



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MARDİN İLİNDEKİ SU KAYNAKLARINDA  
*CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*'UN VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI

Volkan ÇUHADAR

Ocak, 2023  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARDİN İLİNDEKİ SU KAYNAKLARINDA *CRYPTOSPORIDIUM*  
*PARVUM*'UN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Volkan ÇUHADAR

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ŞENGÜL

Denizli, 2023

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Volkan ÇUHADAR

İmza :

## ÖZET

### MARDİN İLİNDEKİ SU KAYNAKLARINDA *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*'UN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Volkan ÇUHADAR

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Dr.Öğr.Üyesi Mustafa ŞENGÜL

Ocak 2023, 91 Sayfa

*Cryptosporidium* türleri dünya çapında yaygın olarak bulunan ve ishale neden olan etkenler arasında önemli bir yere sahip olan protozoon parazittir. *Cryptosporidium*; immünsüpresif hastalarda ağır ishaller hatta ölümlere neden olabilmektedir. Ayrıca *Cryptosporidium*'un bulaşma yollarından birinin içme suları olması nedeniyle halk sağlığını da tehdit edebilmektedir. Bu tez çalışmasında Mardin ilindeki su kaynaklarında *Cryptosporidium* varlığının araştırılarak elde edilecek verilerin, kontamine su kaynaklarının kullanımının engellenmesi için gerekli önlemlerin alınması konusunda yol gösterici olması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında Nisan ve Mayıs 2022 tarihleri arasında Mardin ili çevre sularından toplanan 56 su numunesinde *Cryptosporidium*'un varlığının saptanması için iki çeşit yöntem kullanılmıştır. İlk olarak su numunelerinden elde edilen preparatlar kinyoun asit-fast boyama, negatif boyama ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmesi ile ookistlerin varlığı araştırılmıştır. İkinci olarak su numunelerinde immünokromatografik hızlı kaset test ile *Cryptosporidium* özgül antijeni aranmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak söz konusu yöntemlerin *Cryptosporidium* varlığının tespitine katkı sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır.

Yapılan tez çalışması ile toplanan 56 su numunesinden kinyoun asit-fast ile boyanan 5 adet numunede (%8,92) pozitiflik saptanırken; negatif boyama, safranin-metilen mavisi boyama ve hızlı kaset test yöntemi ile 2 adet numunede (%3,57) pozitiflik saptanmıştır.

Sonuç olarak; Mardin ili çevresel su kaynaklarından yüzeyel yayılan sularda *Cryptosporidium* kontaminasyonuna rastlanmıştır. Su numunelerinde *Cryptosporidium* tespiti için en uygun boyama yönteminin kinyoun asit-fast yöntemi olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca özgül antijen arayan diğer tanı testlerine göre daha düşük maliyette olan hızlı kaset test yönteminin sadece parazit titresi yüksek olan örneklerde *Cryptosporidium* varlığının hızlı bir şekilde tespitine katkı sağladığı görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cryptosporidium*, Mardin, Kinyoun Asit-Fast boyama, Hızlı kaset test

**ABSTRACT****A RESEARCH ON THE PRESENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* IN WATER RESOURCES IN MARDİN**

Volkan ÇUHADAR

Master Thesis, Department of Medical Microbiology

Supervisor: Asst. Prof. Mustafa ŞENGÜL

January 2023, 91 Pages

*Cryptosporidium* species are common protozoan parasites worldwide and have an important place among the agents that cause diarrhea. *Cryptosporidium* can cause severe diarrhea and even death in immunosuppressed patients. It also threatens public health due to drinking contaminated water. In this thesis study, it was aimed to investigate the presence of *Cryptosporidium* in the water resources in Mardin and to use the data obtained as a guide to take necessary precautions to prevent the use of contaminated water resources.

In this thesis, two different methods were used to detect the presence of *Cryptosporidium* in 56 water samples collected from the surrounding waters of Mardin between April and May 2022. Firstly, the presence of oocysts in water samples were examined by kinyoun acid-fast staining, negative staining, and safranin-methylene blue staining method under a light microscope. Secondly, the immunochromatographic rapid test cassette was used to detect *Cryptosporidium*-specific antigens in water samples. By comparing the test results, it was investigated whether these methods contribute to the detection of *Cryptosporidium*.

Among the 56 water samples, five samples (8.92%) stained with kinyoun acid-fast had *Cryptosporidium*, and two samples (3.57 %) analyzed by negative staining, safranin-methylene blue staining, and immunochromatographic rapid test cassette had *Cryptosporidium*.

In conclusion, *Cryptosporidium* contamination was found in surface water from environmental water resources in Mardin. The kinyoun acid-fast method was found to be the most suitable staining method for detecting *Cryptosporidium* in water samples. Besides, the rapid cassette test method, which is more cost-efficient than other antigen diagnostic tests, contributes to the rapid detection of *Cryptosporidium* presence only in samples with high parasite titer.

**Keywords: *Cryptosporidium*, Mardin, Kinyoun Acid-Fast staining, Rapid test cassette**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Dr Öğr. Üyesi Mustafa ŞENGÜL'e,

Bu tez çalışmamda topladığım numunelerin işlenmesinde ve analizlerinde her türlü desteği sağlayan Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Laboratuvarı ve Artuklu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmasında referans olması için kullanılan pozitif kontrol örneği temini konusundaki yardımları için Atasancak Acıpayam Tarım İşletmesi Müdürü Serdar Dursun AK ve işletme çalışanlarına,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım hayat arkadaşım Pınar ÇUHADAR ve canım oğlum Deniz Ali ÇUHADAR'a teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa       |
|--|-------------|
| <b>ÖZET.....</b>   | <b>v</b>    |
| <b>ABSTRACT. ....</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR.....</b>   | <b>viii</b> |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>  | <b>ix</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>  | <b>xii</b>  |
| <b>TABLolar DİZİNİ.....</b>  | <b>xiv</b>  |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>                                | <b>xv</b>   |
| <br>   |             |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1. Amaç.....   | 2           |
| <b>2. KURAMSAL BİLGİLER.....</b>   | <b>3</b>    |
| 2.1. Tarihçe .....   | 3           |
| 2.2. Sınıflandırma.....  | 4           |
| 2.3. Yapısı ve Yaşam Döngüsü .....   | 9           |
| 2.3.1. Ookistin yapısı ve eksistasyon.....                                 | 11          |
| 2.3.2. Sporozoitin yapısı ve bağırsak lümeninde hareketi.....              | 13          |
| 2.3.3. Konak hücreye bağlanma ve parazitoforu vakuol oluşumu .....         | 14          |
| 2.3.4. Tip1 meront.....  | 16          |
| 2.3.5. Tip 2 Meront.....   | 17          |
| 2.3.6. Mikrogamont ve makrogamont .....                                    | 17          |
| 2.3.7. Zigot.....  | 18          |
| 2.4. Virülans Faktörleri .....   | 18          |
| 2.4.1. Hücreye bağlanmada etkili virülans faktörler .....                  | 18          |
| 2.4.2 Hücrenin istilasında etkili virülans faktörler .....                 | 19          |
| 2.4.3 Hücre içi hayatta kalım ve çoğalmada etkili virülans faktörleri..... | 20          |
| 2.5. Patogenez.....  | 21          |
| 2.6. Konak İmmün Yanıtı.....   | 24          |



|  |    |
|--|----|
| 2.7. <i>Cryptosporidium</i> Enfeksiyonunun Bulaşma Yolları .....   | 26 |
| 2.8. Epidemiyoloji .....   | 28 |
| 2.8.1. Coğrafya .....  | 29 |
| 2.8.2. Mevsimsellik .....  | 31 |
| 2.8.3. Çocuklarda enfeksiyon .....   | 32 |
| 2.8.4. İmmün yetmezliği olan kişilerde enfeksiyon .....  | 33 |
| 2.8.5. Gezginlerde enfeksiyon .....  | 33 |
| 2.8.6. Su kaynaklarında yapılan çalışmalar .....   | 33 |
| 2.8.7. Su kaynaklı salgınlar .....   | 39 |
| 2.9. Klinik Belirtiler .....   | 41 |
| 2.10. Tanı .....   | 42 |
| 2.10.1. Boyama ve mikroskopi .....   | 42 |
| 2.10.1.1. Yaş preparat yöntemi .....   | 43 |
| 2.10.1.2. Aside dirençli boyama yöntemi .....  | 43 |
| 2.10.1.3. Heine'nin negatif boyama yöntemi .....   | 44 |
| 2.10.2. İmmünolojik yöntemler .....  | 45 |
| 2.10.3. İmmünomanyetik ayırma saflaştırmasını kullanan immüno Floresan testi<br>(USEPA 1622 ve 1623) ..... | 45 |
| 2.10.4. Direkt ve indirekt İmmüno Floresan testi .....   | 47 |
| 2.10.5. Enzim bağlantılı immüno sorbent testi (ELİSA) .....  | 47 |
| 2.10.6. Antijen tespit testleri .....  | 48 |
| 2.10.6.1. İmmunocard stat testi .....  | 48 |
| 2.10.6.2. Akış sitometrisi .....   | 49 |
| 2.10.7. Nükleik asit bazlı yöntemler .....   | 49 |
| 2.10.7.1. Floresan in situ hibridizasyon (FİSH) .....  | 49 |
| 2.10.7.2. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) testi .....   | 49 |
| 2.10.7.2.1. Kantitatif PCR (q PCR) .....   | 50 |
| 2.10.7.2.2. Nested PCR .....   | 50 |
| 2.10.7.2.3. Droplet digital PCR .....  | 50 |
| 2.10.7.2.4. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) .....   | 51 |
| 2.10.7.3. Yeni nesil dizileme (NGS) .....  | 52 |
| 2.10.7.4. DNA Parmak izi yöntemi (DNA Fingerprinting) .....  | 53 |
| 2.10.8. Kültür yöntemleri .....  | 55 |
| 2.10.8.1. İçi boş elyaf teknolojisi .....  | 55 |
| 2.10.8.2. İpek proteinli iskele modeli .....   | 55 |
| 2.10.8.3. Kolon explant modeli .....   | 55 |
| 2.10.8.4. Akciğer ve ince bağırsak organoidleri .....  | 56 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.10.8.5. Kök hücre kaynaklı kültür.....    | 56        |
| 2.10.8.6. Çip üzerinde organ oluşturma..... | 57        |
| 2.10.9. Biyosensör kullanımı .....          | 58        |
| 2.11. Tedavi .....                          | 59        |
| 2.11.1. Antiparazitik ajanlar .....         | 60        |
| 2.11.1.1. Nitazoksanit.....                 | 60        |
| 2.11.1.2. Paromomisin .....                 | 61        |
| 2.11.1.3. Makrolitler.....                  | 61        |
| 2.12. Korunma ve kontrol .....              | 61        |
| 2.13. Hipotez.....                          | 63        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>             | <b>65</b> |
| 3.1. Numunelerin Toplanması .....           | 65        |
| 3.2. Numunelerin Filtrasyonu.....           | 65        |
| 3.3. Yöntem.....                            | 70        |
| 3.3.1. Boyama Yöntemleri .....              | 70        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                    | <b>75</b> |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                     | <b>81</b> |
| <b>6. SONUÇ.....</b>                        | <b>84</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                       | <b>85</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                       | <b>91</b> |
| <b>EKLER.....</b>                           | <b>92</b> |

- Tez çalışmasında sahadan örnek toplamak için “T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü”nden Araştırma İzni

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| <b>Şekil 2.1</b> <i>Cryptosporidium</i> un yaşam döngüsü ve seksüel farklılaşmalar .....  | 11           |
| <b>Şekil 2.2</b> Ookistin yapısı .....  | 13           |
| <b>Şekil 2.3</b> a)Sporozoit yapısı b)Sporozoitlerin konak hücrelerine penetrayon modelleri<br>c)Konak aktin polimerizasyon modeli d)PVM ve besleyici organel modeli e) Konak<br>parazit arayüzünün membran yapısının iki varsayımsal modeli.....       | 16           |
| <b>Şekil 2.4</b> <i>Cryptosporidium</i> enfeksiyonu ile görülen villus ve kript<br>küntleşmesi.Normal (A) ve deneysel olarak enfekte (B) bağırsak piglet hücreleri.....   | 23           |
| <b>Şekil 2.5</b> Kriptosporidiyozu karşı konağın gösterdiği immün yanıt mekanizmalarının<br>şematik gösterimi.....  | 26           |
| <b>Şekil 2.6</b> Kriptosporidiyozun bulaşma yolları .....   | 28           |
| <b>Şekil 2.7</b> Kriptosporidiyozun bulaşındaki risk faktörleri .....   | 30           |
| <b>Şekil 2.8</b> 222 hakemli yayının sistematik incelemesine dayanarak hazırlanan <i>C.</i><br><i>parvum</i> (turuncu) ve <i>C. hominis</i> 'in (mavi) neden olduğu insan kriptosporidiyozunun<br>göreceli küresel dağılımı .....                       | 31           |
| <b>Şekil 2.9</b> a) Modifiye EZN ile ookist görünümü b) Heinenin negatif boyama ile ookist<br>görünümü c) Yaş Preparasyon yönteminde <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin görünümü .  | 44           |
| <b>Şekil 2.10</b> Heine negatif boyama yönteminde yapılan modifikasyonlar sonucunda<br><i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin görünümü .....  | 45           |
| <b>Şekil 2.11</b> US EPA 1623 yöntemi aşamaları.....  | 46           |
| <b>Şekil 2.12</b> A) Floresein izotiyosiyanat (FITC) ile konjüge edilmiş <i>Cryptosporidium</i> 'a<br>özgü antikorlarla boyanmış ookistler B)Nükleik asit boyası olan DAPI (4',6-<br>diamidino-2-fenilindol) ile boyanan bir ookistlerin görünümü ..... | 47           |
| <b>Şekil 2.13</b> Nükleik asit bazlı tanı yöntemleri.....   | 54           |
| <b>Şekil 2.14</b> Üç boyutlu bağırsak modellerinin diyagramları.....  | 58           |
| <b>Şekil 2.15</b> Biyosensörleri oluşturan elemanlar .....  | 59           |
| <b>Şekil 3.1</b> Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Laboratuvarı ve üçlü vakum pompalı<br>filtrasyon cihazı .....  | 66           |
| <b>Şekil 3.2</b> Mardin ilinde numune toplanılan yerlerin harita üzerindeki konumları .....   | 67           |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 3.3</b> Kızıltepe 2 (Zergan Deresi) istasyonu .....  | 68 |
| <b>Şekil 3.4</b> Artuklu 1 istasyonu (Yayla köyü).....  | 68 |
| <b>Şekil 3.5</b> Savur 7 istasyonu (Pınardere köyü).....  | 69 |
| <b>Şekil 3.6</b> Derik 2 istasyonu .....  | 69 |
| <b>Şekil 3.7</b> Nusaybin 5 istasyonu(Çağ Çağ deresi).....  | 70 |
| <b>Şekil 4.1</b> Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile boyanan nusaybin 1 su numunesinin (A) x40'lık büyütmede mikroskop görüntüsü (B) X100'lük büyütmede mikroskop görüntüsü .....                  | 78 |
| <b>Şekil 4.2</b> Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile boyanan yeşilli 1 su numunesinin x40'lık büyütmede mikroskop görüntüsü (B) X100'lük büyütmede mikroskop görüntüsü .....                       | 78 |
| <b>Şekil 4.3</b> Nusaybin 1 istasyonundan alınan numunenin A) Safranin negatif boyama B) Malaşit yeşili negatif boyama C)Safranin metilen mavisi boyama yöntemleri ile hazırlanan preparatları..... | 79 |
| <b>Şekil 4.4</b> A) Hızlı kaset test kiti B) Nusaybin 1 istasyonundan alınan numunenin pozitif test sonucu.....   | 80 |

