spp. protozoonu varlığı ve tür tespiti yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

Kütahya ili merkez ilçesine bağlı 25 köyde saha çalışması yapılmıştır. Saha çalışması neticesinde köylerdeki 1-20 haftalık buzağılardan 100 adet dışkı örneği toplanmıştır. Buzağı dışkıları *Cryptosporidium* varlığı yönünden moleküler yöntemlerle incelenmiştir.



Şekil 2.1. Saha çalışması yapılan köyler (harita üzerinde kırmızı ile işaretlenmiştir).

#### 2.1.1. Kullanılan malzemeler

Ticari Kitler: GeneJET™ DNA Purifikasyon kiti (Thermo Fisher Scientific) Dream Taq™ Green PCR Master Mix), 10X FastDigest Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP Mix 10mM ve DNA jel



Loading Dye (6X) (Thermo Scientific), FastDigest SspI ve FastDigest MboII (Thermo Scientific) kitleri kullanılmıştır.

Kimyasal Malzemeler: %2,5'lik potasyum dikromat, etil asetat, BSA (SİGMA A8820), agaroz, etidium bromür, PBS solüyonu, karbol fuksin 500 ml (Alkim), %0,01'lik loeffler alkali metilen mavisi, %1'lik sülfirik asit, TBE ve TAE solüsyonları ve diğer laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

**Çizelge 2.1.** Kullanılan primerlerin açılımları (Sungur vd., 2008).

Crypto F1	5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG - 3'
Crypto R1	5'- CCCATTTCCCTTCGAAACAGGA - 3'
Crypto F2	5' - GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG - 3'
Crypto R2	5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA - 3'

### 2.1.2. Kullanılan cihazlar

Thermal Cycler Block (Thermo Scientific) PCR cihazı, Santrifüj cihazları (Thermo Scientific, Fuge), block heater (stuart), Otomatik pipetler (Thermo Scientific, Brand), Vorteks (Stuart), Buz makinesi (Hoshizaki), Otoklav (Sanyo), Biyolojik Güvenlik Kabini (Thermo Scientific), 4 °C Buzdolabı (Arçelik), - 20 °C Derin dondurucu (Profilo), Mikrodalga fırın (Zanussi), Saf su cihazları (Şimşek labor teknik, Thermo Scientific), Ultra-violet transillüminatör (Quantum-ST4), Yatay elektroforez tankları (Thermo Scientific, Owl Easycast), Güç kaynağı (Thermo Scientific) (Bilgisayar (Casper), Hassas terazi (Ohaus), Manyetik karıştırıcı (Lab companion, Su banyosu ( JSR, BS-11T) kullanılmıştır.

### **2.1.3. Solüsyonların hazırlanışı**

#### **500 ml 1X TBE ve 1X TAE solüsyonları**

10X TBE solüsyonundan 50 ml alınmıştır ve üzerine 450 ml ultra saf su eklenmiştir. 50X TAE solüsyonundan 10 ml alınmıştır ve üzerine 490 ml ultra saf su ilave edilmiştir. Böylece 1X TBE ve 1X TAE solüsyonları hazırlanmış ve bunlar otoklavlanarak 4 °C de muhafaza edilmiştir.

#### **100 ml 1X PBS solüsyonu**

10X PBS solüsyonundan 10 ml alınmıştır üzerine 90 ml ultra saf su eklenmiştir. Böylece 1X PBS solüsyonu hazırlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

#### **Sığır Serum Albumini (BSA)**

30mg/ml liyofilize toz BSA stoğu üzerine 1 ml ultra saf su eklenerek hazırlandı ve 4 °C muhafaza edilmiştir.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. Dışkının toplanması**

Harita üzerinde işaretli Kütahya ili çevresindeki köylerin buzağı sahibi hanelerinden Kütahya Damızlık Sığır Birliği ekibi yardımları ile numuneler toplanmıştır. Saha çalışmalarına koruyucu kıyafetler ile çıkmıştır. Numuneler, buzağılardan rektal irkiltme yöntemi ile toplanmıştır.

### **2.2.2. Modifiye Kinyoun asit-fast boyama**

Boyama yapılacak lamaların yağlı olabileceği göz önünde bulundurularak iyi boyanmama ihtimaline karşılık etanol ile silinerek temizlenmiştir.

1. Dışkının durumuna göre pipet, cam baget ya da spatül yardımıyla alınan dışkı parçası lama yayılarak kurumaya bırakılmıştır.
2. Daha sonra yaymalar saf metanolle 1 dk. muamele edilmiş ve kurumaya bırakılmıştır.
3. Saf metanolle muamele edilen yaymalar Karbol Fuksin boyası içeren şalede 5 dk. boyanmıştır.
4. Lamalar %50'lik etanolle muamele edildikten sonra musluk suyunda yıkanmıştır.
5. Lamalar, dekolarizasyon için %1'lik sülfirik asit içeren şalede 2 dk. bekletilmiş ve ardından musluk suyunda yıkanmıştır.

6. Lamalar %0,01'lik Loeffler alkali metilen mavisinde 1 dk. bekletilerek musluk suyunda yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.
7. Lamel kullanmadan hazırlanan preparatlar 100x objektifte mikroskop altında incelenmiştir. Daha sonra preparatlar daimi hale getirilmiştir.

### 2.2.3. İşleme tabi tutulacak dışkının potasyum dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) ile saklanması

- Taze dışkılar sahadan laboratuvara getirildiğinde az miktarda saf su eklenerek süzgeç yardımıyla yabancı katı maddelerden ayrıştırılmıştır.
- Daha sonra 10 ml saf su eklenerek sulandırılmış ve üzerine hassas terazide ölçülen 0,25 g  $K_2Cr_2O_7$  eklenerek 4 °C de buzdolabında DNA ekstraksiyonuna kadar saklanmıştır.

### 2.2.4. Dışkının koruyucu maddelerden arındırılması ve DNA ekstraksiyonu

- Potasyum dikromatlı dışkı, yaklaşık 10 ml alınarak 4 adet kapaklı santrifüj tüpüne porsiyonlanmıştır.
- Bu tüpler 3000 rpm de 20 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj basamağının ardından süpernatant atılarak üzerine tekrar distile su eklenmiştir. Dipteki pelleti homojenize ettikten sonra tekrar aynı parametrelerde santrifüj edilmiştir. Bu işlem toplam 4 kere süpernatant şeffaf hale gelene kadar tekrar edilmiştir.
- Son santrifüj basamağından sonra süpernatantın hepsi atılmayarak tüp içerisinde 1 ml hacminde numune bırakılmıştır.

Bu aşamada çalışma koşullarına bağlı olarak tüplerin içindeki pellet ve süpernatantı homojenize edilebilir ve yayma hazırlanarak boyama yapılabilir.

- Bu doğrultuda rastgele seçilen birkaç preparatta modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemi kullanılarak ışık mikroskobu altında incelenen yaymalarda mavi zemin üzerinde pembe boyanmış, muhtemel *Cryptosporidium* ookistleri gözlemlenmiştir.

### 2.2.5. DNA ekstraksiyon hazırlık aşaması

Hazırlanan dört tüp aynı örneğe ait olduğu için her birine 5er ml aynı gün hazırlanan 1x PBS eklenmiş, homojenize edilerek tüpler ikişer ikişer birleştirilmiştir.

Elde edilen iki tüp 3000 rpm de 20 dk. santrifüjlenmiştir.

Süpernatant tamamen dökülerek iki tüpün üzerine 2ml 1x PBS eklenmiş ve homojenize edilmiştir.

Elde edilen bu son ürün DNA ekstraksiyonu için hazır bir hale gelen numunedir.

#### 2.2.6. DNA ekstraksiyonu

1. 200 µl dışkı alınarak üzerine 700 µl su eklenerek 1,5 ml lik santrifüj tüpünde karıştırılmış ve orta şiddette 30 sn. vortekslenmiştir.
2. Yaklaşık 400 µl etil asetat eklenerek ve 13.000g'de 60 sn. santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant atıldıktan sonra yaklaşık 200 µl hacminde kalan sediment 3 defa daha su ile yıkanmıştır (Kurniawan vd., 2009).
4. Yıkanan sediment Thermo Scientific GeneJET DNA Purification Kit içerisinde ki "Cultured Mammalian Cells Genomic DNA Purification Protocol" doğrultusunda ardışık işlem basamaklarına tabi tutulmuştur. Bu protokol;
  - 200 µl Lysis buffer ve 20 µl Proteinase K solüsyonu ekleme homojen olana kadar vorteks uygulaması,
  - Numunenin mukus oranına göre 56 °C de min. 2 saat inkübasyonu,
  - 20 µl Rnase A solüsyonun eklenmesi, vortekslenmesi ve 10 dk.. oda sıcaklığında inkübasyon,
  - 400 µl ethanol ekleme ve vorteksleme,
  - Hazırlanmış lizatın GeneJET Genomic DNA Purification Column içeren toplama tüpüne aktarılması, column içeren tüpün 6.000g'de 1 dk.. santrifüj edilmesi,  
 \*\*Santrifüj sonrası tüp filtresi tıkanır, otoklavlanmış paketli steril kürdanla ateş başında fitreye fazla zarar vermeden tıkanıklık açılabilir ve sonrasında tekrar 6.000g'de 1 dk.. santrifüj edilerek tıkanıklık devam ediyorsa aynı işlem tekrarlanabilir.
  - Süzütünün atılması, column filtresinin kite dahil olan 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmesi,
  - 500 µl Wash Buffer I eklenerek 8.000g'de 1 dk.. santrifüjlenmesi, süzütünün atılması ve column filtresinin tekrar aynı tüpe yerleştirilmesi,
  - 500 µl Wash Buffer II eklenerek maximum hızda ( >12.000 g ) 3 dk. santrifüjlenmesi (tercihen fazla suyu tamamen uzaklaştırmak için maksimum hızda 1 dk. daha santrifüj edilebilir),

- Süzütünün atılması ve column kiti dahil olmayan steril 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne konulması,
- Column filtrenin merkezini hedef alarak 200 µl Elution Buffer eklenmesi ve 2 dk. oda sıcaklığında inkübasyonunun ardından 8.000 g'de 1 dk. santrifüj edilmesi,
- Column filtrenin atılması ve süzüntü olarak kalan DNA'nın direkt -20 °C kaldırılarak yeni bir işlem yapılana kadar muhafaza edilmesi basamaklarını içermektedir.

### 2.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmada buzağılardan toplanan 100 adet dışkıdan pürifiye edilmiş DNA örnekleri, bir adet pozitif örnek ve bir adet negatif örnek kullanılarak PCR ile çalışılmıştır. Çalışmamızda öncelikli olarak zoonotik *C. parvum* ve sığırlarda görülen diğer *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* gibi belli başlı sığır genotiplerinin bulunması hedeflenmiştir. Çalışmaya uygun olarak SSU rRNA bölgesini hedef alan iki set primer dizayn ettirilmiş olup, birinci aşamada kullanılan primeler Crypto F<sub>1</sub> / Crypto R<sub>1</sub>'dir. Sahadan toplanılan dışkı örnekleri DNA ekstraksiyonu sonrasında bu primeler PCR analizi ile amplifiye edilmiştir. PCR hazırlık aşaması şu şekilde uygulanmıştır;

1. Amplifiye edilecek örnek kadar 0,2 ml'lik PCR tüpleri hazırlanmıştır. Amplifiye edilecek örnekler dışında biri pozitif diğeri negatif kontrol olmak üzere iki adet tüp eklenmiştir.
2. Her tüpteki karışım hacminin DNA dahil 25 µl hacimde olacak şekilde tüplere 15,9 µl nükleaz-free su eklenmiştir.
3. Su eklenen tüplerin her birine 2,25 µl 10X PCR Buffer, 3,3 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,55 µl dNTP eklendikten sonra 0,55 µl Crypto F<sub>1</sub> ve 0,55 µl Crypto R<sub>1</sub> primerleri eklenmiştir. Son olarak 0,125 µl Taq polimerase ve 1,3 µl BSA eklenmiştir.
4. İçerisinde karışım bulunan her bir tüpe pürifiye edilmiş DNA'lardan 2,5 µl eklenmiştir. Negatif kontrol için DNA yerine 2,5 µl su eklenirken, pozitif kontrol için DNA olarak hazır *Cryptosporidium* spp. DNA'sı kullanılmıştır.

Hazırlanan PCR karışımı olan tüpler Thermal Cycle cihazına yerleştirilmiştir. PCR protokol programı Çizelge 2.2 'de gösterilmiştir;

**Çizelge 2.2.** PCR protokol programı.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon	94 °C	3 dakika
	94 °C	45 saniye
Annealing	58 °C	45 saniye
Extension	72 °C	1 dakika
	72 °C	7 dakika
	4 °C	Bekleme
<b>Toplam Siklus</b>	30 siklus	

### 2.2.8. Nested PCR

PCR aşamasından sonra amplifiye dizilerinin iç bölgesinin çoğaltılması amacıyla dizayn edilen primerlerin kullanıldığı Nested PCR işlemi yapılmıştır. Yapılan PCR analizi ile elde edilen amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılarak uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. PCR’da elde edilen ilk amplifikasyondan gelen bölgenin, iç bölgesine bağlanmak suretiyle iki iç primer kullanılarak küçük alanın çoğaltılması sağlanmıştır. Nested PCR, *Cryptosporidium* türlerinin PCR ile saptanmasını oldukça kolaylaştırmıştır. PCR’den elde edilen ampliconlar Nested PCR’da kalıp olarak kullanılmış ve Nested PCR analizi için Crypto F2 ve Crypto R2 primerleri kullanılmıştır. Nested PCR analizi ise şu şekildedir:

1. PCR analizine tabi tutulan amplicon sayısı kadar tüp hazırlanmıştır. Bu sayıya ilk analizde kullanılan pozitif ve negatif kontroller de dahil edilmiştir.
2. Hazırlanan her tüpe 17,2 µl nükleaz-free su eklenmiştir.
3. Su eklenen tüplerin her birine 2,25 µl 10X PCR Buffer, 3,3 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,55 µl dNTP eklendikten sonra bu işlemde PCR analizinden farklı olarak 0,55’şer µl Crypto F2 ve Crypto R2 primerleri ve son olarak yine 0,125 µl Taq Polymerase enzimi kullanılmıştır.
4. Her tüp için toplam 25 µl olan bu karışımların her birine DNA olarak PCR ampliconlarından 2,5 µl eklenmiştir. Bu işlem pozitif ve negatif kontrol için de geçerlidir.

Hazırlanan Nested PCR karışımı olan tüpler yine Thermal Cycler cihazına yerleştirilir ve Çizelge 2.3’te gösterilen Nested PCR protokol programı uygulanır.

**Çizelge 2.3.** Nested PCR protokol programı.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon	94 °C	3 dakika
	94 °C	45 saniye
Annealing	58 °C	45 saniye
Extension	72 °C	1 dakika
	72 °C	7 dakika
	4 °C	bekleme
<b>Toplam Siklus</b>	25 siklus	

### 2.2.9. Restriksiyon Fragment Uzaklık Polimorfizmi (RFLP)

Nested PCR işlemi ile hedef DNA dizisinin çoğaltılmasının ardından, ampliconlar tür tayini yapılmak üzere sınırlayıcı enzimlerle kesilerek oda sıcaklığında buz içerisinde bekletilmiştir (Kurniawan, 2009).

Bu çalışmada Thermo Scientific - Fermantas FastDigest SspI ve MboII enzimleri olarak iki tür enzim kullanılmıştır.

RFLP aşamasında kit içerisindeki yönergeler izlenerek aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulanmıştır.

1. Toplamda 30 µl olarak hazırlanacak olan reaksiyon karışımı her iki enzim içinde ayrı ayrı hazırlanmıştır.
2. 10X FastDigest Green PCR Buffer 0,2 ml'lik UTW tüplere otomatik pipet yardımıyla 2 µl eklenmiştir.
3. 17 µl kit içerisindeki nükleaz-free su eklenmiştir.
4. Enzimler ile belirli bölgeleri kesilecek Nested PCR'a tabi tutulmuş DNA ampliconundan 10 µl eklenmiştir.
5. Son aşama olarak bahsi geçen MboII ve SspI enzimlerinden 1'er µl eklenerek reaksiyon karışımı hazır hale getirilmiştir.
6. Isı bloklarında 37 °C de 5 dk. inkübe edilmiştir.
7. 65 °C de 5 dk. bekletilerek enzim inaktif hale getirilmiştir.
8. Bu işlemler neticesinde, önceden hazırlanmış %1'lik agaroz jele yüklenen ampliconlar ve 100 bp'lik ladder ile koşturulur.

### 2.2.10. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR'ı yapılan DNA moleküllerinin analizinde en basit ve en yaygın yöntemlerden biri agaroz jel elektroforezidir. Etidium Bromid boyasının kullanımı ile ultraviyole (UV) ışık altında, görüntüleme cihazında (Quantum-ST4) DNA'nın jel üzerindeki yeri belirlenmiştir.

#### Agaroz Jelin hazırlanması

%1'lik 100 ml Agaroz jelin hazırlanması için;

1. 1 g agaroz 250 ml hacimli erlen içerisine konulup üzerine 100 ml 1X Tris- Asetat EDTA (TAE) solüsyonu eklenmiştir.
2. Mikrodalga fırın içerisine yerleştirilerek eritilmiştir. Jel kaynadıktan sonra alınmıştır.
3. Elektroforez tankında kalıp hazırlanıp amplikonların yerleştirileceği kuyucukları oluşturmak için kullanılan amplikon sayısı göz önünde bulundurularak tarak yerleştirilmiştir.
4. Jel ılık bir ısıya geldikten sonra içerisine 5 µl Etidium Bromür ilave edilmiş, baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek hafifçe sallama suretiyle etidium bromürün jele karışması sağlanmıştır.
5. Etidium bromürlü jel, tarak yerleştirilmiş elektroforez tankının içerisindeki kalıbın içerisine dökülmüştür.
6. Jel donduktan sonra taraklar çıkartılmış ve 1X TAE solüsyonu jelin yüzünü 1 cm aşacak şekilde elektroforez tankına doldurulmuştur.
7. İlk kuyucuğa 1000 bp'lik DNA ladder çalışma solüsyonu yüklenmiştir (RFLP aşaması için 100 bp'lik ladder kullanılmıştır.).
8. Her bir amplikondan pipetle 10 µl alınarak sırası ile kuyucuklara yüklenmiştir (PCR aşamasında ağırlıklı olarak Loading Dye ve RFLP aşamasında ise Dream Taq Master Mix kullanılmıştır.).
9. Güç kaynağına bağlanan elektroforez tankı (Thermo Scientific Owl Easycast) 110 volt, 250 amps'ye ayarlanmış ve jel, büyük tank için yaklaşık 45 dk., küçük tank için yaklaşık 25 dk. koşturulmuştur.
10. Jel görüntüleme ultra-violet transillüminatör (Quantum- ST4) cihazında yapılmıştır.