**TABLolar DİZİNİ**

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| <b>Tablo 2.1</b> <i>Cryptosporidiu</i> 'un Sınıflandırması .....  | 5            |
| <b>Tablo 2.2</b> Günümüze kadar tanımlanan <i>Cryptosporidium</i> türleri .....   | 7            |
| <b>Tablo 2.3</b> Atık sularda moleküler teknikleri kullanarak <i>Cryptosporidium</i> 'u tespit etmek için yapılan çalışmalar .....  | 35           |
| <b>Tablo 2.4</b> MENA bölgesinden 2005-2021 yılları arasında alınan su ve çevre örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> türlerinin ve alt tiplerinin prevalansı ve moleküler karakterizasyonu ..... | 38           |
| <b>Tablo 2.5</b> <i>Cryptosporidium</i> için kullanılan kültür yöntemlerinin karşılaştırılması .....  | 57           |
| <b>Tablo 2.6</b> Biyosensörlerin karşılaştırması .....  | 59           |
| <b>Tablo 4.1</b> Numune toplanılan yerler ve <i>Cryptosporidium</i> ookisti tespit edilen yerleri gösterir tablo .....  | 75           |
| <b>Tablo 4.2</b> Su numunelerinin incelenmesinde kullanılan yöntemler ve <i>Cryptosporidium</i> ookisti tespitini gösterir tablo .....  | 76           |
| <b>Tablo 4.3</b> Numunelerin yüksek ısıda tutulması ile ookistlerin boyanma özelliklerindeki farklılığın karşılaştırılması .....  | 77           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

|         |  |
|---------|--|
| 5-HT    | Hidroksitriptamin  |
| ABD     | Amerika Birleşik Devletleri  |
| AIDS    | Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome)      |
| ARP     | Aktin-ilişkili protein   |
| ATP     | Adenozin trifosfat   |
| Caco-2  | Adenokarsinom  |
| CDC     | Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi   |
| COWP    | <i>Cryptosporidium</i> ookist duvar protein  |
| CDC     | Hücre Bölünmesi Döngüsü  |
| CpABC   | <i>Cryptosporidium parvum</i> adenozin trifosfat bağlayıcı kaset taşıyıcı          |
| Chgp    | <i>Cryptosporidium hominis</i> glikoprotein  |
| Cpgp    | <i>Cryptosporidium parvum</i> glikoprotein   |
| CpMuc   | <i>Cryptosporidium parvum</i> müsin  |
| CpSUB1  | Subtilisin benzeri serin proteaz   |
| CSL     | Sirkumsporozoit benzeri glikoprotein   |
| DAMPs   | Hasarla ilişkili Moleküler Paternler   |
| DAPI 4' | 6-diamidino-2-fenilindol   |
| DC      | Dentritik hücre  |
| ddPCR   | Droplet Digital Polimeraz Zincir Reaksiyonu  |
| DFA     | Direkt İmmüno Floresan Tekniği   |
| Dk      | Dakika   |
| DNA     | Deoksiribonükleik Asit   |
| ELISA   | Enzime-Bağlı-İmmün Analiz (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)                      |
| FITC    | Floresan izotiyosiyanat  |
| GalNAc  | N-Acetylgalactosamine  |
| GI      | Gastrointestinal   |
| Gp      | Glikoprotein   |
| HT29-   | MTX mukus salgılayan goblet hücreleri  |
| HIV     | İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü   |
| HLA     | İnsan lökosit antijeni   |
| hsp     | Isı şoku proteini  |
| ICZN    | Uluslararası Zoolojik Adlandırma Kodu  |
| IDO     | İndolamin 2, 3 Dioksijenaz   |
| IFA     | İndirekt Floresan Antikor Testi (Immunofluorescence Assay)                         |
| IFN-γ   | İnterferon gama  |
| Ig      | İmmüno globulin  |
| IL      | İnterlökin   |
| IMS     | İmmüno magnetik separasyon   |
| LAMP    | Döngü Aracılı İzotermal Çoğaltma Yöntemi (Loop Mediated Isothermal Amplification ) |
| LL37    | Cathelisidin 37  |

|         |   |
|---------|---|
| MAF     | Modifiye Asit Fast yöntemi  |
| MENA    | Orta Doğu Ülkeleri ve Kuzey Afrika  |
| MIC     | Mikronemal proteinlerden  |
| mRNA    | Mitokondrial Ribonükleik asit   |
| MZN     | Modifiye Ziehl Neelsen boyama yöntemi   |
| NGS     | Yeni nesil dizileme   |
| NF-κB   | Nükleer faktör kappa  |
| NK      | Naturel Killer Hücreleri  |
| N-WASP  | Nöral Wiskott-Alrich sendromu proteininin   |
| q PCR   | Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu  |
| PCR     | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)                             |
| PI3K    | Fosfatidilinositol-3-kinaz  |
| PVM     | Parazitoforlu vakuol membran  |
| RFLP    | Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriksiyon fragment length polymorphism) |
| RT-PCR  | Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                     |
| rRNA    | Ribozomal Ribonükleik Asit  |
| Sn      | Saniye  |
| ssrRNA  | Küçük Alt Birim Ribozomal Ribonükleik Asit  |
| TD      | Gezgin ishali   |
| Th      | Yardımcı T Hücreleri  |
| TRAP    | Trombospondin İlişkili Anonim Protein   |
| TRAP-C1 | Trombospondine bağlı yapışkan protein <i>Cryptosporidium</i> 1                      |
| TNF-α   | Tümör nekroz faktör alfa  |
| USEPA   | Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı                                     |
| UV      | Ultra Viyole  |
| Vb.     | ve benzeri  |
| WFB     | Duvar Oluşturan Cisimcikler   |
| WHO     | Dünya sağlık örgütü   |
| XHIM    | X'e bağlı hiperimmünoglobulin M sendromu  |

### Simgeler

|                  |                       |
|------------------|-----------------------|
| °C               | Santigrad Derece      |
| cm <sup>2</sup>  | Santimetre kare       |
| HCl              | Hidroklorik asit      |
| kDa              | Kilo Dalton           |
| Kg               | Kilogram              |
| kGy              | Kilogray              |
| L                | Litre                 |
| mg               | Miligram              |
| ml               | Milli Litre           |
| Mb               | Megabaz               |
| Mn <sup>2+</sup> | Manganez              |
| mm <sup>3</sup>  | Milimetre küp         |
| Mø               | Makrofaj              |
| µl               | Mikrolitre            |
| µm               | Mikrometre            |
| µM               | Mikromol              |
| NaOCl            | Nitrosil klorür       |
| Ph               | Potansiyel hidrojen   |
| rpm              | Revolution per minute |
| %                | Yüzde                 |

## 1. GİRİŞ

Sanayileşme ve kent nüfusunun son zamanlarda artması nedeniyle yaşanan kirlilik, canlıların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri için gerekli olan temiz su kaynaklarına ulaşımı zorlaştırmaktadır. Diğer taraftan dünyamızda yaşanan iklim değişikliği nedeniyle oluşan seller ve kuraklık insanların kaliteli ve yeterli su kaynaklarına ulaşmasındaki başka bir engeldir. Söz konusu nedenlerden dolayı hem dünyada hem de su fakiri olan Türkiyede su kaynaklarının kirlenmesi ve azalması bulaşıcı hastalıkların yayılmasının önünü açmaktadır.

Su kaynaklarının kirlenmesi neticesinde meydana gelen bulaşıcı hastalıklar önemli birer halk sağlığı sorunu halini almaktadır. Yapılan araştırmalarda toplumsal salgınlara neden olabilen bu hastalıkların en önemli etkenleri arasında protozoonların özellikle de *Cryptosporidium*'un yer aldığı görülmüştür (Ryan vd 2018).

*Cryptosporidium*; küçük çocuklarda ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde şiddetli ishalin küresel nedenlerinden biri olan protozoon bir parazittir (Xiao ve Griffiths 2020). Günümüzde 152'den fazlası memeli olmak üzere 200'ü aşkın hayvanda 40'dan fazla tür ve genotip belirlenmiştir (Ryan vd 2021, Luka 2021). *C. parvum* ve *C. hominis* türleri insan enfeksiyonlarının %90'nından sorumludur (Cacciò ve Putignani 2014). *Cryptosporidium*un neden olduğu enfeksiyon 'Kriptosporidiyoz' olarak adlandırılır (Xiao ve Griffiths 2020). Kriptosporidiyoz olgularında başlıca bulaşma kaynağı fekal-oral yoldur. *Cryptosporidium* kontamine su ve yiyeceklerin tüketilmesiyle ya da enfekte hayvan ve insanlarla yakın temas ile bulaşmaktadır (Pinto vd 2022). Gastrointestinal epitel hücrelerini enfekte eden *Cryptosporidium*, bağışıklık sistemi sağlam vakalarda distal ince bağırsaklarda ve proksimal kolonda yoğunlaşırken bağışıklık yetmezliği bulunan vakalarda bağırsak ve solunum yolu gibi vücudun diğer bölgelerine yayılabilir (Cacciò ve Putignani 2014). Bağırsak yerleşiminde kolerada görülen ishale benzer bol miktarda sulu ishal, daha nadir olarak baş ve kas ağrıları, hafif ateş, halsizlik, kuvvet ve iştah kayıpları yaşanabilmektedir (Abeledo-Lamerio, 2019). Hastalığın tanısı Modifiye Ziehl-Neelsen asit fast sıcak boyama yöntemi, Kinyoun'un asit fast soğuk boyama yöntemi, Heine'nin "negatif boyama tekniği", floresan bazlı auramin fenol, safranin metilen mavisini boyama gibi farklı boyama yöntemlerinin yanı sıra immunokromatografik test, enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELİSA) gibi



antijenik yöntemler ile yapılabilmektedir (Adeyemo vd 2018, Xiao ve Griffiths 2020). Ayrıca polimeraz zincir reaksiyon (PCR), floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi moleküler yöntemlerle etkenin tiplendirilmesi yapılabilmektedir.

### 1.1. Amaç

Mardin ilindeki su kaynaklarında *Cryptosporidium parvum*'un mikroskopik ve antijenik olarak varlığının saptanması amacıyla düzenlenen bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler ışığında orta vadedeki amaç; yapılan tez çalışmasının sonucunda elde edilecek verilerin paylaşarak enfekte suların kullanımının önlenmesidir. Uzun vadede ise söz konusu bu veriler ışığında Mardin ili ve ilçelerindeki su kaynaklarında *C. parvum* ile kontamine olduğu tespit edilen alanların parazit yükünü, bulaşımı ve yayılmasını önleme amaçlı stratejik bir plan oluşturulmasına yardımcı olunması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Kriptosprodiyoz, 1907 yılında Edward Ernst Tyzzer tarafından farelerin mide bezlerinde keşfedilen protozoon bir parazit olan *Cryptosporidium*'un neden olduğu bir hastalıktır. 1910 yılında Tyzzer, bu parazitin ookistlerde sporokist içermediğini ve hala konak hücre duvarına bağlıyken sporlaştığını fark etti. Bu nedenle Tyzzer, parazitin cinsini Yunancada 'gizli' anlamına gelen *Cryptosporidium*, türünü ise *Cryptosporidium muris* olarak adlandırdı. Tyzzer ayrıca yiyecekleri kontamine eden sporların fekal bulaşmasını tanımladı. Tyzzer 1912 yılında yeni bir tür tanımladı ve isimlendirdi. *C. muris* ookistlerine (6-8 µm) kıyasla boyut olarak daha küçük (4-5 µm) ookistler üreten bu türe "*Cryptosporidium parvum*" adını verdi. Tyzzer deneysel olarak enfekte ettiği farelerde yaptığı incelemede; *C. parvum*'un daha küçük olduğunu ve sadece ince bağırsakta geliştiğini göstererek *C. muris*'ten ayırdı. *C. parvum*'un kesinlikle hücre dışı olmadığı, ancak konak hücre yüzeyinden çıkıntı yapıyor gibi görüldüğü için hücre içi olarak kabul edilemeyeceği sonucuna vardı. Tyzzer, *Cryptosporidium*'un gelişim evrelerini tavuk çekum epitelinde bularak kuş kriptosprodiyozunu ilk bildiren kişi de olmuştur. *Cryptosporidium*'un ilk olarak hastalık ve ölümle olan ilişkilendirilmesine neden olan olay hindilerde yaşanan diyare ve ölüm vakaları olmuştur. 1951 yılında yaşanan bu olaylar *Cryptosporidium meleagridis*'in keşfine neden olmuştur (Dubey vd 1990). Ancak *Cryptosporidium*, 1971 yılında buzağılarda enteritin nedeni olduğunun anlaşılmasına kadar ilgi çekmemiştir. 1976'da önce Nime vd kronik ishal ile seyreden 3 yaşındaki bir çocukta, daha sonra da Meisel vd immun sistemi baskılayan ilaç kullanan bir çiftçide ilk insan kriptosprodiyoz vakalarını bildirmişlerdir (Kaçmaz 2015). *Cryptosporidium* birçok hayvan türünde tanımlanmasına rağmen kriptosprodiyozun 1980'lerin başlarında yaşanan HIV-AIDS salgınına kadar çok önemli bir hastalık olduğu düşünülmemiştir (Thomson 2016). 1982 yılında Boston, Los Angeles, Newark, New York, Philadelphia ve San Francisco'daki Hastalık Kontrol Merkezlerine başvuran 21 erkekte AIDS ile bağlantılı *Cryptosporidium*'un neden olduğu ciddi uzun süreli ishal olduğunu bildirilmiştir. Bu tarihten sonra *Cryptosporidium*'un teşhis, tedavi ve

önlenmesine yönelik tıp ve veteriner ilgisi, tüm dünyada önemli ölçüde artmıştır (Dubey vd 1990).