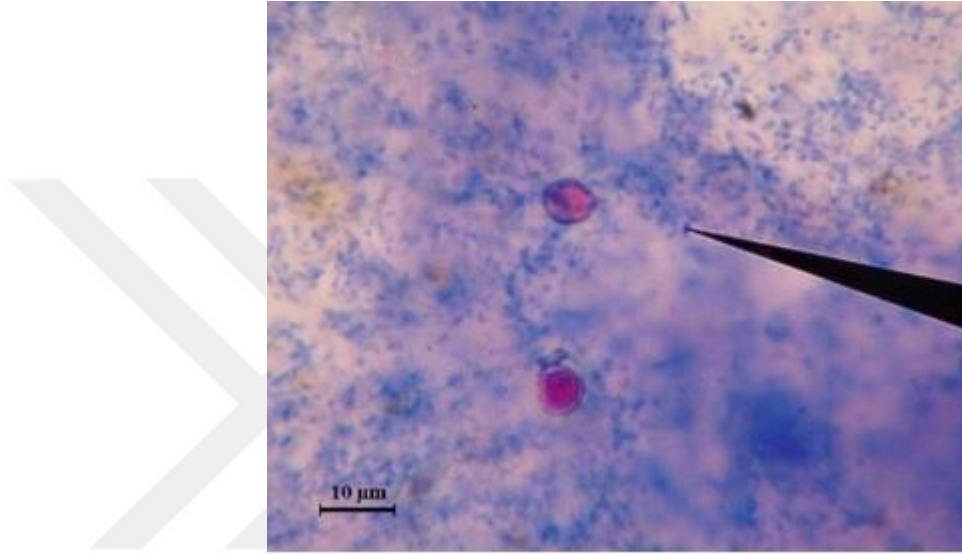
### 2.2.11. Sekans analizi

Sekans analizine gönderilecek ürünler, RFLP yöntemi sonuçlarına göre farklı bant paterni gösteren örnekler olarak gruplandırılmış, bu gruplarda sekans analizi için uygun, temiz bant görüntülerine sahip örnekler seçilmiş ve analizi yapacak olan ticari bir firmaya gönderilmiştir. Sekans analizi sonucunda elde ettiğimiz veriler GenBank'taki verilerle karşılaştırılmıştır. Daha sonra pairwise analizi ve filogenetik ağaç MEGA7 programı, Kimura-2 parameter modeli, Bootstrap (100) metoduna göre düzenlenmiştir.



### 3. BULGULAR

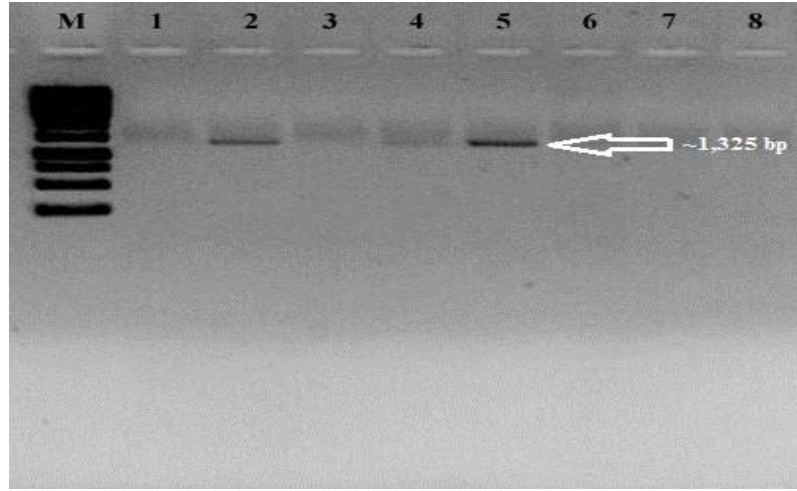
Çalışmamızda, Kütahya ili merkez ilçesine bağlı 25 köyden saha çalışmaları neticesinde 100 dışkı örneği toplanmıştır. Klinik belirtileri göz önünde bulundurularak gruplandırılmış olan dışkı örneklerinden seçilen birkaç preparat modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemi uygulanarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** *Cryptosporidium* varlığının incelenmesi açısından modifiye Kinyoun asit-fast yöntemi kullanılarak hazırlanan preparatların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (100x) (Orijinal).

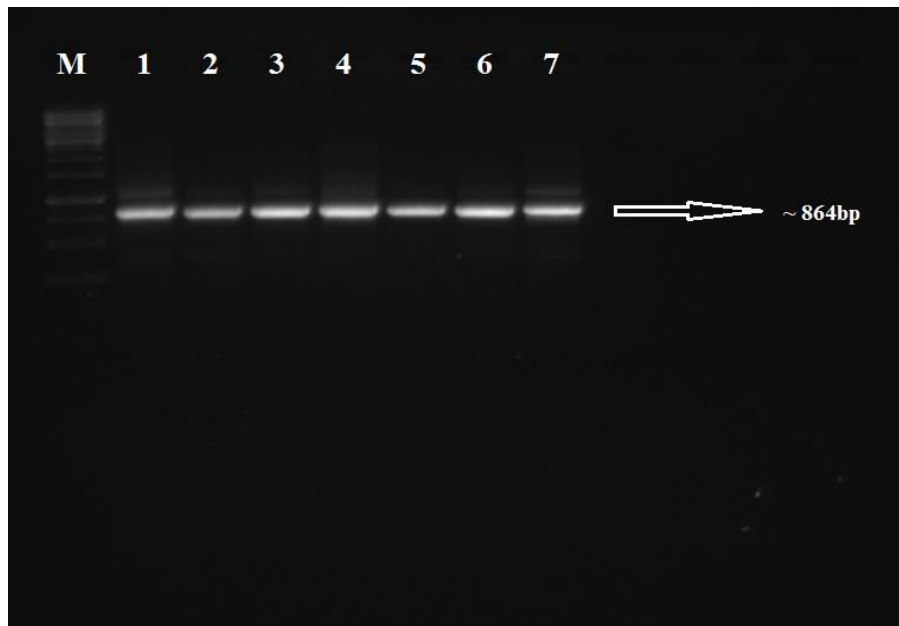
#### 3.1. *Cryptosporidium* spp. 'nin PCR ve Nested-PCR Yöntemi ile Tespiti

DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen total DNA ile Crypto-F<sub>1</sub> ve Crypto R<sub>1</sub> primer seti kullanılarak PCR yapılmıştır. Yapılan PCR sonucunda *Cryptosporidium* türlerinin SSU rRNA kodlayan bölgesinden 1,325 bp uzunluğunda gen bölgesi amplifiye edilmiştir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2** PCR'in 1. aşamasında elde edilen bant görüntüleri ve yaklaşık büyüklükleri. M: Marker (1kb), 1-2-3-4-5-6: İzolatlar, 7: Bilinen Pozitif, 8: Negatif (Orijinal).

PCR analizlerinde *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. belirlenen tüm örneklerin ssrRNA gen bölgesinin Nested PCR ile analizleri sonucunda toplam 18 *Cryptosporidium parvum* ve 22 *Cryptosporidium* spp. pozitif izolatin jel üzerinde izolata bağlı olarak 826-864 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği saptanmıştır. Bazı pozitif izolatlarda parsiyel SSU rRNA gen bölgesinin Nested PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen %1 'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 3.3'te verilmiştir.

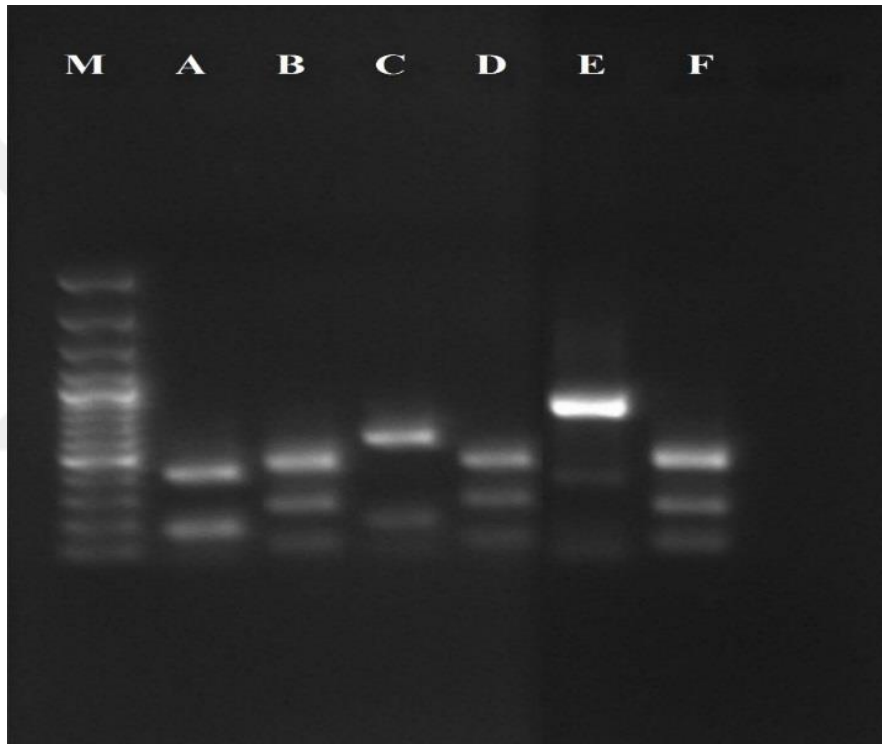


**Şekil 3.3.** Nested PCR neticesinde elde edilen pozitif bant paternleri ve yaklaşık büyüklükleri. M: Marker (1kb), 1-2-3-4-5-6: İzolatlar 7: Bilinen Pozitif (Orijinal).

### 3.2. PCR-RFLP ile *Cryptosporidium* izolatlarının genotiplendirilmesi

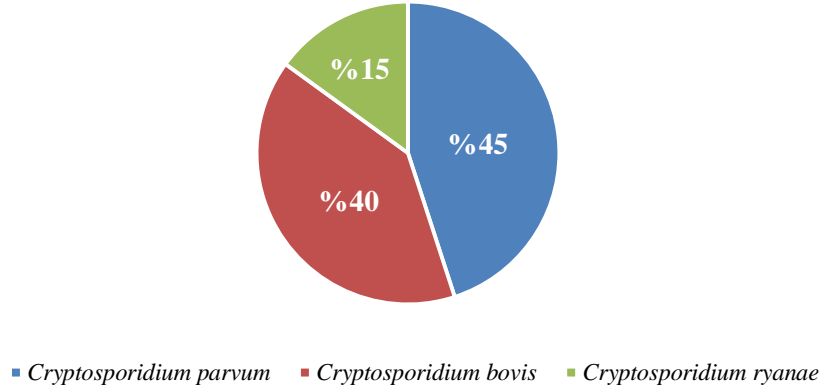
Nested PCR analizleri sonucunda jel üzerinde amplifikasyon gösteren toplam 40 izolatin SspI ve MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucunda örneklerin 18'nin *C. parvum*, 16'nın *C. bovis* ile ve 6'sinin ise *C. ryanae* ile identiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Bazı *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* izolatlarının SspI ve MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin %1'lik jel agaroz görüntüsü Şekil 3.4'te verilmiştir.



**Şekil 3.4.** Bazı pozitif izolatlarda SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin MboII ve SspI restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin agaroz jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); A(MboII)-B(SspI): *C. bovis*; C(MboII)-D(SspI): *C. ryanae*; E(MboII)-F(SspI): *C. parvum* (Orijinal).

### Cryptosporidium Tür Oranları



Şekil 3.5. Örneklerin toplam tür dağılım oranları.

PCR sonuçlarına göre elde edilen pozitif sonuçlar ve çalışma merkezlerine göre dağılımları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

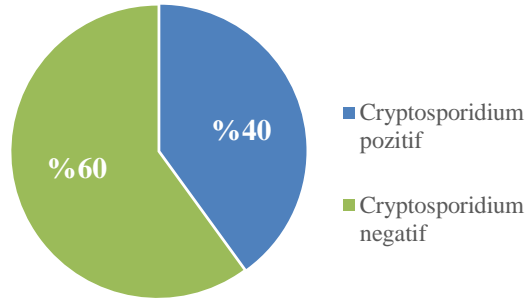
Çizelge 3.1. Kütahya ili merkez ilçesine bağlı 25 köyden saha çalışmaları.

	Köy Adı	Toplandığı Ay	Toplanan Örnek Sayısı	<i>Cryptosporidium</i> Pozitif Örnek Sayısı
1	Kumarı	Haziran	19	8
2	Köprüören/Ağaçköy	Mart	12	7
3	Ahmetoluğu	Mart	7	4
4	Doğa	Şubat-Mayıs	3	3
5	Ortaca	Haziran	7	2
6	Zığra	Nisan	3	2
7	Karaağaç	Şubat/Haziran	4	2
8	Kınık	Haziran	7	2
9	Kızılcaören	Nisan	1	1
10	Sofu	Haziran	1	1
11	Sekiören	Haziran	2	1
12	Gümüş	Haziran	3	1
13	Makas Alanı	Nisan	4	1
14	Yazlıca	Mayıs	1	1
15	İshakçılar	Mayıs	2	1
16	Kızık	Mayıs	1	1
17	Afşar	Ekim	1	1
18	Dereköy	Haziran	2	1
19	Çalça	Haziran	6	-

**Çizelge 3.1.** (Devam) Kütahya ili merkez ilçesine bağlı 25 köyden saha çalışmaları.

	Köy Adı	Toplandığı Ay	Toplanan Örnek Sayısı	<i>Cryptosporidium</i> Pozitif Örnek Sayısı
20	Yenice	Mart	1	-
21	Darıca	Mart	1	-
22	Okçu	Haziran	1	-
23	Demirciören	Haziran	2	-
24	Kepez	Şubat	4	-
25	Dedik	Mayıs	3	-
<b>Toplam</b>			<b>100</b>	<b>40</b>

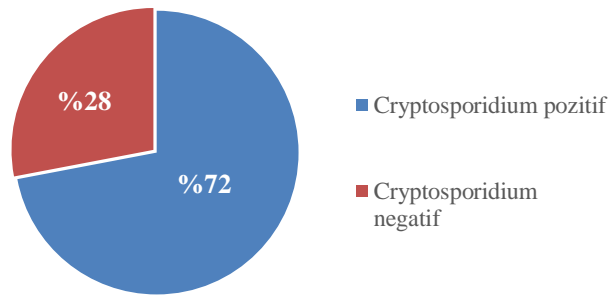
Toplanan örnekler *Cryptosporidium* varlığı yönünden incelemeye tabi tutulmuş, PCR ve Nested PCR analizleriyle %40 oranında *Cryptosporidium* yönünden pozitif bulunmuştur (Şekil 3.6).



**Toplam 100 Sığır (n:100)**

**Şekil 3.6.** *Cryptosporidium* genel dağılımı.

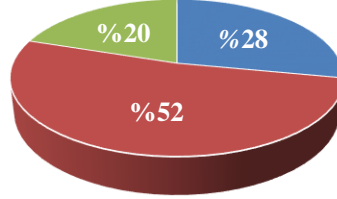
Örnek toplanan 25 köyün % 72'sinde *Cryptosporidium* spp. pozitifliği görülmüştür (Şekil 3.7).



**Toplam 25 Yerleşim yeri (n:25)**

**Şekil 3.7.** Yerleşim yerine göre *Cryptosporidium* dağılımı.

### Yerleşim Yerlerine Göre Tür Dağılımı



- *Cryptosporidium parvum* ■ *Cryptosporidium bovis*
- *Cryptosporidium ryanae*

**Şekil 3.8.** Yerleşim yerlerinde belirlenen pozitif örneklerin tür dağılım oranları.

Köylere göre tür dağılım oranı incelendiğinde köylerin genelinde *C. bovis*'in %52 oranla baskın olduğu tespit edilmiştir. Genel tür dağılımında baskın olan tür olan *C.parvum*' un %28 oranında ve *C. ryanae*'nin ise %20 oranında bulunduğu saptanmıştır.

Pozitif olarak belirlenen örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı Çizelge 3.2'de verilmiştir. RFLP ve sekans analizi neticesinde gruplandırılan pozitif örneklerin  $\leq 1,5$  ay yaş grubunda tür bakımından %50 *Cryptosporidium parvum*, %17,6 *Cryptosporidium ryanae* ve %32,4 *Cryptosporidium bovis* gözlenmiştir. 2 ay  $\leq x \leq 4$  ay yaş grubunda ise %16,7 oranında *C. parvum* ve %83,3 oranında *C. bovis* görülürken bu yaş grubunda *C. ryanae*'ye rastlanmamıştır.

**Çizelge 3.2.** Yaş gruplarına göre *Cryptosporidium* dağılımı.

Yaş Grubu	İncelenen Örnek Sayısı	<i>Cryptosporidium</i> spp. (+)	<i>Cryptosporidium</i> spp. (-)
$\leq 1,5$ ay	75	34	41
2 ay $\leq x \leq 4$ ay	25	6	19
Toplam	100	40	60

### 3.3. Sekans ve Filogenetik Analizler

Enzim ile kesilmiş bant patern görüntüleri sekans analizine gönderilmeden önceden birbirinden farklı kesim gösteren izolatlar gruplanmış ve her gruptan 1 adet örnek sekansa gönderilmiştir. Sekans sonrası gen dizilimleri GenBank sorgulanmış ve %100 oranında yakın görünen kayıtlı izolatlarla bant paternlerinden tahmin edilen türlerin confirmasyonu yapılmıştır. Pozitif belirlenen örneklerde zoonotik özelliğiyle ön plana çıkan *C. parvum* ve buzağılarda teşhis

edilen *C. bovis* ve *C. ryanae* türlerinin teşhisi yapılmıştır. *C. parvum* prevalansı %45, *C. bovis* prevalansı %40 *C. ryanae* prevalansı %15 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda Kütahya Yöresinde yaygınlık gösteren türün zoonotik tür olan *Cryptosporidium parvum* olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Cryptosporidium* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler.

İzolat	Orijin	İzolasyon Kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
CrB1	Türkiye-Burdur	Sığır	<i>C. ryanae</i>	JX886769
B683	Japonya	Sığır	<i>C. ryanae</i>	AB628200
-	Çin	Buzağı	<i>C. ryanae</i>	HQ009807
CbB1	Türkiye-Burdur	Sığır	<i>C. bovis</i>	JX886772
Mannuthy	Hindistan	Sığır	<i>C. bovis</i>	MH166335
ECUST23057	Çin	Buzağı	<i>C. bovis</i>	MF074602
CpB1	Türkiye-Burdur	Buzağı	<i>C. parvum</i>	JX886763
SCA1389	Avusturalya	Sığır	<i>C. parvum</i>	MG516750
B9	Kolombiya	Buzağı	<i>C. parvum</i>	MF142032

Kütahya yöresinde buzağılarda pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmentta dahil edilen izolatların SSU rRNA gen bölgesine göre pairwise alignmentları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

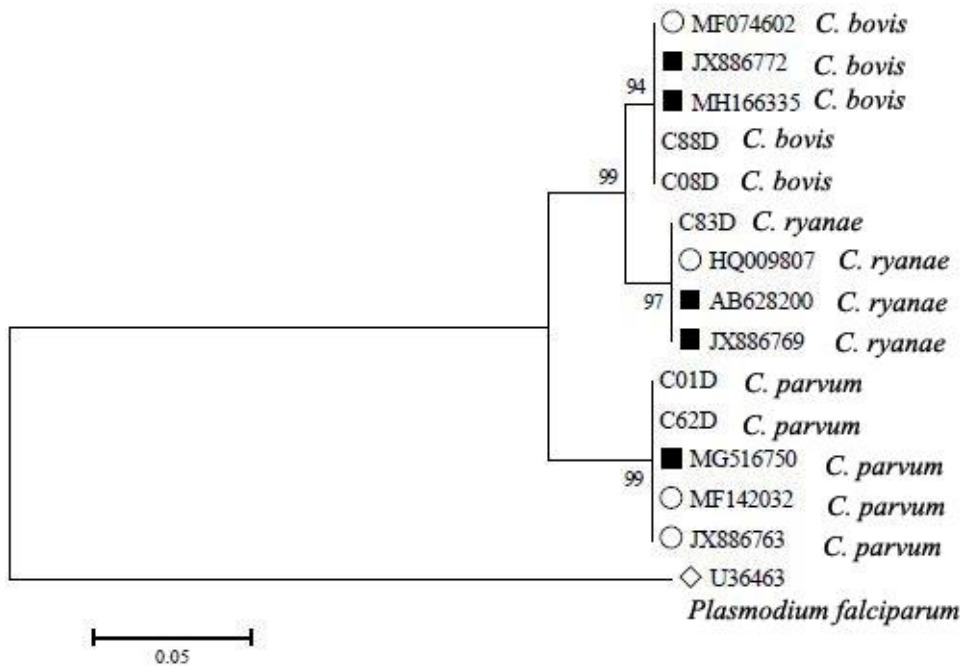


**Çizelge 3.4.** Kütahya izolatları ile dünyadan ve Türkiye’den elde edilen diğer izolatların SSU rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri.