## 2.2. Sınıflandırma

*Cryptosporidium*, omurgalıların her yerde bulunan enterik protozoon patojenidir. 50 yıldan uzun bir süredir insanlar ve evcil hayvanlarda bir hastalık nedeni olarak kabul edilmesine rağmen, biyolojisi ve ekolojisi ile ilgili temel sorular ancak son zamanlarda çözülebilmiştir. Moleküler araçların ortaya çıkmasıyla, parazitin tür sayısında hızlı bir şekilde artış yaşanmıştır. Türlerin çoğunluğu genetik farklılık ve konak temelinde açıklanmaktadır. *Cryptosporidium*'da tür sınırlaması; büyük ölçüde Xiao vd tarafından belirlenen; ookist morfolojisinin tanımı, doğal konak spesifikliğinin tanımı, genetik karakterizasyonlar ve Uluslararası Zoolojik Adlandırma Koduna (ICZN) uygunluk şeklinde dört kritere dayandırılmıştır. Son on yılda her yıl neredeyse bir yeni tür önerilmiş olup günümüzde 152 tanesi memeli hayvanlarda olmak üzere 200'ü aşkın hayvanda, en az 44 tür ve 120'nin üstünde genotip belirlenmiştir (Ryan vd 2021, Luka 2021). Başlangıçta *Cryptosporidium* türleri de sıklıkla izole oldukları konakçıya göre adlandırılmıştır. Moleküler yöntemlerin gelişimiyle birlikte DNA belirteçleri, *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanmasında kullanılmış olup tür düzeyinde tanımlama, hem hiperdeğişken hem de korunmuş dizilerin varlığından dolayı en yaygın olarak ss rRNA geni kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ryan vd 2021). Şu anda adlandırılmış çoğu tür, tam veya kısmi olarak ss rRNA geni kullanılarak tanımlanabilir. Bu yöntem *Cryptosporidium* cinsinin tamamının filogenetik olarak yeniden yapılandırılmasına izin veren retrospektif bir "barkod" görevi görür (Ślapeta 2013). DNA belirteçleri ile yapılan tür tanımlamasının bazı sınırlamaları vardır. Özellikle ss rRNA'nın alt tip tanımlamasına ve popülasyon analizine izin vermediği anlaşılmıştır. Söz konusu sınırlamalar nedeniyle yapılan araştırmalarda aktin, 60 kDa glikoprotein geni (gp60), ısı şoku proteini 70 (hsp70) ve *Cryptosporidium* ookist duvar proteininin (COWP) bulunduğu diğer lokusların da tür düzeyinde tanımlamada kullanılabileceği belirlenmiştir (Xiao ve Feng 2017).

**Tablo 2.1** *Cryptosporidium*'un Sınıflandırması; (A) (Akalin 2018), (B) Taxonomicon, 2021, (Ryan vd 2021) kullanılarak modifiye edilmiştir.

|   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Üst Alem <i>Eucaryota</i></li> <li>❖ Alem <i>Protista</i></li> <li>❖ Alt Alem <i>Protozoa</i></li> <li>❖ Şube <i>Apicomplexa</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Sınıf <i>Sporozoa</i></li> <li>○ Altsınıf <i>Coccidia</i></li> <li>○ Takım <i>Eucoelidiorida</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alttakım <i>Eimeriorina</i></li> <li>▪ Aile <i>Cryptosporidiidae</i></li> <li>▪ Cins <i>Cryptosporidium</i></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Üst Alem <i>Eucaryota</i></li> <li>❖ Alem <i>Chromista</i></li> <li>❖ Alt Alem <i>Harosa</i></li> <li>❖ Grup <i>Halvaria</i></li> <li>❖ Üst Şube <i>Alveolata</i></li> <li>❖ Şube <i>Myozoa</i></li> <li>❖ Alt Şube <i>Apicomplexa</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Üst Sınıf <i>Sporozoa</i></li> <li>○ Sınıf <i>Conoiasida</i></li> <li>○ Altsınıf <i>Gregarinasina</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Takım <i>Cryptogregarinorida</i></li> <li>▪ Aile <i>Cryptosporidiidae</i></li> <li>▪ Cins <i>Cryptosporidium</i></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> |
| (A)   | (B)   |

*Cryptosporidium*, 1907'de ilk olarak tanımlandığında benzer yaşam döngüsü özelliklerine sahip olması nedeniyle *Coccidia* içinde *Asporocystidae* ailesine yerleştirilmiştir. Son zamanlarda *Cryptosporidium*'un moleküler yapısı, konak ve tür çeşitliliğinin tespiti için kullanılan moleküler yöntemler ile parazitin konak dışında çoğalabildiğini gösteren kültür yöntemlerinin çeşitliliğinin artması sonucu parazit hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmuştur. Yapılan moleküler filogenetik araştırmalar neticesinde parazitin apikoplastının olmaması, konak hücresinde episelüler ve ekstraselüler yerleşim, çoğalma aşamalarının benzer olması, gelişim aşamalarının morfolojilerinin pleomorfik ve paraziti çevreleyen ortama bağlı olması, dört adet çıplak sporozoit içeren ancak sporokist içermeyen ookistler, epimerit benzeri beslenme organelinin olması gibi özellikleri bakımından gregarinlerle benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Bu nedenle uzun yıllar *Coccidia* alt sınıfında olduğu (Tablo 2.1-a) düşünülen *Cryptosporidium*'un taksonomisi, 2014 yılında Cavalier-Smith tarafından 18S ribozomal RNA verilerine dayanarak revize edilmiş ve *Cryptosporidium* *Coccidia*'dan gregarinlere aktararak Gregarinomorpha sınıfı içinde yeni oluşturulan *Cryptogregarina* adlı bir alt sınıfa yerleştirilmiştir. 2019 yılında Adl vd tarafından bu sınıflandırma Gregarinasina içindeki *Cryptogregarinorida* alt sınıfı olarak değiştirilmiştir (Tablo 2.1-b). Bazı araştırmacılar da *Cryptosporidium*'un gregarinlerden farklı bir soyu temsil ettiğini ve açıkça daha fazla taksonomik revizyonun gerekli olduğunu düşünmektedir. *Cryptosporidium*'un apicompleksanların en erken farklılaşan soyu olduğu öne sürülürken, diğer çalışmalar birden fazla bağımsız köken önermektedir (Ryan vd 2021).

*Cryptosporidium* için tanımlanan 44 tür ve 120'den fazla genotipten 19 tür ve 4 genotip insanlarda rapor edilmiştir. *C. hominis* ve *C. parvum*, insan enfeksiyonlarının %95'inden sorumludur ve bunu *C. meleagridis*, *C. felis* ve *C. canis* izlemektedir (Ryan vd 2021). *C. parvum* ve *C. hominis*, 2002'de ayrılana kadar, büyük ölçüde farklı konak tropizmleri ve moleküler belirteçler nedeniyle, *C. parvum*'un iki alt tipi olarak kabul edildi. 18S ribozomal RNA analizinde ayırt edilemeyen farklılık, 2004 yılında gp60 geni ile yapılan analizde anlaşılmıştır. *C. hominis* ve *C. Parvum*'un %96 oranında nükleotid özdeşliği içerdiği ancak farklı türler oldukları önerilmiştir. Yine gp60 analizi sonucunda; *C. parvum*, insanları enfekte eden *C. parvum anthroponosum* (*C.p.anthroponosum*) ve hayvanları enfekte eden *C. parvum parvum* (*C. p. parvum*) adlı iki dala ayrılmıştır (Kissinger 2019). *C.p.anthroponosum*, *C. p. parvum*, *C. hominis* arasında yapılan karşılaştırmalı genom analizinde bu soyların genetik hibridizasyon geçirdiği tespit edilmiş olup tespit edilen rekombinasyon olaylarının çoğunun, virülans ve konak etkileşimleri ile ilişkili genler için ortak bir sıcak nokta olan subtelomerik bölgelerde bulunduğu anlaşılmıştır (Kissinger 2019).

*Cryptosporidium* türleri, konak aralığında farklılık gösterir. Parazit ve konağın birlikte evrimi, konak adaptasyonu ve coğrafi ayrılma gibi nedenler başlıca insan patojenik türleri olan *C. parvum* ve *C. hominis* içinde benzersiz fenotipik özelliklere sahip alt tip ailelerin oluşumuna yol açmıştır. İletim yoğunluğu, genetik çeşitlilik ve genetik rekombinasyonun ortaya çıkışı popülasyonun genetik yapılarını daha da şekillendirmiştir. Her türün, farklı konak aralığı ve / veya virülans / bulaşıcılık için birden fazla alt tip ailesi vardır. Bu alt tip aileleri geleneksel olarak *C. hominis* için Ia, Ib, Id, Ie, If, vb.; *C. parvum* için IIa, IIb, IIc, IId, vb; ve *C. meleagridis* için IIIa, IIIb, IIIc, IIId, vb. olarak adlandırılır. Her bir aile içindeki alt tipler, TCA (A harfi ile temsil edilir), TCG (G harfi ile temsil edilir) veya TCT (T harfiyle temsil edilir) tekrarlarının sayısı ile adlandırılır. En yaygın alt tipler, sırasıyla *C. hominis* ve *C. parvum* için IbA10G2 ve IIaA15G2R1'dir. *C. parvum* geniş konak özgüllüğüne ve yüksek genetik heterojenliğe sahiptir. Tümü farklı konaklarda bulunmakla birlikte *C. parvum* alt tip ailesinde en yaygın bulunan alt tipler IIa, IIc ve IId'dir (Feng vd 2018).

Tüm bu taksonomi çalışmalarında *Cryptosporidium*un sınıflandırılması belli bir standarda oturtulmaya çalışılmışsa da parazitin konak çeşitliliği, yoğun genetik rekombinasyon varlığı ve kullanılan yeni yöntemlerle parazitin biyolojisi hakkında yeni bilgilerin elde edilmesi nedeniyle parazit sınıflandırmasının yeni değişikliklerin yaşanma olasılığının yüksek olduğu gözlenmektedir (Feng vd 2018, Ryan vd 2021).

**Tablo 2.2** Günümüze kadar tanımlanan *Cryptosporidium* türleri (Ryan vd 2021)

| <b>Tür Adı</b>          | <b>Konak Tipi</b>                      | <b>Ana Konak</b>                               | <b>İnsanda Bulaş Durumu</b>  | <b>Referans</b>                |
|-------------------------|--|--|--|--------------------------------|
| <i>C. myocastoris</i>   | Nutria ( <i>Myocastor coypus</i> )     | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Jezková vd 2021a               |
| <i>C. abrahamseni</i>   | Kırmızı Gözlü Tetra Balığı             | Balık  | Rapor Edilmedi   | Zahedi vd 2021                 |
| <i>C. ratti</i>         | Kahverengi Sıçan                       | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Jezková vd 2021b               |
| <i>C. bollandi</i>      | Melek Balığı ve Astronot Balığı        | Balık  | Rapor Edilmedi   | Bolland vd 2020                |
| <i>C. ornithophilus</i> | Deve Kuşu                              | Kuşlar   | Rapor Edilmedi   | Holubova vd 2020               |
| <i>C. proventriculi</i> | Sultan Papağanı                        | Kuşlar   | Rapor Edilmedi   | Holubova vd 2019               |
| <i>C. microti</i>       | Tarla Sıçanı                           | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Horcicková vd 2019             |
| <i>C. alticolis</i>     | Tarla Sıçanı                           | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Horcicková vd 2019             |
| <i>C. occultus</i>      | Kahverengi Sıçan                       | Kemirgenler                                    | Ong vd 2002; Xu vd 2020,2020a;<br>Yayımlanmamış (GenBank giriş<br>kodu HQ822146) | Kvác vd 2018                   |
| <i>C. apodemi</i>       | Sırtı Çizgili Orman Faresi             | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Condlová vd 2018               |
| <i>C. ditrichi</i>      | Sarı Boyunlu Orman Faresi              | Kemirgenler                                    | Beser vd 2020; Lebbad vd 2021  | Condlová vd 2018               |
| <i>C. homai</i>         | Ginepig                                | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Zahedi vd 2017a                |
| <i>C. testudinis</i>    | Rus Kaplumbağası                       | Sürüngenler                                    | Rapor Edilmedi   | Jezková vd 2016                |
| <i>C. ducismarci</i>    | Kaplumbağa                             | Sürüngenler                                    | Rapor Edilmedi   | Traversa 2010, Jezková vd 2016 |
| <i>C. avium</i>         | Kırmızı Önlü Muhabbet Kuşu             | Kuşlar   | Rapor Edilmedi   | Holubová vd 2016               |
| <i>C. proliferans</i>   | Kuzeydoğu Afrika Köstebek Sıçanı       | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Kvác vd 2016                   |
| <i>C. rubeyi</i>        | Kaliforniya Tarla Sincabı              | Kemirgenler                                    | Rapor Edilmedi   | Li vd 2015                     |
| <i>C. huwi</i>          | Lepistes, Neon Tetra, Kaplan balıkları | Balık  | Rapor Edilmedi   | Ryan vd 2015                   |
| <i>C. erinacei</i>      | Batı Avrupa Kirpisi                    | Kirpi, Atlar                                   | Kvác vd 2014a; Garcia-R vd<br>2020; Lebbad vd 2021                               | Kvác vd 2014b                  |
| <i>C. scrofarum</i>     | Domuz                                  | Domuzlar                                       | Kvác vd 2009a; 2009b   | Kvác vd 2013                   |
| <i>C. viatorum</i>      | İnsan                                  | Kemirgenler                                    | Fazla sayıda raporlama   | Elwin vd 2012a                 |
| <i>C. tyzzeri</i>       | Fare                                   | Kemirgenler                                    | Sulaiman vd 2005; Rasková vd<br>2013; Garcia-R vd 2020                           | Ren vd 2012                    |
| <i>C. ubiquitum</i>     | Sığır                                  | Geviş getirenler,<br>Kemirgenler,<br>Primatlar | Fazla sayıda raporlama   | Fayer vd 2010                  |

**Tablo 2.2** (Devam) Günümüze kadar tanımlanan *Cryptosporidium* türleri (Ryan vd 2021)

|                              |                      |                            |  |   |
|------------------------------|----------------------|----------------------------|--|---|
| <b><i>C. cuniculus</i></b>   | Avrupa Ada Tavşanı   | Tavşanlar                  | Fazla sayıda raporlama                                 | Inman ve Takeuchi 1979, Robinson vd 2010  |
| <b><i>C. xiaoi</i></b>       | Koyun                | Koyun ve keçiler           | Adamu vd., 2014  | Fayer ve Santin 2009                      |
| <b><i>C. fayeri</i></b>      | Kanguru              | Keseliler                  | Waldron vd 2010; Braima vd 2021a                       | Ryan vd 2008                              |
| <b><i>C. macropodum</i></b>  | Kanguru              | Keseliler                  | Rapor Edilmedi   | Power ve Ryan 2008                        |
| <b><i>C. fragile</i></b>     | Kurbağa              | Amfibiler                  | Rapor Edilmedi   | Jirku vd 2008                             |
| <b><i>C. ryanae</i></b>      | Siğir                | Siğirler                   | Rapor Edilmedi   | Fayer vd ,2008                            |
| <b><i>C. bovis</i></b>       | Siğir                | Siğirler                   | Khan vd 2010,Ng vd 2012; Helmy vd 2013;Higuera vd 2020 | Fayer vd ,2005                            |
| <b><i>C. suis</i></b>        | Domuz                | Domuzlar                   | İnsanlarda çok fazla raporlama mevcut                  | Ryan vd 2004                              |
| <b><i>C. galli</i></b>       | Kuş                  | Kuşlar                     | Rapor Edilmedi   | Pavleseck 1999,Ryan vd 2003a              |
| <b><i>C. molnari</i></b>     | Çipura,Levrek        | Balıklar                   | Rapor Edilmedi   | Alvarez-Pellitero ve Sitja-Bobadilla 2002 |
| <b><i>C. hominis</i></b>     | İnsan                | İnsanlar                   | İnsanlarda çok yaygın bir türdür                       | Morgan-Ryan vd 2002                       |
| <b><i>C. canis</i></b>       | Köpek                | Köpekler                   | İnsanlarda çok fazla raporlama mevcut                  | Fayer vd 2001                             |
| <b><i>C. andersoni</i></b>   | Siğir                | Siğirler                   | İnsanlarda çok fazla raporlama mevcut                  | Lindsay vd 2000                           |
| <b><i>C. varanii</i></b>     | Monitor Kertenkelesi | Kertenkeleler              | Rapor Edilmedi   | Pavleseck vd 1995                         |
| <b><i>C. baileyi</i></b>     | Tavuk                | Kuşlar                     | Rapor Edilmedi   | Current vd 1986                           |
| <b><i>C. serpentis</i></b>   | Yılan                | Yılan ve kertenkeleler     | Rapor Edilmedi   | Levine 1980                               |
| <b><i>C. felis</i></b>       | Kedi                 | Kedigiller                 | İnsanlarda çok fazla raporlama mevcut                  | İseki 1979                                |
| <b><i>C. wrairi</i></b>      | Ginepig              | Kemirgenler                | Rapor Edilmedi   | Vetterling vd 1971                        |
| <b><i>C. meleagridis</i></b> | Hindi                | Kuşlar ve İnsanlar         | İnsanlarda yaygın bir türdür                           | Slavin 1955                               |
| <b><i>C. parvum</i></b>      | Siğir                | Geviş getirenler, İnsanlar | İnsanlarda en yaygın ikinci türdür                     | Tyzzler 1912                              |
| <b><i>C. muris</i></b>       | Ev Faresi            | Kemirgenler                | İnsanlarda çok fazla raporlama mevcut                  | Tyzzler 1907,1910                         |