SUŞLAR	AB628200 - <i>C. ryanae</i> _ (Japonya)	C01D - <i>C.parvum</i> _ (Tr/Kütahya)	C08D - <i>C. bovis</i> _ (Tr/Kütahya)	C62D - <i>C.parvum</i> _ (Tr/Kütahya)	C83D - <i>C.ryanae</i> _ (Tr/Kütahya)	C88D - <i>C. bovis</i> _ (Tr/Kütahya)	HQ009807 - <i>C.ryanae</i> _ (Çin)	JX886763 - <i>C. parvum</i> _ (Tr/Burdur)	JX886769 - <i>C. ryanae</i> _ (Tr/Burdur)	JX886772 - <i>C. bovis</i> _ (Tr/Burdur)	MF074602 - <i>C. bovis</i> _ (Çin)	MF142032 - <i>C.parvum</i> _ (Kolombiya)	MG516750 - <i>C.parvum</i> _ (Avustralya)	MH166335 - <i>C. bovis</i> _ (Hindistan)
AB628200 - <i>C. ryanae</i> _ (Japonya)														
C01D - <i>C.parvum</i> _ (Tr/Kütahya)	94													
C08D - <i>C. bovis</i> _ (Tr/Kütahya)	98	95												
C62D - <i>C. parvum</i> _ (Tr/Kütahya)	94	100	95											
C83D - <i>C.ryanae</i> _ (Tr/Kütahya)	100	94	98	94										
C88D - <i>C. bovis</i> _ (Tr/Kütahya)	98	95	100	95	98									
HQ009807 - <i>C.ryanae</i> _ (Çin)	100	94	98	94	100	98								
JX886763 - <i>C.parvum</i> _ (Tr/Burdur)	94	100	95	100	94	95	94							
JX886769 - <i>C. ryanae</i> _ (Tr/Burdur)	100	94	98	94	100	98	100	94						
JX886772 - <i>C. bovis</i> _ (Tr/Burdur)	98	95	100	95	98	100	98	95	98					
MF074602 - <i>C. bovis</i> _ (Çin)	98	95	100	95	98	100	98	95	98	100				
MF142032 - <i>C.parvum</i> _ (Kolombiya)	94	100	95	100	94	95	94	100	94	95	95			
MG516750 - <i>C.parvum</i> _ (Avustralya)	94	100	95	100	94	95	94	100	94	95	95	100		
MH166335 - <i>C. bovis</i> _ (Hindistan)	98	95	100	95	98	100	98	95	98	100	100	95	95	

Çizelge 3.4'teki pairwise analizi neticesinde genetik benzerlik *C. parvum* ve *C. ryanae* grupları arasında ortalama %94; *C. parvum* ve *C. bovis* arasında %95; *C. ryanae* ve *C. bovis* arasında ise %98 olarak saptanmıştır.

Kütahya yöresinde buzağılarda saptanan *Cryptosporidium* izolatları ile dünyadaki diğer benzer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura-2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 3.9'da verilmiştir. Tespit edilen izolatların tür bakımından kendi gruplarında yer aldığı saptanmıştır.



**Şekil 3.9.** Kütahya yöresinde tespit edilen *Cryptosporidium* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer bazı izolatların SSU rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining-Kimura-2 Parameter modeli). Semboller; ■ : Sığır, ○ : Buzağı izolatları ◇ : Dış Grup olarak (U36463:*Plasmodium falciparum*) kullanılmıştır.



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Cryptosporidium* türleri insanlarda, evcil hayvanlarda ve vahşi omurgalılarda bulunan yaygın bir parazittir. *Cryptosporidium* türlerinin bu geniş konak aralığı nedeniyle, cryptosporidiosis bazı durumlarda zoonotik bir hastalık olarak nitelendirilmektedir (Xiao ve Feng, 2008). Sığır yetiştiriciliği dünya genelinde hayvancılık sektöründe önem arz etmektedir. Sığır yetiştirilen işletmelerin devamlılığında önemli olan etken damızlık hayvan ve bunlardan elde edilen sağlıklı buzağlardır. Sağlıklı buzağı denildiğinde; doğumu takip eden ilk birkaç gün ile neonatal dönemde ve daha sonraki altı aylığa kadar olan süre zarfında bakteriyel, viral ve paraziter gibi enfeksiyon etkenlerinden korunan buzağı akla gelmektedir. (Santín ve Trout, 2008). Buzağlarda ishal etkenlerinden olan *Cryptosporidium* ilk sıralarda yer almaktadır. Buzağlarda cryptosporidiosis, yeni doğan buzağlarda sulu yeşil renkte ishal, giderek artan dehidrasyon ve ölüme kadar devam edebilen bir tablo oluşturmaktadır (Şimşek, 2011). Birçok moleküler epidemiyolojik çalışma yaygın olarak *Cryptosporidium* türleriyle, sığırların enfekte olduğunu işaret etmektedir. Šlapeta (2013), yirmi sekiz *Cryptosporidium* türünün isimlendirildiğini bildirmiştir. İsimlendirilen türlerin içinde sığırları enfekte ettiği bilinen başlıca türler; *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* ve *Cryptosporidium andersoni*'dir. Ancak bilinen dört tür dışında *C. suis*, *C. hominis*, *C. serpentis*, *C. xiao*, *C. ubiquitum*, *C. meleagridis*, *C. muris* ve *C. felis* gibi türler de nadiren tespit edilmiştir (Gong vd., 2017). Bu türlerden *C. parvum* insanlarda zoonoz olarak cryptosporidiosis'e neden olması bakımından en önemli tür olarak bilinmektedir (Arslan, 2015). *Cryptosporidium parvum*, özellikle, neonatal buzağlarda ince bağırsakları enfekte eder ve şiddetli diyare ile seyreden hastalık tablosuna yol açarken; *C. andersoni* genç ve yetişkin sığırlarda abomasuma yerleşmekte ve süt üretiminin azalmasına etki etmektedir. *Cryptosporidium bovis* ve *C. ryanae* genellikle semptom göstermemektedir. Thomson (2016), yaptığı çalışmada genç ve yetişkin sığırların da *C. parvum* ookisti attığını rapor etmiştir. Bu nedenle genç ve yetişkin sığırların, neonatal buzağlar için enfeksiyon rezervuarı olabileceğini belirtmiştir.

İlk olarak 1907 yılında Ernest Edward Tyzzer tarafından tanımlanan *Cryptosporidium* etkenleri, dünyada 1970'li yıllarda ülkemizde ise ilk olarak 1984 yılında

bildirilmiştir (Şimşek, 2011; Arslan, 2015). *Cryptosporidium* enfeksiyonları tüm dünyada görülmektedir.

Prevalans çalışmaları, dünyada 1990'lı yılların ortalarından önce görülmeye başlanmıştır (İtik-Ekinci, 2012). Mikroskopik incelemeye dayanan daha sonraki prevalans verileri, sığırlarda *Cryptosporidium*'un dünya çapında varlığını ortaya koymaktadır (İtik-Ekinci, 2012). Yapılan birçok çalışmada sığırlarda bildirilen prevalans oranının %0 ila %100 arasında değişmekte olduğu gözlenmiştir. *Cryptosporidium* ookistlerinin prevalansında sürü büyüklüğü, doğum zamanı, süten kesilme zamanları, yaş aralıkları, yetiştirme tipi, su kaynakları: ahırlardaki su tankları ve buldukları bölgedeki durgun göl ve göletler risk faktörleri olarak bildirilmiştir (Sarı vd., 2008).

Dünyada son otuz yılda *Cryptosporidium* ookist teşhisinde konvansiyonel yöntemler yerine moleküler yöntemler tercih edilse de, düşük maliyet nedeniyle konvansiyonel yöntem kullanan ülkeler bulunmaktadır. Bu yöntemle *Cryptosporidium* ookisti prevalansı üzerine çalışmalar yapan bazı ülkeler ve *Cryptosporidium* oranları şu şekildedir; Çek Cumhuriyeti'nde %25,8 (Kvác vd., 2006), Tunus'ta %86,7 (Soltane vd., 2007), Nijerya %23,4 (Ayinmode ve Fagbemi, 2010) ve İsveç %96 (Silverlås vd., 2009).