### 2.3. Yapısı ve Yaşam Döngüsü

Karyotipik analizler sonucunda *Cryptosporidium*'un 0.945 ila 2.2 megabaz arasında değişen sekiz kromozom içerdiği ve haploid genom boyutunun yaklaşık toplam 10 Mb olduğu anlaşılmıştır. Ek olarak, *C. parvum*'un iki küçük kromozom dışı sitoplazmik virüs benzeri çift iplikli RNA'ya (sırasıyla 1.786 ve 1.374 nükleotit) sahip olduğu gösterilmiştir. Enerji metabolizması büyük ölçüde glikolizdir ve parazite çevresel esneklik sağlayan hem aerobik hem de anaerobik metabolizmalar mevcuttur. Konaktan besin alımına büyük bir bağımlılık olduğunu gösteren sınırlı biyosentetik yetenekler ve minimal metabolizma bildirilmiştir. Konaktan temel besin maddelerinin alınmasını sağlayan geniş bir taşıyıcı dizisi keşfedildiği bildirilmiştir. Genom dizi analizleri sonucunda, *Cryptosporidium* türlerinin apikal kompleks organellerle ilişkili genlere sahip oldukları anlaşılmıştır. Ancak apikal kompleks organelleri bulunan *Cryptosporidium*'un bir apikoplasttan yoksun olduğu ve sadece genomunu kaybeden dejenere bir mitokondriye sahip olduğu gösterilmiştir (Bouzig vd 2016).

Parazit geçişi; enfekte konaklardan salınan dört sporozoit içeren ve çevre koşullarına dayanıklı hücre duvarına sahip ookistlerle doğrudan temas, ookistlerin kirli su veya yiyecek tüketimi yoluyla yutulmasıyla gerçekleşir. Söz konusu parazit geçişi ile enfektif döngü başlar. Parazit izolatına bağlı olarak değişmekle birlikte enfeksiyöz dozun 10 ookist olduğu rapor edilmiştir. *Cryptosporidium* cinsinin üyeleri, tüm gelişim aşamalarını tek bir konakta tamamlar (O'hara ve Chen 2011, Tandel vd 2019).

*Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü evreleri:

1. Ekskistasyon
2. Merogoni (Aseksüel Çoğalma)
3. Gametogoni (Seksüel Çoğalma)
4. Döllenme (Fertilizasyon)
5. Sporogoni ve ookist duvarının oluşmasıdır.

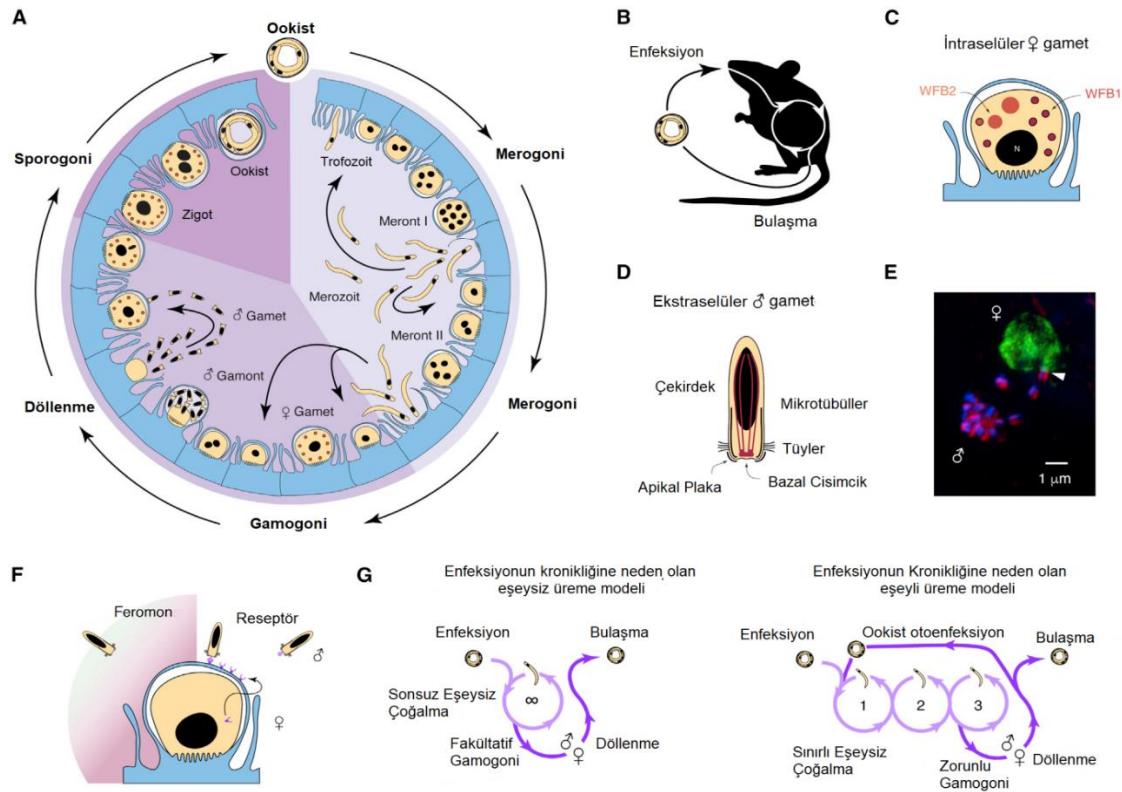
*Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü evrelerini daha detaylı olarak incelediğimizde ise ortaya konan genel özellikler şu şekilde açıklanmaktadır (Lendner ve Dauschies 2014, Guërin ve Striepen 2020);

1. Enfekte konaktan sporlanmış, dört enfeksiyöz sporozoit içeren ookistler dışkı ile atılır. *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü çevresel şartlara dirençli bu oositlerin yutulmasıyla başlar (Şekil 2.1-b). Söz konusu ookistlerden ince bağırsağın üst kısımlarında ekskistasyon sonucu sporozoitler çıkar. Kayma hareketi ile göç eden sporozoitler bağırsak hücrelerine bağlanır ve konak bağırsak epitel



hücrelerine nüfuz eder. Sporozoitin çevresinde intraselüler ve ekstrasitoplazmik yerleşime sahip parazitoforlu vakuol oluşur.

2. Parazitoforlu vakuol içindeki sporozoitler, trofozoitlere dönüşür. Trofozoitlerden aseksüel çoğalmadan sonra 6-8 merozoit içeren tip 1 meront gelişir. Tip 1 merozoitler, ya başka bir trofozoite ya da tip 2 meronta dönüşerek bitişik epitel hücrelerini enfekte eder. Tip 2 meronttan köken alan merozoitlerin seksüel çoğalma döngüsünü başlattığı düşünülmektedir.
3. Tip 2 merozoitler ya makrogamontlara ya da mikrogamontlara dönüşürler. Bir mikrogamont, bir makrogamontun aksine nükleer bölünme geçirerek 16 tane mikrogamet üretir.
4. Mikrogamontlar daha sonra bir makrogamont'u dölleyen mikrogametleri serbest bırakır. Makrogamet in mikrogamet tarafından döllenmesi sonucu diploid bir zigot oluşur.
5. Oluşan diploid zigot mayoz (sporogoni) benzeri bir süreç geçirerek dört haploid sporozoite farklılaşır. Bu sporozoitlerin çevresinde ookist duvarı oluşur. Oluşan ookistlerin %20 si ince duvarlı, %80'i kalın duvarlıdır. İnce duvarlı ookistler konağı yeniden enfekte etmek için lümene ayrılır. Kalın duvarlı ookistler başka konakları enfekte etmek için dışkıyla çevreye atılır (Şekil 2.1-a)



**Şekil 2.1** *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü ve seksüel farklılaşmalar a) *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü. b) Konağın enfekte olma ve bulaştırma şekli c) PVM ile çevrili dişi gametin yapısı d) Erkek gametin yapısı e) Kültürde çiftleşen dişi (yeşil) ve erkek (mavi ve kırmızı) gametleri gösteren immüno Floresan görüntüsü f) Erkek gametin dişi gameti nasıl bulduğunu gösterir modeller. g) İki gelişimsel enfeksiyon modeli ve yaşam döngüsü ilerlemesi (Guërin ve Striepen, 2020).

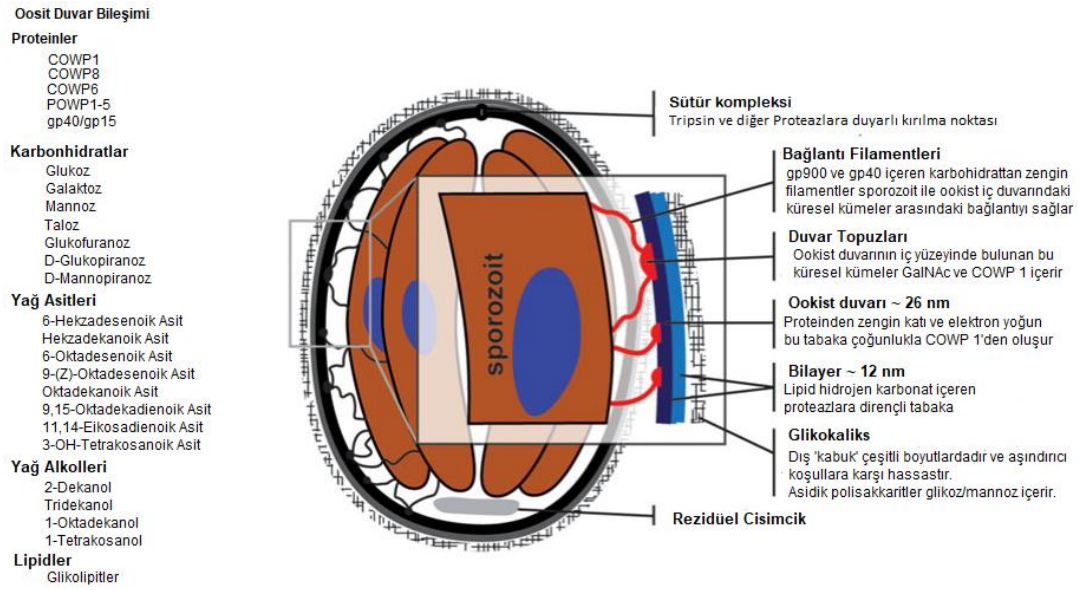
### 2.3.1. Ookistin yapısı ve ekskistasyon

Ookist duvar yapısı üzerine yapılan çalışmalarda ookistlerin kimyasal ve çevresel etkilere karşı oldukça dirençli olmasını sağlayan ookist duvarının, kırılğan bir glikokaliks, bir lipid ve bir glikoprotein tabakasından oluşan katmanlı yapısının olduğu bildirilmiştir. Glikokaliks tabaka ookistin en dışında yer alır. Bu tabakanın ookistin elektroforetik hareketliliğini değiştirdiği ve immünojenik olduğu gösterilmiştir. Lipid tabakası glikokaliks yapısının altında yer alır. Yüksek dirençli bu tabaka ookisti sıvı girişine karşı korur. Protein zengin tabaka; esas olarak sistein açısından zengin bir protein ailesinin üyesi olan *Cryptosporidium* Ookist Duvar Proteini 1'den (COWP1) ve az miktarda COWP8'den oluşur. Bu tabaka ookiste mekanik esneklik sağlar. Ookist içerisindeki sporozoitler, ookist duvarına konak hücre bağlanmasında ve istilasında rol oynayan glikoproteinler içeren filamentlerle bağlanır (Şekil 2.2) (Lendner ve Dauschies 2014).

Yerleşik yaşam döngüsü sporlanmış ookistlerin duyarlı konak tarafından yutulmasıyla başlar; ookistler ekskistasyon geçirir ve dört enfektif sporozoit salar. İn vitro çalışmalar; *Cryptosporidium*'un, *Eimeria* veya *Toxoplasma* gibi diğer koksidianların aksine, ekskistasyonu başlatmak için sadece tek bir uyarana ihtiyaç duyduğunu ortaya koymuştur. Bu özellik *Cryptosporidium*'un neden bağışıklığı baskılanmış konakların akciğerleri gibi bağırsak dışı yerlere yerleşebildiği sorusuna açıklama getirmektedir. Bununla birlikte, sporozoitlerin ekskistasyonunu destekleyen birkaç uyarana vardır (Lendner ve Dausgschies 2014).

Söz konusu uyarılardan ilki ve en önemlisi sıcaklıktır. Yapılan araştırmalar düşük sıcaklıkların (4 °C), sporozoitlerin ookistten çıkmasını önlediği anlaşılmıştır. Ancak sıcaklığın 20°C'ye yükselmesi ile %13, 37 °C yükseltilmesi durumunda ise %91'e varan ekskistasyon oranları görülmüştür. İkinci olarak, safra tuzları ve sindirim enzimleri sporozoitlerin salınımını tetikler. Son olarak, çoğunlukla glikoproteinlerden oluşan ookistin dış tabakasının midede bulunan NaOCl, HCl gibi aşındırıcılar tarafından bozulması sonucu ookist duvarının daha yüksek geçirgenliğe sahip olmasına ve safra tuzlarının ookistlere erişiminin kolaylaşmasına neden olur. Sızan safra tuzları, sporozoitlerin aktivasyonunu teşvik ettiği dolayısıyla ekskistasyonun oluşmasını desteklediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, ookistlerin bu aşındırıcılarla muamelesi sonucunda ookistlerin canlılığı üzerindeki oldukça ölümcül bir etkiden, ekskistasyon süreci üzerindeki etkileri artırıcı bir etkiye kadar değişen farklı sonuçları bildiren yayınlar vardır (Lendner ve Dausgschies 2014).

Ookistler; sporozoitlerin aktivasyonu amacıyla ekskistasyon süreci için çok önemli olan bir proteaz seti üretmeye başlarlar. Ookistlerdeki genel proteaz aktivitesinin, ekskistasyonun ilk saati içinde arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar; serin ve sistein proteazlarının, aktive edilmiş ookistlerde eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır. Serin proteazların aktivitesinin farklı inhibitörler tarafından bloke edilmesi, ekskistasyonun tamamen olmasa da güçlü bir şekilde inhibe edilmesine yol açarken, sistein proteazların inhibisyonunun önemli bir ekskistasyon inhibisyonuna yol açmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, sporozoit yüzeyinden eksprese edilen bir arginin aminopeptidazın ekskistasyona dahil olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, in vitro çalışmaların verileri, ookistlerin alınması sonrasında sıcaklıktaki artışın sporozoitleri aktive ederek proteaz üretimine ve artan hareketliliğe yol açtığını göstermektedir (Lendner ve Dausgschies 2014).



**Şekil 2.2** Ookistin yapısı (Lendner ve Dauschies, 2014).

### 2.3.2. Sporozoitin yapısı ve bağırsak lümeninde hareketi

*Cryptosporidium* sporozoitleri, diğer apikomplekslerin zoitlerine benzer bir hücresel organizasyonu paylaşırlar. Sporozoitler, 5,2 x 1,2  $\mu\text{m}$  boyutlarında apikal bir komplekse sahip virgül şeklinde bir hücrelerdir (Çeber vd 2005, O'Hara ve Chen, 2011). Apikal kompleks; rhoptri, mikronemler ve çok sayıda yoğun granülden oluşur (O'Hara ve Chen 2011). Sporozoitlerin bazal ucunda bulunan kristalloid cismin bileşimi ve işlevi bilinmemektedir (Guérin ve Striepen 2020). Parazit pellicül, bir dış plazma zarından ve altta yatan bir dizi subpelliküler mikrotübül içeren iki farklı zardan oluşan bir iç zar kompleksinden oluşur (Şekil 2.3-a) (O'Hara ve Chen 2011).

*Cryptosporidium* hücre şeklinde herhangi bir değişiklik olmaksızın kayma hareketi ile yer değiştirir. Sporozoitte yer alan mikrotübüller, yapısal stabilite sağlayıp aynı zamanda polariteyi korurken, aktomiyozin sistemi motilite ve invazyon için gerekli gücü üretmektedir. *Cryptosporidium*'un kayma hareketi üzerine yapılan çalışmalarda; *Cryptosporidium*'un kayma hareketinin mekanizmasının diğer apikompleksanlarla büyük oranda benzerlik taşıdığı anlaşılmıştır. Kayma hareketi yapışkan moleküllerin apikal kutuptan salgılanması, bu moleküllerin posterior translokasyonu, proteolitik yarıma ve bu parazit moleküllerinin hareketlilik izlerinde salınması adımlarının ardından gerçekleşir (O'Hara ve Chen 2011). Moleküler kompleksin posterior translokasyonu, parazitin ileri yönde itilmesini sağlar. Sporozoitin apikalinde yer alan mikronemlerden salgılanan Apikompleksan Trombospondin İlişkili Anonim Protein

(TRAP)'in konak hücre kısa aktin filamentleri ile etkileşime girmesi sonucu bir kompleks oluşur. Bu kompleksin iç zar kompleksine bağlanan miyozin A motorunun oluşturduğu hareket sayesinde aktin filamentini geriye doğru iterek paraziti ileri doğru iten bir kuvvet yaratır. Böylece TRAP zoitlerin arka ucuna yer değiştirir (Lendner ve Dausgschies 2014). Daha sonra TRAP, bir proteaz tarafından bölünür ve gp15, gp40, gp900 gibi konak hücreye bağlanmada etkili proteinlerle birlikte sporozotin arkasından dökülerek sporozoitin arkasında hareketi boyunca iz bırakmasına neden olur (O'Hara ve Chen 2011).

### 2.3.3. Konak hücreye bağlanma ve parazitoforlu vakuol oluşumu

Sporozoitin ilk teması epitel hücrelerinin üst mukus tabakası ile olur. Mukus tabakası mikroplara karşı etkili bir bariyer oluşturur. İnce bağırsakta 120 µm'den başlayıp kolonda 800 µm gibi önemli bir kalınlığa ulaşan mukus tabakasına sporozoitin nasıl nüfus ettiği belirsizdir. *Cryptosporidium*'un Entamoeba için gösterildiği gibi mukusu sindirmek için proteazları kullanma ya da mukusta hareket ederek hücreye girişi zorlama yollarını kullanabileceği düşünülmektedir (Lendner ve Dausgschies 2014).

Sporozoitin apikal bölgesinin mukusu tabakasını geçerek konak hücre zarının lümen yüzeyine ulaşmasından sonra, parazit ve konak hücre zarları kaynaşmaktadır. Parazit kapsüllenmesinden önce rhoptri bağlanma yeri ile yakından ilişkilidir, mikronemler ve yoğun granüller parazit konak arayüzüne göç eder, konak ve parazit arayüzünde tünel benzeri bir yapı oluşur ve parazit sitoplazması vakuolize hale gelir. İçselleştirme süreci ilerledikçe, membranöz vakuol kümeleri parazit plazma membranı ile birleşir ve paraziti kapsül içine alır. İçselleştirilen zoitler epitelyal hücrelerin yüzeyinde, hücre içi, ancak ekstratoplazmik olan benzersiz bir niş içinde epitelyal hücrelerin yüzeyinde konaktan türetilmiş ancak parazit tarafından modifiye edilmiş, iki membranlı bir yapıda bulunur (O'Hara ve Chen 2011). İnvazyon işleminde konak-parazit etkileşiminin öne çıkan bir özelliği de enfeksiyon bölgesinde konak filamentli aktin birikiminin kaide benzeri bir yapıya yol açmasıdır. Bu yapının işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte tıpkı hücre içi bakterilerde olduğu gibi konak aktin polimerizasyonunun; yapışma, istila ve konak bağışıklık sisteminden kaçma ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Guërin ve Striepen 2020). Ayrıca aktinin hücre plazma zarları ile etkileşime girdiği ve zarların yeniden şekillenmesi ile hücre şekli ve polaritesinin korunmasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Yu 2018).

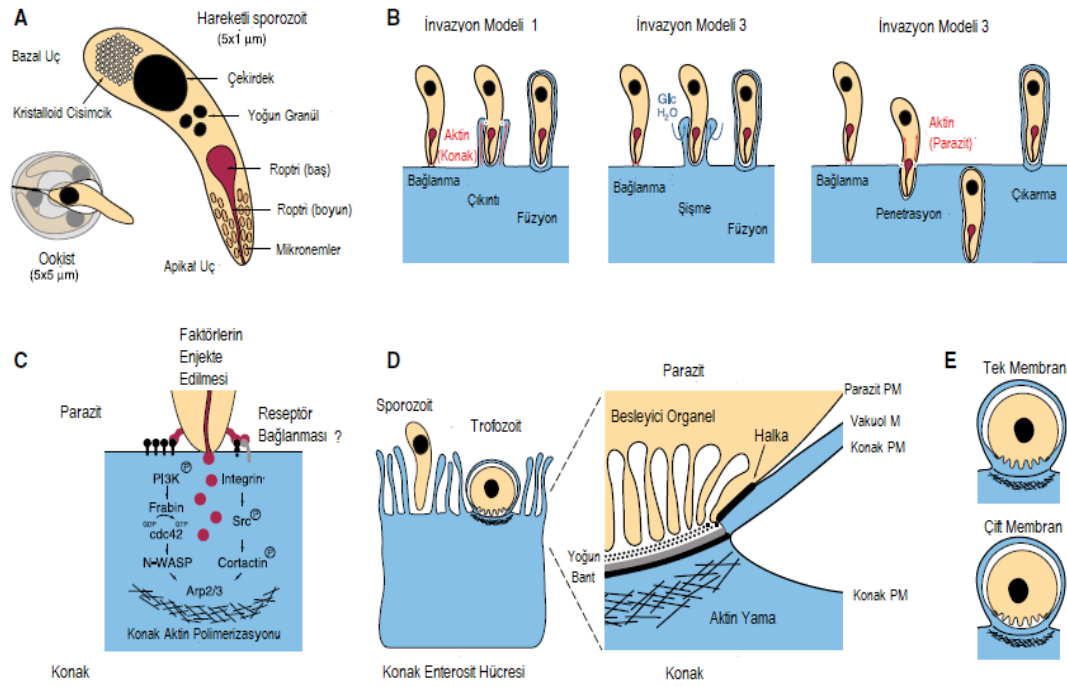
*C. parvum*, aktin polimerizasyonunu indüklemek için kullandığı yollar tam olarak açık olmamakla birlikte parazitin bunu Arp 2/3 kompleksini aktive ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, *Cryptosporidium* enfeksiyonu

sırasında aktinin yeniden organizasyonunu indükleyen Arp 2/3 kompleksinin aktivasyonu için iki yol olduğunu göstermiştir. İlk yol; c-Src-bağımlı tirozin fosforilasyonunun sonucu kortaktin birikimidir. Diğer yol ise CDC42'nin, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) fosforilasyonu sonucu oluşan frabin aracılı aktivasyonu sonucu Neural Wiskott-Alrich sendromu proteininin (N-WASP) sentezlenmesidir. Yapılan araştırmalar Arp 2/3 kompleksinin aktivasyonunda, sentezlenen bu iki molekül de dahil olmak üzere birkaç konak hücre faktörünün ve sinyal yolunun rol oynadığını göstermektedir (Şekil 2.3-c) (Yu 2016).

*Cryptosporidium* ek olarak, hücre ve parazit sitoplazmalarını doğrudan ayıran ve besleyici organel zarı olarak bilinen benzersiz bir yapıya sahiptir. Bu yapı parazitin invagine olan apikal ucu ile konakta aktin polimerizasyonu sonucu oluşan elektron yoğun tabaka arasında oluşmuştur. Bu bölgedeki organel zarı emici alanı arttırmak için oldukça kıvrılır. Besleyici organel zarın konak hücresinden besin ve enerji alımında görev aldığı varsayılmaktadır (Şekil 2.3-d) (Tzipori ve Ward 2012, Oruç vd 2019). Parazitoforlu vakuol membranının (PVM) sadece koruyucu bir işlev sağladığı düşünülmektedir (Tzipori ve Ward 2012). Konak parazit arayüzünün membran yapısı için iki varsayımsal model öne sürülmektedir. Bu modeller; besleyici organel ile konak hücre sitoplazmasının doğrudan temas halinde olduğu düşünülen tek membranlı model ile paraziti ek bir zar olan PVM ile ayrıldığını öne süren iki membranlı modeldir (Şekil 2.3-e).

Konak hücresinin istilası ile ilgili 3 adet model önerilmektedir. Model 1'de; *Listeria* için gözlenen mekanizmaya benzer membran çıkıntısının itici gücü olarak konak hücre aktin polimerizasyonun kullanıldığı; model 2'de, bir konak Na<sup>+</sup>/glukoz kotransporterini vasıtasıyla glukozun, aquaporin vasıtasıyla de suyun hücre içine geçmesi sonucu hücrede, membran çıkıntısıyla sonuçlanan ozmotik şişme olduğu, söz konusu lokal hücre hacmi artışının parazitin hücreye bağlanma bölgesinde oluşan aktin polimerizasyonu ile birlikte hücrenin istilasını kolaylaştırdığı; model 3'te, *Toxoplasma*'ya çok benzer şekilde sporozoitin konak hücreye aktif penetrasyonu sonucu parazitoforlu vakuol oluşumunun ardından konak hücrenin kenarına itildiği ileri sürülmektedir (Şekil 2.3-b) (Guërin ve Striepen 2020).

Sporozoitin parazitoforlu vakuol içinde tutulmasından sonra, parazit farklılaşması meydana gelmeye başlar ve ardından sporozoit, 1,5-2,5 µm çapındaki belirgin bir nukleoluslu çekirdeği ve iyi gelişmiş bir besleyici organeli olan küresel bir trofozoite dönüşür. Trofozoitler daha sonra sekiz adet merozoit üretmek için birden fazla nükleer bölünme turundan geçer (Dubey vd 1990, Leitch ve He 2011, Guërin ve Striepen 2020).



**Şekil 2.3** a) Sporozoit yapısı b) Sporozoitlerin konak hücreye penetrasyon modelleri c) Konak aktin polimerizasyonu modeli d) PVM ve besleyici organel modeli e) Konak parazit arayüzünün membran yapısının iki varsayımsal modeli (Guërin ve Striepen, 2020).

### 2.3.4. Tip1 meront

Trofozoitlerdeki nükleer bölünme sonucu oluşan tip 1 merontta altı veya sekiz çekirdek oluşur. Merozoitler şizont yüzeyinde tomurcuklanırlar. Tomurcuklanma; zarın merozoit tomurcuğunun içine bir çekirdek, elektron yoğun granüller, birkaç mikronem, ribozom ve sitoplazma dahil ederek içe doğru uzanması ile oluşur. Olgunluğa yaklaştıkça, merozoitler kalan gövdeden kopar, sonra daha uzar ve daha fazla mikronem ve ribozom oluşturur. Olgun şizontları çevreleyen konak hücre zarları açılarak diğer konak hücreleri enfekte edebilen merozoitleri serbest bırakır. Her bir merozoit potansiyel olarak başka bir tip 1 meront veya nihai olarak dört merozoit üreten bir tip 2 meront halinde gelişebileceği başka bir konak hücreyi istila edebilir. Tip 1 merozoit sivri bir apikal bölge ile çubuk şeklindedir ( $0,4 \times 1,0 \mu\text{m}$ ). Hareketlilik, bitişik enterosit apikal membranına bağlanma ve bir trofozoit oluşumu yani aseksüel döngünün kurulması bakımından genellikle sporozoitlerle çok benzer olarak kabul edilir (Dubey vd 1990, Leitch ve He 2011).

### 2.3.5. Tip 2 Meront

Tip-1 merozoitler, bir dizi aseksüel döngüde daha fazla tip 1 meront üretmeye devam ederken, bazı tip 1 merozoitler tip 2 merontlar üretir. Tip 1 ve tip 2 meront tipi arasındaki temel fark, bu aşamada sadece 4 merozoitin gelişmesidir. Tüm *Cyptosporidium* hücre içi aşamalarında olduğu gibi, iyi gelişmiş bir besleyici organel vardır. Tip 2 merontlardan salınan merozoitler şekil olarak daha az muntazam, tip 1 merontlardan salınanlardan biraz daha büyük ve daha az aktiftir (Leitch ve He 2011). Tip 2 meronttan köken alan merozoitlerin seksüel replikasyon döngüsünü başlattığı düşünülmektedir (Lendner ve Dauschies 2014). Ancak bazı araştırmacılar tip 1 merontlardan gametlere kadar doğrudan gelişmeyi önermiştir (Guërin ve Striepen 2020).