Türkiye'de ise bugüne kadar yapılan çalışmaların genellikle konvansiyonel parazitolojik yöntemlerle olduğu, moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalar ve moleküler tiplendirme çalışmalarının az sayıda olduğu belirtilmiştir (Şimşek, 2011; Sarı vd., 2008). Buzağılarda *Cryptosporidium* spp. ookistleri farklı bölge ve mevsimlerde konvansiyonel yöntemlerle yapılan mikroskopik çalışmalarla; Karacabey harasında %26,7 (Burgu, 1984), Özer ve Erdoğan (1990), Elazığ'da %7,2 (Sarı vd., 2008; Şimşek, 2011), Özlem vd. (1997), Aydın'da %10,7 (Sarı vd., 2008; Şimşek, 2011), Kars'ta %25,7- %38,8 (Arslan vd., 2001; Sarı vd., 2009); Arslan vd. (2003) %32,9 (Sarı vd., 2008; Şimşek, 2011), Çeliksöz vd. (2003), Konya'da %27,33 (Sarı vd., 2008; Şimşek, 2011;), Sivas'ta %8,0 (Değerli vd., 2005); Mamak vd. (2000) %70,3 (Sarı vd., 2008), Ankara'da %35,8 (Sahal vd., 2005), Hakkari'de %22,14 (Göz vd., 2007), Van'da %13,2 (Gül vd., 2008), Erzurum %22,8 (Sarı vd., 2008), Samsun %57,9 (Karaman vd., 2017) oranında tespit edilmiştir (Şimşek, 2011).

Çalışmamızla benzerlik gösteren dünya genelinde sığırlarda *Cryptosporidium* prevalansı üzerine moleküler yöntemlerle yapılmış bazı çalışmalar şu şekildedir:

Moğalistan Tuv Aimag bölgesinde 460 örnek sığırlarda *Cryptosporidium* açısından incelenmiştir. SSU rRNA gen bölgesini hedef alan Nested PCR yapılmış ve elde edilen PCR ürünleri *VspI*, *SspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Örneklerin sekans analizinde enfeksiyona neden olan yaygın türlerin *C. bovis* ve *C. andersoni* olduğu saptanmıştır (Burenbaatar vd., 2008).

Batı Fransa' da süttten kesilmemiş 2-21 aylık buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla 182 dışkı örneği toplanmıştır. 18S rRNA geni hedef alınmış ve Nested PCR ile çoğaltılmış daha sonrasında da *SspI* ve *MboII* enzimleri ile kesilerek *Cryptosporidium* türlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. RFLP analizi ile genotiplendirilen 61 örneğin 14 tanesi *C. parvum*, 15 örnek *C. bovis*, 22 örnek *C. ryanae*, 10 örnekte ise *C. bovis* ve *C. parvum* 'un karışık kombinasyon gösterdiği saptanmıştır (Rieux vd., 2013).

Hindistan'da 2012-2013 yılları arasında sığırlardan ve bufalolardan toplanan 391 dışkı örneğine çeşitli konvansiyonel yöntemlerle pozitiflik teşhisi yapıldıktan sonra moleküler yöntemlerle tür tayini yapılmıştır. İncelenen dışkı örneklerinin 145'i sığırlara aittir ve sığırlarda PCR-Nested PCR ve RFLP analizleri sonucunda %34,48 oranında pozitiflik teşhis etmişlerdir. Sekans verilerinin sonucu sığırlarda görülen 3 türe (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*) de rastlanıldığını göstermiştir. *C. andersoni* türü ise dışkı örneklerinin sadece 9 adetinde morfometrik analiz ile tespit edilmiştir (Hingole vd., 2017).

Ülkemizde cryptosporidiosis üzerine moleküler çalışmalar;

Sungur vd. (2008), ishal şikayeti ile hastanelere başvuran 18 çocuk ve ishal tablosuna sahip 27 buzağı dışkısı olmak üzere toplamda 45 dışkı numunesini Nested PCR ile incelemişlerdir. Yirmi yedi buzağı dışkısının 8'inde (%29,7) ve 18 çocuk dışkısının 1'inde (%5,6) toplamda 9 dışkı örneğinde (%20) *Cryptosporidium* spp. pozitifliği tespit etmişlerdir.

Konvansiyonel yöntemlere alternatif olan, teşhis ve genotiplendirmede hassasiyeti yüksek PCR yönteminin direkt ve indirekt işleme tabi tutulan dışkılarda cryptosporidiosis tanısındaki etkisini araştırmak amacıyla, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Parazitoloji Kliniği'nde 22 hastaya ait 33 dışkı numunesinden 23 örnek derhal işleme tabi tutulmuş, kalan 10 örnek ise %10'luk formalinde saklanmıştır. Otuz üç dışkı örneğinin

hepsi Nested PCR yöntemi ile incelenmiş ve sonuç olarak taze olarak işlem gören örneklerin cryptosporidiosis tanısı açısından özgüllüğü ve hassasiyeti %100 bulunurken formalinde saklanan dışkılarda bu oranın %50 ye düştüğü saptanmıştır (Dirim-Erdoğan vd., 2009).

Ankara'da yapılan farklı bölgelerindeki hastanelere yapılan 98 ishali hastanın dışkı örnekleri ve Ankara'daki değişik sığırcılık işletmelerinde 32 buzağıdan toplanan totalde 130 örnek Nested PCR ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda buzağı örneklerinde %37,5 ve insanlarda % 1,02 oranında *Cryptosporidium* spp. pozitifliği tespit edilmiştir. (Sakarya vd., 2010).

Şimşek (2011), Nevşehir yöresinde yaptığı çalışmada 150 buzağı dışkısı örneğini Real Time PCR ile incelemiş ve bu örneklerin %20,7'sinin cryptosporidiosis bakımından pozitif olduğunu belirtmiştir.

Burdur yöresinde yapılan çalışmada ise toplam 250 sığır incelemesi yapılmış bunların %93'ü Real Time PCR analizleriyle cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada aynı zamanda Nested PCR sonuçları Real Time PCR ile karşılaştırılmış Nested PCR pozitif 76 örneğin TaqMan Real Time PCR ile analizi sonucu ile tamamının *Cryptosporidium* pozitif olduğu ve Nested PCR negatif 174 örneğin TaqMan Real Time PCR ile analiz edilmesiyle 17'sini *Cryptosporidium* pozitif 157'sinin negatif olduğu saptanmıştır. Nested PCR'ın Real Time PCR yöntemi ile kıyaslanması neticesinde sensitivite oranının %82 ve spesifite oranının ise %100 olduğu belirlenmiştir (Yıldırım vd., 2012).

Erzurum'da 2013 yılında 5 ayrı mandıradaki 307 tane süttten kesilmemiş buzağılardan alınan dışkı örnekleri DNA ekstraksiyonu sonrasında Nested PCR yöntemi kullanılarak ssrRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmıştır. Örneklerin %3,9' u *Cryptosporidium* açısından pozitif çıkmıştır. Sekans analizi sonucunda hayvanlarda bulunan tek örneğin *C. parvum* olduğu rapor edilmiştir (Güven vd., 2013). Çalışmamızda ise 25 ayrı köyden 100 buzağı dışkısı örneği incelenmiş olup örneklerimizin %40'nın cryptosporidiosis bakımından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Örneklerimizin tür tayini neticesinde *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Kütahya ilinin civar köylerinden toplanan ve Nested PCR ile incelemesi yapılan 100 buzağı dışkısı örneğinin %40'ı cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur. Uygulanan bu teknik ile pozitif belirlenen örneklerde zoonotik özelliğiyle ön plana çıkan *C. parvum* ve buzağılarda teşhis edilen *C. bovis* ve *C. ryanae* türlerinin teşhisi yapılmıştır. *C. parvum* prevalansı %45, *C. bovis* prevalansı %40, *C. ryanae* prevalansı %15 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda Kütahya yöresinde sayısal oran olarak baskın olan türün aynı zamanda zoonotik tür olan *Cryptosporidium parvum* olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın tür oranları yerleşim yerlerinde yaygınlık bakımından incelendiğinde 25 köyün 13'ünde (%52) bulunmasıyla *C. bovis*'in baskın, 7 köyde (%28) *C. parvum*'un ikinci sırada ve onu sadece 5 köyde (%20) tespit edilen *C. ryanae*'nin izlediği görülmüştür.

Genetik benzerlik *C. parvum* ve *C. ryanae* grupları arasında ortalama %94; *C. parvum* ve *C. bovis* arasında %95; *C. ryanae* ve *C. bovis* arasında ise %98 olarak saptanmıştır. Ülkemizde Burdur yöresinde Yıldırım vd. (2012), yaptıkları çalışmada *C. ryanae* ve *C. bovis* kıyaslamalarının sonucunu %100 identik olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda izole ettiğimiz *Cryptosporidium* türlerinin ~864 bp nükleotid dizisi genel olarak analizlerimizde kullandığımız diğer ülke örnekleri ve Türkiye örnekleri ile %100 identiklik göstermektedir. Tür bazında incelersek *Cryptosporidium parvum* izolatlarımız C01D ve C62D GenBank'a kayıtlı Avusturalya ve Kolombiya (M6516750 ve MF142032) ile %100 identiklik gösterirken, *Cryptosporidium bovis* izolatlarımız olan C08D ve C88D, Hindistan ve Çin (MH166335 ve MF074602) ile %100 identiklik göstermiştir. Aynı şekilde izolatımızda Çin ve Japonya (HQ009807 ve AB628200) ile %100 identiklik göstermektedir.

Kütahya yöresinde buzağılardan elde edilen *Cryptosporidium* izolatları ile dünyadan benzer diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura-2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacında tespit edilen izolatların tür bakımından kendi gruplarında yer aldığı görülmüştür.