### 2.3.6. Mikrogamont ve makrogamont

Bazı tip 2 merozoitler bir enterosite girip, çapı 4 ila 6  $\mu\text{m}$ 'ye kadar olan küreselden oval bir yapıya kadar değişen ve geniş bir merkezi çekirdeğe sahip olan bir makrogamont üretirken, diğerleri mikrogamont üretir (Leitch ve He 2011). Makrogamontlar, yüksek transkripsiyonel aktivitelerini yansıtan tek bir genişlemiş çekirdeğe sahiptir. Birçoğunda ookisti oluşturmak ve sürdürmek için gereken proteinleri eksprese eden ve ookist duvarı için yapı taşlarını içeren Duvar Oluşturan Cisimcikler (WFB'ler) bulunur (Şekil 1-c). Döllenmeden sonra bu yapı taşları; proteinler, glikokonjugatlar ve lipidleri içeren çok katmanlı bir kabukta birleşmek üzere parazitoforlu vakuolün içine salgılanır (Guërin ve Striepen 2020).

Mikrogamont, 16 adet çubuk benzeri mikrogamet (1.4 x 0.5  $\mu\text{m}$ ) oluşturur. Bu hücreler kamçılı değildir ve hareketli olup olmadıkları veya nasıl hareket ettikleri belirsizdir. Mermi şeklindedirler ve polar bir bazal gövdeden çıkan bir mikrotübül kafesi ile çevrili oldukça yoğun bir çekirdeğe sahiptirler (Şekil 2.4-d). Bu kamçı içermeyen mikrogametler mikrogamonttan çıkar ve bitişik bir makrogamontu dölleyerek yaşam döngüsündeki tek diploid aşama olan zigot ile sonuçlanır. Döllenme, makrogamontun bulunduğu konak hücresi içinde gerçekleşir. Erkek gametlerin dişi gametleri nasıl bulduğu konusu tam aydınlatılamamış olmakla beraber erkekler gametlerin birçok ilgili protist gibi dişileri bir feromon gradyanı boyunca izleyebildiği ya da dişi gametin konak hücresinin yüzeyine erkek gametlerin bağlanması için bir reseptör yerleştirmiş olabileceği ileri sürülmektedir (Şekil 1-f). Mikrogametinin sadece çekirdeği ve yakından ilişkili mikrotübülleri döllenme sırasında makrogamont içine girmektedir (Guërin ve Striepen 2020).



### 2.3.7. Zigot

Mikrogametlerin mikrogamontları döllemesi sonucu oluşan diploid zigot, enterosit apikal membranına bağlıyken sporogoniye uğrar ve dört haploid sporozoite farklılaşır. Daha sonra sporozoitlerin etrafında ookist duvarı oluşur. Ookist, ya konağı yeniden enfekte etmek için lümeneye ayrılan ince duvarlı ookistlere ya da başka konakları enfekte etmek üzere dışkı ile çevreye atılan kalın duvarlı ookistlere farklılaşır (Leitch ve He 2011, Lendner ve Dauschies 2014). Konak tarafından dışarı atılan kalın duvarlı ookistler birçok çevresel koşula karşı çok dirençlidir. Kalın duvarlı ookistler serin ve nemli iklimlerde birkaç ay hayatta kalabilirler (Thomson vd 2017). *Cryptosporidium* ookisti tamamen konak hücre içinde olgunlaşır ve bağırsak lümenine bırakıldığında enfektiftir (Guërin ve Striepen 2020).

*Cryptosporidium* için iki gelişimsel enfeksiyon ve yaşam döngüsü ilerlemesi modeli önerilmiştir. İlkinde, eşeysiz çoğalma sınırsızdır ve bu sayede konak içinde sürekli enfeksiyon devam ederken, dölleme sadece konaktan konağa bulaşma için gereklidir. İkinci modelde ise isteğe bağlı üç eşeysiz çoğalmadan sonra eşeyli çoğalmaya zorunlu bir gelişimsel geçiş mevcuttur. Burada otoenfektif ookistlerin oluşumu yoluyla enfeksiyonu sürdürmek için döllemenin gerekli olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 1-g) Guërin ve Striepen 2020).

## 2.4. Virülans Faktörleri

Virülans faktörleri, konak hasarını destekleyen mikrobiyal özelliklerdir. Başka bir deyişle; bir virülans faktörü, gerekli ancak hastalığa neden olmak için yeterli olmayan bir gen ürünüdür. Yaş, cinsiyet ve bağışıklık sisteminin durumu gibi çeşitli konak faktörleri konak-parazit etkileşiminin sonucunu etkiler. *Cryptosporidium* için varsayılan virülans faktörleri, ekskistasyon, kayma motilitesi, bağlanma, istila, parazitofor vakuol oluşumu, hücre içi sağ kalım ve konak hücre hasarı dâhil olmak üzere *Cryptosporidium* ookistlerinin ve sporozoitlerin konak epitel hücreleri ile ilk etkileşim süreçlerinde yer alırlar (Bouazid vd 2013).

### 2.4.1. Hücreye bağlanmada etkili virülans faktörler

Enfeksiyon oluşturmanın kritik ilk adımı, konak hücrelere parazit bağlanmasıdır. Adezyona aracılık ettiği gösterilen Müsin benzeri glikoproteinler ve trombospondin ile ilişkili yapışkan proteinler olmak üzere iki protein sınıfı karakterize edilmiştir.

**CSL (sirkumsporozoit benzeri glikoprotein):** Yaklaşık 1.300 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip çözünebilir bir glikoprotein olan CSL; insan ve sığır intestinal epitel hücrelerinin yüzeyindeki bir reseptöre spesifik olarak bağlanan bir ligand içerir. Zoit ligandının bağlanma ve istila ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Lendner ve Dauschies 2014).

**Glikoprotein 900 (gp900):** Büyük bir müsin benzeri glikoprotein olan gp900, mikronemler ile invaziv merozoitlerin ve sporozoitlerin yüzeyinde bulunur. Gp900, kayma motilitesi sırasında izlerde birikir ve istilaya aracılık ettiği bilinmektedir (Lendner ve Dauschies 2014).

**Gp15/40/60 kompleksi (*C. parvum*'da Cp40 / 15 ve *C. hominis*'te Chgp40 / 15):** Bir sporozoit ve merozoit hücre yüzey proteini olan gp15/40/60 kompleksi *C. parvum* yaşam döngüsünün hücre içi aşamaları sırasında mRNA tarafından yaklaşık 60 kDa'lık bir glikoprotein öncüsüne dönüştürülür. Sentezden kısa bir süre sonra, bu 60-kDa ön-maddesi, 15 ve 45-kDa glikoproteinlerin üretilmesi için subtilisin benzeri serin proteaz (CpSUB1) tarafından proteolitik olarak işlenmektedir. Gp40, parazitin yüzey ve apikal bölgesinde, gp15 ise sporozoitlerin yüzeyinde bulunurken her ikisi de kayma hareketi sırasında parazitin hareket izlerine dökülür. Sporozoitin hareket izinde bulunan proteinlerin parazit bağlanması, istilası ve hareketliliğinde rol oynadığı gösterilmiştir.

**P30:** Çoğunlukla sporozoitin apikal bölgesinde lokalize 30kDa'lık bu glikoprotein; konak hücre yüzeylerinde bulunan önemli bir şeker olan galaktoz-N-asetilgalaktozamin (Gal/GalNAc), gp900 ve gp15/40 ile kompleks oluşturarak *Cryptosporidium*'un bağlanmasına aracılık ettiği iddia edilmiştir (Lendner ve Dauschies 2014).

**P23:** Coğrafi olarak çeşitli izolatlar boyunca antijenik olarak korunan ve enfeksiyonun ilk aşamaları boyunca hareket izlerinde biriken 23-kDa'lık bir sporozoit yüzey proteindir.

**TRAP-C1** (trombospondine bağlı yapışkan protein *Cryptosporidium* 1) : Mikronemal proteinlerden (MIC'ler) olan TRAP-C1 sporozoitlerin apikal kutbu üzerinde lokalize 76-kDa proteindir. TRAP ve CpMIC gibi yapısal olarak ilişkili proteinler parazit kayma motilitesi ve hücre penetrasyonunda rol oynar.

**Cp47:** Sporozoitlerin apikal ucunda lokalize, 57 kDa'lık tek bir protein olan CP47, epitel hücrelerde yer alan bir glikoprotein olan P57 aracılığı ile hedef hücrelere bağlanır. Yapılan araştırmalar bu bağlanmanın  $Mn^{2+}$ 'a duyarlı olduğunu göstermiştir (Lendner ve Dauschies 2014, Oruç ve Akpınar 2019)

**CPS-500:** Sporozoitlerin pelikülünde lokalize CPS-500 glikolipid yapıdadır. Sporozoitlerin hareketlilik izlerinde boyunca salgılanan CPS-500'ün parazitin konak hücreye bağlanmasında rolü olduğu düşünülmektedir (Yu 2018).

#### 2.4.2. Hücrenin istilasında etkili virülans faktörler

**Cp2 (C. parvum antijen 2):** Hücreye bağlanan sporozoitlerin konak-parazit arayüzünde, hücre içi aşamada parazitoforlu vakuol membranda, yaşam siklusunun seksüel aşamasında parazitin sitoplazmasında bulunur. Parazitin seksüel gelişimi sırasında ekspresyonu artar (Yu 2018).

**CPA135:**1556 aminoasitten oluşan ve apikal kutupta bulunan bir mikronem proteini olduğu varsayılmaktadır. Parazitin eksistasyonu sırasında çok salgılanır ve parazitin hareket yolunda dökülür (Lendner ve Dauschies 2014, Yu 2018).

**Hemolizin H4:** H4'ün işlevi bilinmemekle birlikte hücre zarlarını bozma kabiliyeti sayesinde hücre istilada ve / veya vakuolar zarların bozulmasında rol oynadığı böylece merozoitlerin parasitoforlu vakuolden çıkarak bitişik hücrelere yayılmasına olanak sağladığı düşünülmektedir (Bouzig vd 2013).

**Subtilisin Benzeri Serin Proteaz (CpSUB1):** Yüzey ve apikal kompleks proteinlerin parazit proteazları tarafından proteolitik işleminin, konak hücrelerin istilası ve bunlardan çıkış için gerekli olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan bu proteazın gp40 / 15'in işlenmesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Bouzig vd 2013).

**CpMuc:** Sporozoitin apikal bölgesinde lokalize olan CpMuc hücre içi gelişim aşamaları boyunca eksprese edilir. Yapılan araştırmalarda kromozom 2'de tanımlanan yedi küçük müsin sekansından (CpMuc1 ila CpMuc7) CpMuc4 ve CpMuc5'a spesifik antikörlerle yapılan in vitro deneylerde *C. parvum* enfeksiyonunun inhibe olduğu anlaşılmıştır (Bouzig vd 2013, Lendner ve Dauschies 2014 ).

**Fosfolipaz:** Parazitin bağırsak lümenine salınması sırasında parazitin ve konak hücrenin zarlarının bozulmasında veya besleyici organelde besinlerin konak hücreden geçişine izin vermek için gözeneklerin oluşmasında bir rol alabileceği öne sürülmüştür (Pollok vd 2003).

#### 2.4.3. Hücre içi hayatta kalım ve çoğalmada etkili virülans faktörleri

**CpABC:** Yaklaşık 200kDa'lık *C. parvum* ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı protein(CpABC) *C. parvum* ile konak hücresi arasında birincil arayüz görevi gören besleyici organelde lokalizedir. Bu proteinin parazitin temel beslenme gereksinimlerini karşılama ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Bouzig vd 2013, Perkins 1999).

**Isı Şok Proteinleri:** Isı şoku proteinleri (HSP'ler) büyük bir protein ailesidir. HSP'lerin, özellikle HSP70'in sentez seviyesi, ani sıcaklık değişimleri, besin maddelerinin kullanılabilirliğinin azalması ve bağışıklık saldırısı gibi stresli koşullar altında önemli ölçüde artar. HSP'ler diğer proteinler için hücre içi şaperonlar olarak işlev görür. Yeni oluşan proteinlerin taşınmasını, katlanmasını, birleştirilmesini, biyosentezini ve salgılanmasını kolaylaştırır. HSP70 ve HSP90 *Cryptosporidium* için tanımlanmıştır.

**Cp ATPaz 2:** 144.7 kDa'lık 1260 amino asitten oluşan bu protein toksik metal katyonlarını uzaklaştırmak için ağır metalleri zarlar boyunca pompalayan taşıyıcılardır.

**Cp ATPaz 3:** P-ATPazlar, biyomembranlar boyunca katyonları veya diğer maddeleri sürmek için ATP'yi hidrolize eden transmembran proteinlerdir. Cp ATPaz 3 konak hücrenin istilası sırasında hücre dışı yaşamdan hücre içi yaşama geçiş sırasında iyon homeostazının kurulmasına ve korunmasına yardımcı olur (LaGier 2002).

## 2.5. Patogenez

*Cryptosporidium* enfeksiyonu ile ilişkili patolojinin kapsamı büyük ölçüde bireyin bağışıklık durumuna bağlıdır. Gastrointestinal epitel hücrelerini enfekte eden *Cryptosporidium*, bağışıklık sistemi sağlam vakalarda distal ince bağırsaklarda ve proksimal kolonda yoğunlaşırken bağışıklık yetmezliği bulunan vakalarda bağırsak ve solunum yolu gibi vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. Ek olarak, yüksek dozda alınan ookist yükü, lenfositler ve nötrofiller gibi bağışıklık hücrelerinin kontrolsüz artışına neden olarak enfeksiyonun yayılmasına yol açma potansiyeline sahip olduğundan, bulaşıcı doz da patogeneze katkıda bulunabilir.

*Cryptosporidium* da dâhil olmak üzere herhangi bir patojenik enfeksiyonu kontrol etmek için dengeli bir bağışıklık tepkisi çok önemlidir. IFN- $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin kriptosporidiyozu düzenlemede önemli bir rolü olsa da, bunun gibi sitokinlerin düzensiz aktiviteleri, bağırsaklarda artan geçirgenlik dahil olmak üzere, hastalığın bazı karakteristik özelliklerine katkıda bulunabilir. Kriptosporidiyoz ile ilişkili başlıca klinik belirti olan ishalin, sodyumun emilim bozukluğu, klorürün salgılanması ve bağırsak epitel tabakasının artan geçirgenliği dahil olmak üzere çeşitli faktörler nedeniyle ortaya çıktığına inanılmaktadır.

Bağırsaktaki epitel hücrelerinde meydana gelen *Cryptosporidium* enfeksiyonunu takiben aktive olan nükleer faktör kapp (NF- $\kappa$ B), çeşitli anti-apoptotik faktörlerin yanı sıra TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$  ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinler ve kemokinleri aktive eder. Bu

aktivasyon sonucu oluşan inflamasyon, artmış epitel geçirgenliğine ve hastalığın diğer yönlerine katkıda bulunan enfeksiyon bölgelerine düzensiz bir bağışıklık ve enflamatuvar hücre akışına neden olur.

Kriptosporidiyoz patogenezinde rol oynayan diğer faktör de TNF- $\alpha$  aracılı artan prostaglandin üretimidir. Yapılan çalışmalar artan prostaglandin üretiminin, domuz ve sığır enfeksiyonu sırasında sodyum malabsorpsiyonuna ve klorür salgılanmasına katkıda bulunduğu dair kanıtlar sunmakla beraber söz konusu kanıtlara insan kriptosporidiyozunda rastlanmamıştır (Cacciò ve Putignani 2014).

Kriptosporidiyozun patogenezinde rol aldığı düşünülen diğer bir faktör de spesifik nöropeptit P maddesidir. Enterik sinir sisteminde bulunan ancak birçok inflamatuvar hücre tarafından da üretilen bu nöropeptidin seviyelerinin, hem bağışıklık sistemi sağlam hem de bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. P maddesinin klorür salgılanmasının, glikoz emilim bozukluğunun ve bağırsak geçirgenliğinin artmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. (Leitch ve He 2011, Cacciò ve Putignani 2014)

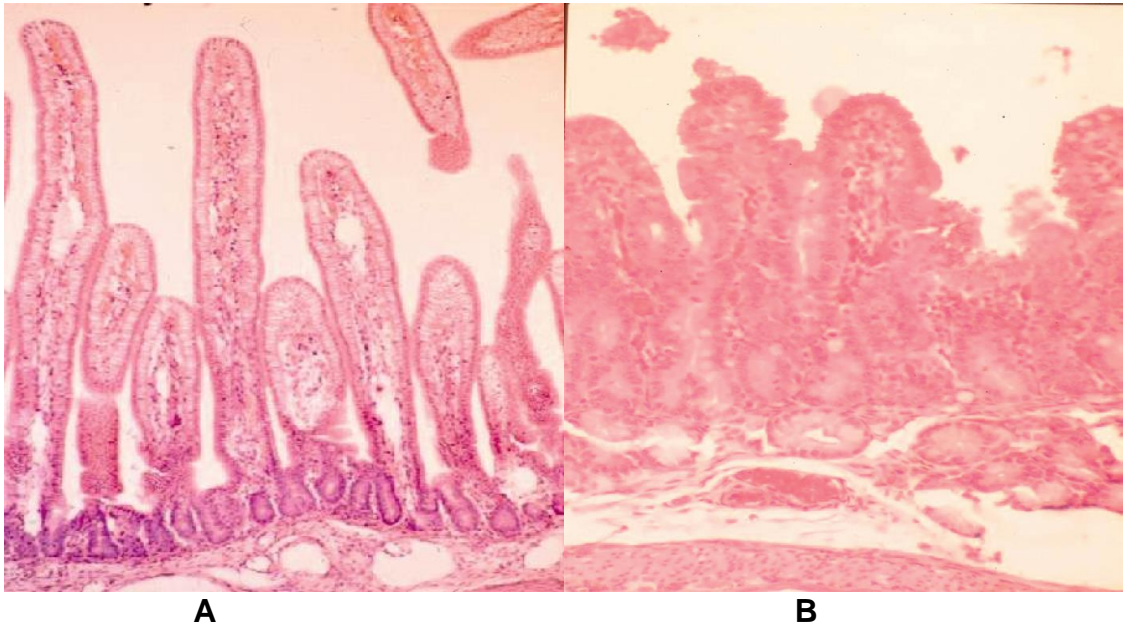
Kriptosporidiyozun baskın bir özelliği olan apoptoz veya nekroz ile hücre ölümü nedeniyle ince bağırsağın kript ve villöz yapısında meydana gelen önemli anatomik bozukluklar nedeniyle villuslar daha künt, kısa ve genişlemiş görünüme sahip olur (Şekil 2.4). Bu durum da hastalık sırasında ortaya çıkan bağırsak yüzey alanının azalmasına, geçirgenliğin artmasına ve emilim bozukluğuna katkıda bulunur. Hücrelerdeki söz konusu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar nedeniyle hem monosakkaritlerin absorpsiyonunda hem de sodyum ve glukozun birlikte taşınmasında bir azalma ile özellikle AIDS hastalarında B12 vitamini ve yağın zayıf emilimine neden olmaktadır (Dubey vd 1990, Leitch ve He 2011, Cacciò ve Putignani 2014).

Agresif sulu ishal ile karakterize olan fulminan kriptosporidiyoz ile kolera gibi enterotoksin üreten organizmaların neden olduğu enfeksiyonlar bir çalışmada karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada *C. parvum* ile enfekte buzağılardan alınan dışkı örneklerinde enterotoksin benzeri aktivite bulunmuştur. Diğer taraftan kriptosporidiyozlu vakaların bağırsaklarında güçlü bir sekretagog olan hidroksitriptamin (5-HT)'in seviyelerinin arttırdığı keşfedilmiştir. Bu bulgular neticesinde *Cryptosporidium* enfeksiyonundan kaynaklanan sulu ishalin, enterotoksin benzeri aktivitenin ve 5-HT seviyesinin birlikte artışından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kriptosporidiyozun şiddeti, parazitin insan gastrointestinal sistemi içinde yayılma yeteneğine ve konağın bağışıklık durumuna bağlıdır. Enfeksiyon kontrol altına alındığında ve asemptomatik olduğunda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonu genellikle kolonla sınırlıdır. Hastalığın daha şiddetli hale geldiği durumlarda, *Cryptosporidium* kolonizasyonu yutak, yemek

borusu, mide, ince bağırsak ve rektum gibi alanlar dahil olmak üzere gastrointestinal sistem boyunca meydana gelebilir (Cacciò ve Putignani 2014).

AIDS hastaları gibi ciddi bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde *Cryptosporidium* enfeksiyonunun biliyer sistem epitelini etkilediği bilinmektedir. Ayrıca duodenal papilla ve pankreas kanalında da *Cryptosporidium* enfeksiyonu bildirilmiştir. Ek olarak, safra kesesi ve safra sistemi enfeksiyonu, kriptosporidiyozlu HIV pozitif hastalarda yaygındır. AIDS ile ilişkili sklerozan kolanjit, AIDS hastalarında ortaya çıkan ve *C. parvum* bağırsak enfeksiyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olan ciddi bir klinik komplikasyondur. Kriptosporidiyoz solunum yollarına kadar yayıldığı, özellikle *Cryptosporidium meleagridis*'in kuşlarda solunum yolu hastalığı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *Cryptosporidium* insanlarda balgamda, bronşiyal aspiratlarda ve bronş epitelinde de bulunmuştur (Leitch ve He 2011, Cacciò ve Putignani 2014).

Solunum yolu hastalığı sıklıkla *Cryptosporidium* spp.'nin Mycobacterium tuberculosis veya Pneumocystis carinii gibi diğer patojenlerle birlikte enfeksiyonundan kaynaklanır. Ancak *Cryptosporidium* spp.'nin tek enfeksiyon kaynağı olduğu vakalar da gözlenmiştir. Ayrıca kriptosporidiyozlu hastalarda reaktif artrit ve reiter sendromu gibi hastalıklar da görülmüştür (Cacciò ve Putignani 2014).



**Şekil 2.4** *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile görülen villus ve kript küntleşmesi. Normal (A) ve deneysel olarak enfekte (B) bağırsak piglet hücreleri (Xiao ve Griffiths 2020).

## 2.6. Konak İmmün Yanıtı

Kriptosporidiyoz neticesinde oluşan konak hücresinin immün yanıt mekanizmalarında rol alan 200'den fazla gen bulunduğu düşünülmektedir (O'Hara ve Chen 2011). Bu immün yanıt; enfekte bölgeye bağışıklık hücrelerini çekilmesi ve bu hücrelerden kemokinler üretilerek enfeksiyonun sınırlandırılması, enfekte hücrenin apoptozunun indüklenmesi ve lüminal eksozomlardan parazitisidal aktivite gösteren antimikrobiyal peptitlerin serbest bırakılması gibi mekanizmalar yoluyla olmaktadır. Diğer taraftan *Cryptosporidium parvum*, hücre içi gelişimini tamamlamak için yeterli zaman sağlamak amacıyla enfekte hücre apoptozunun engellenmesi, parazitin büyümesi için gerekli olan triptofanın yıkımına neden olan indolamin 2, 3 Dioksijenaz (IDO) enziminin konak hücresinden ekspresyonunun inhibe edilmesi ve bağırsak hücrelerinden antimikrobiyal peptitlerin salınmasının inhibe edilmesi gibi koruyucu mekanizmaları yavaşlatacak birkaç kaçış mekanizması geliştirmiştir (Laurent ve Lacroix-Lamandé 2017).

Kriptosporidiyoya karşı konak hücre immün yanıtı doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtı içermektedir. Doğuştan gelen bağışıklık, hücreleri ve humoral faktörleri içeren spesifik olmayan bir ilk yanıtıdır (Tomazic vd 2018). Doğuştan gelen bağışıklık, enfeksiyonun erken akut fazının kontrol edilmesinde anahtar bir rol oynar ancak yine de enfeksiyonu kesin olarak temizlemek için adaptif bağışıklık gereklidir. Monositler, makrofajlar ve dentritik hücrelerden (DC) oluşan mononükleer fagositler, enfeksiyonun akut fazı sırasında kullanılan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin temel hücreleridir (Laurent ve Lacroix-Lamandé 2017). Lamina propriadaki mononükleer fagositlerden eksprese edilen CD103+ dentritik hücreler; interlökin 12 (IL12) ve interlökin 18 (IL18) gibi proinflamatuvar sitokinleri üretir. IL12 ve IL18 sitokinleri ise Naturel Killer(NK) hücreleri tarafından, parazit enfeksiyonun kontrolünde kilit bir rol alan, interferon gamanın (IFN $\gamma$ ) üretimini sağlar. Diğer taraftan doğuştan gelen bağışıklıkta hücrelerden parazit lizisine yol açan beta defensin 2 ve cathelisin 37 (LL37) gibi antimikrobiyal peptitler de salgılanır. Ayrıca parazit ile enfekte olan hasarlı hücrelerden salınan Hasarla İlişkili Moleküler Paternler (DAMPs) ve İnterlökin 33 (IL-33) gibi moleküller doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive ederek proinflamatuvar etki gösterirler. Söz konusu aktivasyon neticesinde hasarlı hücrelerin apoptozunun uyarılması ile parazit sayılarının sınırlandırılması veya enfeksiyonun temizlenmesinin konak için koruyucu bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Şekil 2.5) (Cacciò ve Putignani 2014, Laurent ve Lacroix-Lamandé 2017, Tomazic vd 2018).

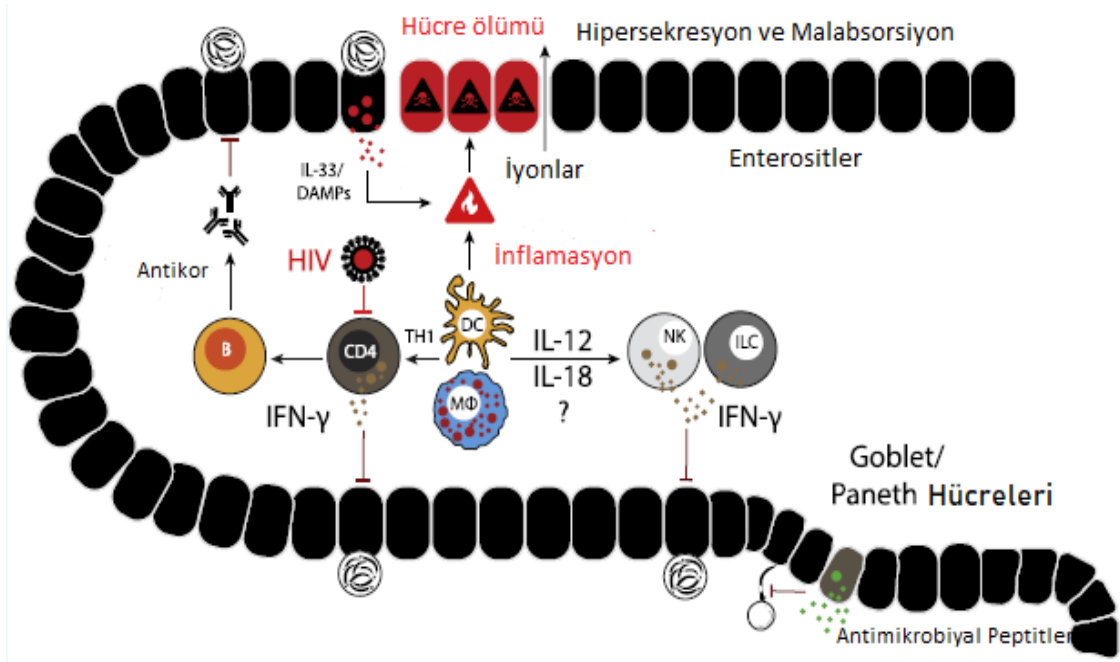
Adaptif bağışıklık sistemi, doğuştan gelen yanıtta daha spesifik ve etkili olan ikinci yanıtıdır. T ve B lenfositleri gibi hücreler ve antikolar gibi humoral faktörleri içerir.

Dentritik hücrelerden salgılanan yardımcı T hücreleri (Th1) sitokinlerinin T hücrelerini özellikle de CD4 hücrelerini indüklediği ileri sürülmüştür. CD4+ hücrelerinin IFN $\gamma$ , IL-4, IL-12 ve IL-18 gibi anahtar sitokinleri ürettiği gösterilmiştir. Ayrıca CD4+ hücrelerinin tip 2 (Th2) yardımcı T hücreleri sitokinlerinin vasıtasıyla B hücrelerinin antikor üretimine aracılık ettiği gösterilmiştir (Laurent ve Lacroix-Lamandé 2017, Tomazic vd 2018). Hastalığın şiddeti, AIDS gibi T hücresi fonksiyonunu etkileyen bağışıklık baskılayıcı hastalıklara sahip kişilerde daha fazladır (Bouzid vd 2013). Kriptosporidiyoz, CD4+ T-hücre sayısı 180 hücre/mm<sup>3</sup>'yi aştığında HIV+ hastalarında bile genellikle kendi kendini sınırlayan bir enfeksiyondur. CD4 hücre seviyeleri 100 hücre/ mm<sup>3</sup>'ye ulaşırsa, kriptosporidiyoz kronik bir seyir izlemektedir. Hücre sayımlarının 50 hücre/ mm<sup>3</sup>'ün altına düşmesi halinde ise hastalık daha şiddetli olabileceği hatta ölümcül hale gelebileceği bildirilmiştir. (Leitch ve He 2011, Stoyanova ve Pavlov 2019) Kriptosporidiyoz şiddetinin artmasıyla belirgin bir şekilde bağlantılı olan diğer hastalıklar; T hücresi fonksiyon bozukluğu ile karakterize hastalıklar, ciddi kombine immün yetmezlik sendromu, X'e bağlı hiperimmünoglobulin M sendromu ve CD4 lenfopenidir (Bouzid vd 2013). Etkilenen bağırsak bölümlerinde CD8+ T hücre sayıları da artar. CD8+ T hücrelerinin rolleri hala belirsiz olmakla beraber *Cryptosporidium* enfeksiyonuna karşı oluşan bağışıklık cevabında düzenleyici ve tamamlayıcı olduğu düşünülmektedir (Stoyanova ve Pavlov 2019).