Sonuç olarak, Kütahya ili çevresinde ilk defa yapılan bu çalışmada toplam 25 köyde saha araştırması yapılmış ve 100 örnek toplanmıştır. Bu köylerin %72'sinde (18 tanesi) %40 oranında *Cryptosporidium* pozitifliği görülmüştür (Çizelge 3.1). 2013-2014 yılları arasında yapılan saha çalışmalarında toplanan ve pozitif olduğu belirlenen örnekler



yaş gruplarına göre ayrılmış ve örneklerin tür tayini oranları hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). Bu verilere göre  $\leq 1,5$  ay yaş grubundaki pozitif örneklerde *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium bovis* ve *Cryptosporidium parvum* türlerinin varlığı tespit edilmiştir. Buna karşılık diğer bir yaş grubu olan  $2 \text{ ay} \leq x \leq 4 \text{ ay}$  aralığında *C. ryanae* türüne rastlanmamıştır ve örnek alınan buzağılardan yaşı en büyük olan buzağıda (4 aylık) bu yaş aralığında sık karşılaşılmayan *C. parvum* tespit edilmiştir. Bu durumun *C. parvum* taşıyan yeni doğanlarla bir arada bulunduğu bir dönem olduğu veya bu etkeni taşıyan buzağı ya da buzağıkların temas ettiği alanlarda bulunduğu düşünülmüştür. Yine sekans analizleri neticesinde elde ettiğimiz veriler doğrultusunda Kütahya ili çevresinde %45 oranında baskın olan türün *C. parvum* olduğu görülmüştür. Baskın *Cryptosporidium parvum* türünün zoonotik olması hem diğer çiftlik hayvanları hem de hayvan sahipleri bakımından olumsuz bir durum teşkil etmekle beraber yeterli korunma yöntemi ve hijyen standartları sağlandığında hastalığın önlenildiği bilinmektedir. Ancak çalışmamız neticesinde Kütahya ili çevresindeki köylerde sanitasyon çalışmalarının yetersiz olduğu elimizdeki veriler ile kanıtlanmıştır. Çalışmamız süresince de örnek topladığımız ileri seviyede ishalleri buzağı vakalarının kısa bir sürede öldüğü gözlenmiştir.

Hayvan kayıplarının artmaması ve olası salgınların önüne geçilmesi amacıyla çalışmamızın bir örnek teşkil etmesini ummakta ve gelecek çalışmaların hem insan hem de hayvan sağlığı açısından ele alınarak daha kapsamlı bir şekilde yürütülmesinin olumlu yönde olacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aksoy, U., Akısu, C., Şahin, S., Uslucay, S., Yalçın, G., Kuralay, F., Oral, A. M., (2007). First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. *Euro Surveill.* 12(7), 3142.
- Arslan, M. Ö., Gıcık, Y., Erdoğan, H., M., Sarı, B. (2001), Prevalence Of *Cryptosporidium* spp. Oocyst in Diarrhoeic Calves in Kars Province, Turkey. *Turkish Journal Veterinary and Animal Science.* 25, 161-164.
- Arslan, M. Ö. (2012). Sığır ve Koyunlarda Cryptosporidiosis, *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Science*, 3(2), 9-15.
- Arslan, M.Ö. (2015, 24-25 Ekim). Zoonotik Cryptosporidiosis. 5. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Erzurum.
- Ayinmode, A. B., Fagbemi, B. O. (2010). Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in Cattle from South Western Nigeria. *Veterinarski Arhiv*, 80(6), 723-731.
- Barry, J. D., Ginger, M. L., Burton, P., McCulloch, P. (2003). Why are parasite contingency genes often associated with telomeres?. *International Journal for Parasitology*, 33(1), 29-45.
- Barta, J. R., Thompson, R. C. A. (2006), What is the *Cryptosporidium* ? Reapprising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, 22(10), 463-468.
- Berger, S. (2017). *Gideon Informatics Cryptosporidiosis: Global Status: Cryptosporidiosis in Turkey*, 92-94. Retrieved from
- Bilal, T. (2013). *Buzağı ve Dana Hastalıkları. Sığır Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, s.521.
- Bişkin, Z., Yıldırım, A., İnci, A., Düzlü, Ö. (2011). Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine University. Erciyes.* 8(1), 43-51.
- Blackman, M. J., Bannister, L. H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: Biology and isolation by subcellular fractionation, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 117(1). 11-25.
- Borowski, H., Thompson, R. C. A., Armstrong, T., Clode, P. L., (2009). Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology.* 137 (1). 13-26.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bouزيد, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., Tyler, K. M. (2013). *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (1), 115-134.
- Brook, E. J., Hart, C. A., French, N. P., Christley, R. M., (2009). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *The Veterinary Journal*, 179, 378-382.
- Burenbaatar, B., Bakheit, M. A., Plutzer, J., Suzuki, N., Igarashi, I., Ongerth, J., Karanis, P. (2008). Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. *Parasitology research*, 102(5),901-905.
- Burgu, A. (1984). Türkiye’de Buzağlarda *Cryptosporidium*’ların Bulunuşu ile İlgili İlk Çalışmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31(3), 573-585.
- Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J., Beach, M. J. (1999). Chlorine Disinfection of Recreational Water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*. 5 (4), 579–84.
- Chalmers, R. M., Davies, A. P., (2010). Mini review: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124 (1), 134-146.
- Chalmers, R.. M., Katzer, F., (2013). Looking for *Cryptosporidium*: The Application of Advances in Detection and Diagnosis, *Trends in Parasitology*, 29 (5), 237-251.
- Checkly, W., White, A. C., Jaganath, D., Arrowood, M. J., Chalmers, R.. M., Chen, X. M., Fayer, R., Griffiths, J., Guerrant, R.. L., Hedstrom, L., Huston, C. D., Kotloff, K. L., Kang, G., Mead, J. R., Miller, M. Jr.,Petri, W. A., Priest, J. W., Roos, D. S., Striepen, B., Thompson, R.. C. A., Ward, H. D., Voorhis, W. A. V., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E. R., (2015). A review of the global burdens novel diagnostic, therapeutics and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infection Disease*, 15(1), 85-94.
- Current, W. L., Reese, N. C., (1986). A Comparison of Endogeneous Development of Three Isolates of *Cryptosporidium* in Suckling Mice. *Journal of Protozoology*, 33 (1), 1550-7408.
- Current, W. L., Garcia, L. S., (1991), *Cryptosporidiosis*, *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 325–358.
- Değerli, S., Çeliksöz, A., Kalkan, K., Özçelik, S., (2005). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Cows and Calves in Sivas. *Turkish Journal Veterinary and Animal Science*, 29, 995-999.
- De Jong, B., Engberg, J., Petersen, E., (1998), Multiple microbial agents associated with a waterborne outbreak among Scandinavian tourists in Turkey, *Euro Surveill*. 2(47).

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dirim-Erdoğan, D., Dağcı, H., Turgay, N., Akarca, U. S., Alkan, M. Z., (2009). The Molecular Diagnosis of Cryptosporidiosis in Fresh and Formalin Preserved Fecal Samples. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(2), 120-124.
- Doğruman-Al, F. (2011). Cryptosporidiosis. In: Metin Korkmaz ve Ülgen Zeki Ok (Eds.). *Parazitolojide Laboratuvar, Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir*, 23, 359-364.
- Drisdelle, R. (2010). *Parasites: Tales of Humanity's Most Unwelcome Guests.*, Los Angeles, CA: University of California Press, 59-82.
- Fayer, R., Ungar, P. L. B. (1986). *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50(4), 458-483.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30 (12-13),1305-1322.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126 (1-2), 37-56.
- Fayer, R., Santín M., Trout, J. M. (2008a). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156 (3-4), 191-198.
- Fayer, R. (2008b). General Biology. In L. Xiao ve R. Fayer (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press, 1-42.
- Fayer, R., (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 126, 1-10.
- Ghazy, A. A., Abdel- Shafy, S., Shaapan, R. M. (2015). Cryptosporidiosis in Animals and Man: 1. Taxonomic Classification, Life Cycle, Epidemiology and Zoonotic Importance. *Asian Journal of Epidemiology*, 8, 48-63.
- Gong, C., Cao, X. F., Deng, L., Li, W., Huang, X. M., Lan, J. C., Xiao, Q. C., Zhong, Z. J., Feng, F., Zhang, Y., Wang, W. B., Guo, P., Wu, K. J., Peng, G. N. (2017). Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China : a review. *Parasite*, 24 (1), 1-10.
- Gormley F. J., Little, C. L., Chalmers R. L., Rawal, N., Adak, G. K. (2011). *Zoonotic Cryptosporidiosis from Petting Farms, England and Wales, 1992-2009*. *Emerging Infection Disease* 17(1), 151.
- Göz, Y., Gül, A., Aydın, A. (2007). Hakkari Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* sp.'nin Yaygınlığı. *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 18 (2),37-40.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Grody, W. W., Nakamura, R. M., Strom, C. M., Kiechle, F. L. (2010). Molecular Diagnostics: Techniques and Application for the Clinical Laboratory, First Edition, United States of America. Academic Press s. 289-300.

Gül, A., Çiçek, M., Kılınç, Ö. (2008). Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van Province. Türkiye Parazitoloji Dergisi 32 (3), 202-204.

Güven, E., Avcıoğlu H., Balkaya, İ., Hayırlı, A., Kar, S., Karaer, Z. (2013). Prevalence of Cryptosporidiosis and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Calves in Erzurum. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19 (6), 969-974.

Hazer, Y. (2007). Afyonkarahisar Bölgesindeki Risk Gruplarında *Cryptosporidium parvum* Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Hingole, A. C., Gudewar, J. G., Pednekar, R. P., Gatne, M. L. (2017). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in cattle and buffalo calves in Mumbai region of India. Journal of Parasitic Diseases, 41,131.

Hotchkiss, E., Thomson, S., Wells, B., Innes, E., Katzer, F. (2015). Update on the role of cryptosporidiosis in calf diarrhoea. Livestock. 20 (6), 2-6.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

İnci, A. (2013). Sığırlarda Cryptosporidiosis. In: Mehmet Ali Özcel (Eds.). *Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları Cilt-I*, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. 24. İzmir

İtik-Ekinci, A., (2012). Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, T.C. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 143s.

Karaman, Ü., Kolören, Z., Seferoğlu, O., Ayaz, E., Demirel, E. (2017). Samsun İl ve İlçelerinden Alınan Çevresel Sularda Parazitlerin Varlığı, Türkiye Parazitoloji Dergisi 41, 19-21.

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

Kelley, A. S., (2014). "Defining Serious Illness. Journal of Palliative Medicine. 17 (9): 985.

Kurniawan, A., Dwintasari, S. W., Soetomenggolo, H. A., Wanandi, S. I. (2009). Detection of *Cryptosporidium* sp. Infection by PCR and Modified Acide Fast Staining from Potassium Dichromate Preserved Stool. Medical Journal of Indonesia, 18 (3), 147-152.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kváč, M., Kouba, M., Vítovec, J. (2006). Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 137 (3-4), 202-209
- Mac Kenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmirerczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P. (1994). A Massive o-Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. *The New England Journal of Medicine*, 331 (3), 161-167.
- Marwal, A., Sahu, A. K., Gaur, R. K. (2014). Molecular Markers: Tool for Genetic Analysis. In A. S. Verma ve Singh A. (Eds.), *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, United States, Elsevier, 291-292.
- Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., Delauw, M. F. C. (2005). Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. *International Journal Parasitology*, 35, 829-849
- Meuten, D.J., Van Kruiningen, H.J., Lein, D. H. (1974). Cryptosporidiosis in calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 165 (10), 914-917.
- Mirhashemi, M. E., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F. E., Mulcahy, G., De Waal, T. (2015). Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental Parasitology*, 151-152, 14-20
- Morrisette, N. S., Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (1), 22-38
- Mor, M. S., Tumwine, K. J., Ndeezi, G., Srinivasan, G. M., Kaddu-Mulindwa, H. D., Tzipori, S., Griffiths, K. J. (2010). Respiratory Cryptosporidiosis in HIV-Seronegative children, Uganda: Potential for Respiratory Transmission. *Clinical Infection Disease*, 50, 1366-1372
- Nichols, G. (2008). Epidemiology. In L. Xiao ve R. Fayer (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press, 79-118.
- O'Donoghue, J. P. (1995). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals, *International Journal for Parasitology*, 25 (2), 139-195.
- O'Hara, S. P., Chen, X. M. (2011). The cell biology of *Cryptosporidium* infection, *Microbes and Infection*, 13 (8-9), 721-730.
- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L. (2001). *Cryptosporidium* virulence determinants – Are we there yet ?, *International Journal for Parasitology*, 32, 517-525.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olson, M. E., O'Handley, R. M., Ralston, B. J., McAllister, T. A., Thompson, R. C. A. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infection in cattle. *Trends in Parasitology*, 20 (4), 185-191.
- Pancieria, R.T., Thomassen, R.W. (1971). Cryptosporidial Infection in a calf. *Veterinary Pathology*, 8, 479-484.
- Reduker, D. W., Speer, C. A. (1985). Factors Influencing Excystation in *Cryptosporidium* Oocyst from Cattle. *Journal of Parasitology*, 71 (1), 112-115
- Rieux A., Paraud C., Pors, I., Chartier, C. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Veterinary parasitology*, 197, 7-12
- Ryan, U., Hijjawi, N. (2015). New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology*, 45 (6), 367-373
- Sahal, M., Karaer, Z., Yasa Duru, S., Çizmeçi, S., Tanyel, B. (2005), Cryptosporidiosis in newborn calves in Ankara region; clinical, haematological findings and treatment with Lasalocid-NA, *Dtsch. Tierartl. Wochenschr.* 112(6), s. 203-8, 210
- Sakarya, Y., Kar, S., Tanyüksel, M., Karaer, Z., Babur, C., Vatansever, Z. (2010). Detection of *Cryptosporidium* spp. in Humans and Calves Through Nested PCR and Carbol Fuchsin Staining Methods in Ankara, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(6), 977-980.
- Santín, M., Trout, J., M. (2008). Livestock. In L. Xiao ve R. Fayer (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Second Edition, Boca Raton, CRC Press, pp. 451-484
- Sarı, B., Aktaş, M. S., Arslan, M.Ö. (2008). Erzurum Yöresinde Buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin Prevelansı, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (2), 116-119.
- Sarı, B., Arslan, M. Ö., Gıcık, Y., Kara, M., Taşçı, G. T. (2009). The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, 41 (5), 819-826.
- Scholtyssek, E. (1979). *Fine Structure of Parasitic Protozoa: An Atlas of Micrographs, Drawings and Diagrams*, Heidelberg, Berlin Springer Verlag. 291-292.
- Sevindik, E., Abacı, Z. T. (2013). Nested PCR ve Kullanım Alanları, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 22-26.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Silverlås, C., Emanuelson, U., Vedier, K., Björkman, C. (2009). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 90 (3-4), 242-253.

Silverlås, C. (2010). *Cryptosporidium* Infection in Dairy Cattle: Prevalence, species distribution and associated management factors, unpublished PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.

Šlapeta, J., Morin-Adeline, V. (2011, May 18). Apicomplexa Levine 1970. Sporozoa Leucart 1879, Retrieved from <http://tolweb.org/Apicomplexa/2446/2011.05.18>

Šlapeta, J. (2013). Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow?. *International Journal for Parasitology*, 43, 957-970.

Snelling, W.J., Lin, Q., Moore, J.E., Millar, B.C., Tosini, F., Pozio, E., James S. G., Dooley, J.S.G, Lowery, C. J. (2007). Proteomics Analysis and Protein Expression during Sporozoite Excystation of *Cryptosporidium parvum* (*Coccidia*, *Apicomplexa*)\*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(2), 346–355.

Soltane, R., Guyot, K., Dei-Cas, E., Ayadi, A. (2007). *Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida: Crptosporiidae) in calves: Results of a Longitudinal Study in a Dairy Farm in Sfax, Tunisia. *Parasite*, 14, 309-3012.

Spano, F., Crisanti, A. (1999). *Cryptosporidium parvum*: The Many Secrets of a Small Genome. *International Journal for Parasitology*, 30, 553-565.

Sungur, T., Kar, S., Güven, E., Aktaş, M., Karaer, Z., Vatanserver, Z. (2008). *Cryptosporidium* spp'nin Dışkıdan Nested PCR ve Carbol Fuchsin Boyama Yöntemi ile Teşhis Edilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (4), 305-308

Şimşek, A. T. (2011), Nevşehir Yöresindeki İshalli Buzağılarda *Cryptosporidium* Türlerinin Moleküler Prevelansı ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri. 48s.

T.C. Sağlık Bakanlığı. (2014). *Cryptosporidium* Türlerinin Mikrobiyolojik Tanısı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi, Cilt III, 53-70.

Tetley, L., Brown, S., M., McDonald, V., Coombs, G. H. (1998). Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*, 144 (12), 3249-3255.

Thomson, S. (2016), Cryptosporidiosis in farm livestock, PhD thesis, Institute of Biodiversity Animal Health and Comparative Medicine University of Glasgow, Scotland, UK.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Thomson, S., Hamilton, C. A., Hope, J. C., Katzer, F., Mabbott, N. A., Morrison, L. J., Innes, E. A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host -parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48 – 42

Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S., Hijjawi, N. S. (2005). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59, 77-158.

Tzipori S., Ward H. (2002). Cryptosporidiosis: Biology, Pathogenesis and Disease, *Microbes and Infection*, 4, 1047-1058.

United States Centers for Disease Control and Prevention. (2015a, February 20). *Cryptosporidium*: Pathogen and Environment- Causal Agent: Life Cycle. Retrieved from <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html>

United States Centers for Disease Control and Prevention. (2015b, October 7). *Cryptosporidium*: Prevention & Control - General Public. Retrieved from [https://www.cdc.gov/parasites/crypto/gen\\_info/prevention-general-public.html](https://www.cdc.gov/parasites/crypto/gen_info/prevention-general-public.html)

United States Centers for Disease Control and Prevention. (2015c, April 1). *Cryptosporidium*: Sources of Infection & Risk Factors. Retrieved from <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/infection-sources.html>

Universal Taxonomic Services, (2018, April 2). Monotypic taxon: Family Cryptosporidiidae Léger, 1911 (protozoan). Retrieved from <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx>

Uyar, Y. (2014). Parazitolojik Tanıda Antijen Testleri [pdf]. Alınan yer <http://www.duzen.com.tr/artfiles/parazitoloji.pdf>

Wells, B., Shaw, H., Hotchkiss, E., Gilray, J., Ayton, R., Green, J., Katzer, F., Wells, A., Innes, E. (2015). Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. *Parasites and Vectors*, 8, 66.

Wiser, M., F. (2018, April 4). General Apicomplexan Structure. Retrieved from <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html>

Yıldırım, A., Adanır, R., İnci, A., Yukarı, B. A., Düzlü, Ö. (2012). Burdur Yöresindeki Sığırlarda Cryptosporidiosis 'in Real Time PCR Yöntemi ile Araştırılması ve *Cryptosporidium* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu, Tübitak, Proje No: 111O512, Kayseri.

Yu, J.R. (2010). Cryptosporidiosis. *Hanyang Medical Review*, 30 (3), 187-195.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, J. S. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy:Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72-92.

Xiao, L., Feng, Y. (2008). Zoonotic Cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(3), 309-323.

Zhu, G., Guo, F. (2014). *Cryptosporidium* Metabolism. In S. M. Caccio ve G. Widmer (Eds.), *Cryptosporidium: parasite and disease*. Wien: Springer-Verlag, 361-38



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler:

Soyadı, adı : AKALIN Balca  
Doğum tarihi ve yeri : 16/05/1989 ESKİŞEHİR  
E-mail : balcaakalin@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi/ Fen-Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	06/2011
Lise	İzmir Tevfik Fikret Fen Lisesi	06/2007

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
25.01.2017/21.07.2017	Eskişehir Madame Tadia Otel	Resepsiyon Görevlisi

**Yabancı Dil:** İngilizce (Upper Intermediate)

2017 YÖKDİL / YÖKDİL PUANI: 76.25

**Fransızca** ( Orta Seviye)

2006 Comission Nationale DELF/DALF (DELF B1 puanı: 61.50)

**Yayınlar**