*C. parvum* enfeksiyonundan sonra, B hücreleri tarafından sentezlenen IgG, Ig M ve IgA sınıfı parazite özgü immünoglobulinlerin (Ig) titresi artmaktadır (Tomazic vd 2018, Stoyanova ve Pavlov 2019). Yapılan çeşitli çalışmalar, önceki enfeksiyonlarda sentezlenen artmış IgM ve IgG seviyelerinin kısmi koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Esas olarak, hastalığın belirgin klinik belirtilerinin gelişmesini engellerler, ancak yeniden enfeksiyonu engellemezler (Stoyanova ve Pavlov, 2019). Mukozal IgA ise sporozoitler ile merozoitlerin yüzeyini kaplayarak ya da epitel hücrelerine tutunmayı ve penetrasyonu önleyerek hücresel yanıtta katkıda bulunabilir (Tomazic vd 2018, Stoyanova ve Pavlov 2019).

Genel olarak *Cryptosporidium* enfeksiyonuna karşı konak immün yanıtına yönelik günümüze kadar yapılan çalışmalar bağışıklık yanıtının mekanizması konusunda bir çerçeve çizmiş olmakla beraber söz konusu mekanizmaların açığa çıkartılması gereken kısımları bulunduğundan konu ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.





**Şekil 2.5** Kriptosporidyoza karşı konağın gösterdiği immün yanıt mekanizmalarının şematik gösterimi (Dumaine vd 2020).

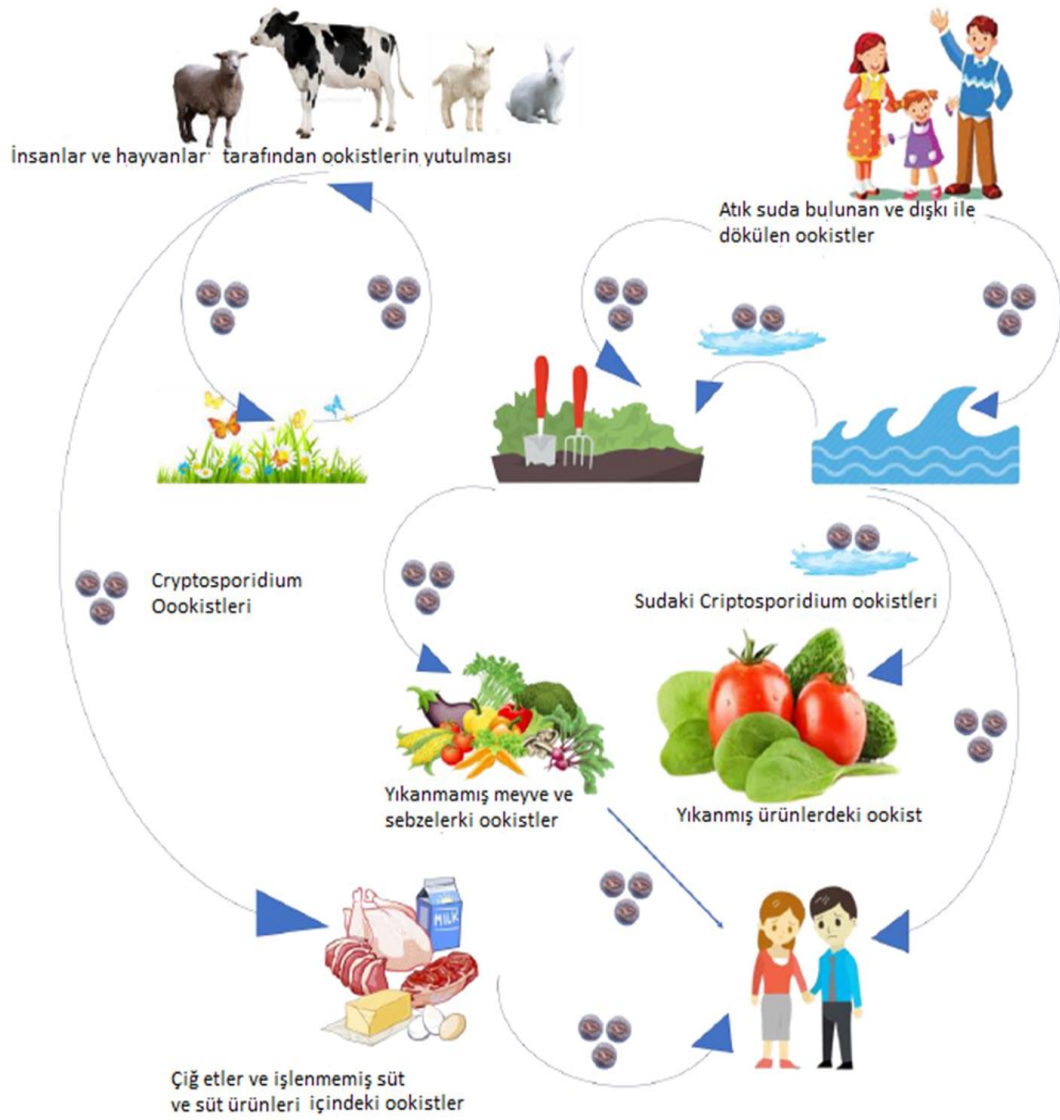
## 2.7. *Cryptosporidium* Enfeksiyonunun Bulaşma Yolları

Kriptosporidiyoz olgularında başlıca bulaşma kaynağı fekal-oral yoldur. *Cryptosporidium* bulaşma yolları doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Doğrudan yol, enfekte olmuş bir konak ile teması içerir ve bulaşma insandan insana, hayvandan insana veya insandan hayvana gerçekleşir. Dolaylı yolda ise, içme veya eğlence faaliyetlerinde kullanılan su yoluyla, toprak, fomitler ve yiyecek gibi *Cryptosporidium* içeren materyalin etkileşim ya da yanlışlıkla alımı yoluyla oluşan enfeksiyonları kapsar (Şekil 2.5). Su ve gıda kaynaklı kriptosporidiyoz olgularında birçok faktör etkili olmaktadır. Özellikle dışkı ile çok miktarda ookistin dışarı atılması, ookistlerin enfektif özelliğe sahip olması, yeni bir konak ya da olgunlaşma sürecine gereksinim duymaması, enfektif dozun düşük olması, inkübasyon süresinin uzun olması, klinik semptomlar görülmesi de dışkı ile atılan ookistlerin 60 güne kadar çevreyi kontamine edebilmesi, ookistlerin klor dâhil dezenfektanlara dirençli olması ve düşük sıcaklıktan etkilenmemesi bu faktörler arasında yer almaktadır (Şahin vd 2018, Pinto vd 2022). Yakın zamanlarda yapılan araştırmalarda; damlacıklara gömülü *Cryptosporidium* ookistlerinin solunmasının, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda gözden kaçan bir enfeksiyon kaynağı olabileceği gösterilmiştir (Pinto vd 2022).

İnsandan insana geçiş; kreşlerde, gündüz bakım evlerinde ve okullarda kötü hijyen koşulları altında çocuklar ve çalışan personel arasında kolayca

yaşanabilmektedir. Hastanelerde refakatçilerde ve odadaki diğer hastalara aynı tuvalet ve eşyaların kullanımı nedeniyle ikincil vakalar oluşabilmektedir. Ayrıca birden fazla partnerle cinsel ilişki *Cryptosporidium* diyaresine sahip olma riskini arttırmaktadır. Hayvandan insana geçişte; özellikle genç çiftlik hayvanları olmak üzere geniş bir yelpazede yer alan hayvan türleri kriptosporidiyozun en önemli zoonotik ajanlarıdır. Bu nedenle, mesleki nedenlerle veya eğlence amacıyla bu hayvanlarla temas eden kişiler risk altında olabilir. Veteriner hekimler, çiftçiler gibi tarım hayvanlarına maruz kalan diğer insanlar ve çiftlikleri ziyaret eden çocuklar arasında kriptosporidiyoz salgınları rapor edilmiştir. Su, yiyecek ile giysi ve ayakkabı gibi *Cryptosporidium* ookistleri ile kirlenmiş malzeme ile teması içeren dolaylı iletim yolu; genellikle dışkı, kanalizasyon, atık su ile oluşan çevresel kirlenme yoluyla ve genellikle şiddetli yağmur olaylarından sonra oluşan taşkınlar neticesinde ortaya çıkar (Bouzid vd 2013).

*Cryptosporidium*'un gıda kaynaklı bulaşması için insan ve hayvan dışkılarından elde edilen gübrelerin, sulamada yararlanılan kontamine suların, çiftlik çalışanlarının toprakla bulaşık ellerinin, sebze yetiştiricileri ve gıda işleyicilerinin; sebzelerin paketlenildiği, depolandığı, satıldığı veya hazırlandığı yerlerdeki kontamine yüzeylerin sebzelerin kontaminasyon kaynakları olabileceği belirtilmiştir (Çetinkaya 2004). Çiğ sebzelerde az sayıda *Cryptosporidium* ookistine tekrar tekrar maruz kalmanın koruyucu bağışıklık sağladığı ileri sürülmüştür. Daha yüksek seviyelerde anti-*Cryptosporidium* antikorlarının düşük diyare oranları ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir. Antikor seviyelerinin arttığı kişilerde daha düşük hastalık seviyelerinin, içme suyunda tekrarlanan maruziyetlerden oositlere karşı artan bağışıklığa bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Bouzid vd 2013).



**Şekil 2.6** Kriptosporidiyozun bulaşma yolları (Luka 2021)

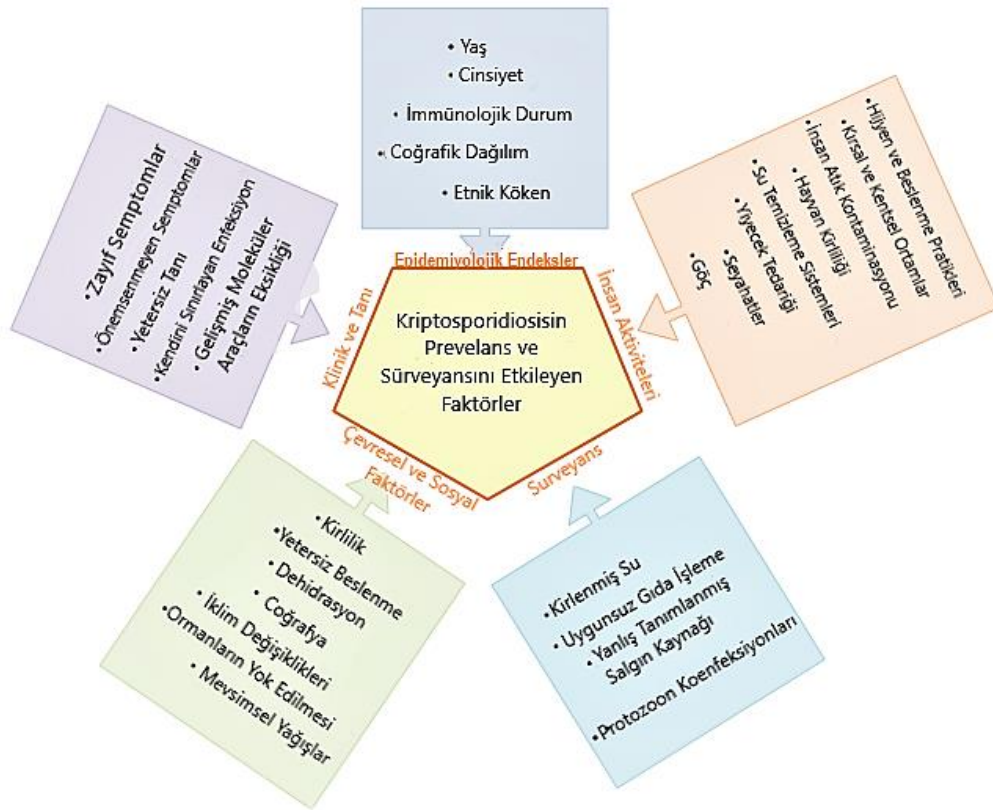
## 2.8. Epidemiyoloji

*Cryptosporidium* ookistleri, çoğu çevre koşuluna dirençli olmaları nedeniyle doğada yaygın olarak bulunmaktadır. *Cryptosporidium* türleri tüm dünyada bulunmakla birlikte gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyonun prevalansı daha yüksektir (Şahin 2018, Dumaine vd 2020). *Cryptosporidium* enfeksiyonu temelde sığır ve insan rezervuarları olan bir zoonozdur. İnsanların parazitleri, enfekte hayvanların veya diğer insanların dışkıları ile dökülen ookistlerin yutulmasıyla elde ettiği düşünülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde kriptosporidiyoz endemiktir ve çocuklar arasında kalıcı ishalin en yaygın

nedenlerinden biridir. Gelişmiş dünyada kriptosporidiyoz, çoğunlukla sporadik vakalarda ve salgınlarda ortaya çıkar. İmmün yetmezliği olan insanlar, özellikle hücre aracılı immünitesi yetersizliği olanlar, *Cryptosporidium* enfeksiyonuna özellikle duyarlıdır ve bu hastalığın en ciddi sonuçlarını yaşarlar (Leav vd .2003).

*Cryptosporidium* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde *Cryptosporidiumun* klor gibi inaktive edici maddelere direnci, ookist boyutunun (3,2-8,3 µm) küçük olması nedeniyle filtreleme zorluğu, düşük enfeksiyöz doz, doğada yaygın olarak bulunabilmesi çok değişik yollarla bulaşabilmesi nedeniyle patojenite yüksekliği, yüksek zoonotik potansiyeli (150'den fazla memeli türünü enfekte ettiği bilinmektedir) gibi özellikleri önemli rol oynamaktadır (Usluca ve Aksoy 2006).

*Cryptosporidium* türleri için coğrafi ortamlar, konak aralığı, bulaşma döngüsü ve yaygınlıktaki değişkenlik nedeniyle risk faktörlerinde de farklılık görülebilmektedir (Şekil 2.6). Örneğin yapılan bir çalışmada *C. hominis* vakaları için en güçlü risk faktörleri, sosyoekonomik düzeyi yüksek bölgelerde yaşamak, yüksek oranda küçük çocukların olduğu bölgelerde yaşamak ve kentsel alanlarda yaşamak olarak belirlenirken kırsal bölgelerde yaşamak, tarımsal arazi kullanımı ve bu bölgelerden su temini, *C. parvum* için önemli risk faktörleri olarak belirlenmiştir. Bu nedenle *C. hominis* ve *C. parvum* için risk faktörlerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda gelişmiş ülkelerde ishallerle (özellikle küçük çocuklarla) ve sığırlarla (özellikle buzağularla) temas, tatlı suda ve havuzda yüzmek, yurtdışı seyahat öyküsü, kaynatılmamış su tüketimi risk faktörleri olarak belirtilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde ise 2 yaşından küçük olmak, emzirme eksikliği, evcil hayvanlarla temas, kalabalık koşullarda yaşama, düşük doğum ağırlığı, erkek cinsiyeti, yetersiz beslenme ve koenfeksiyonlar kriptosporidiyoz için önemli risk faktörleri olarak belirlenmiştir. Bangladeşte 226 çocukla yapılan bir çalışmada hem asemptomatik hem de semptomatik enfeksiyonun insan lökosit antijeni (HLA) sınıf II DQB1 \* 0301 alelini taşıma ile güçlü bir ilişkisi olduğu bulunmuştur. Hem asemptomatik hem de semptomatik enfekte çocukların B \* 15 HLA sınıf I alelini taşıması daha olası olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma, *Cryptosporidium* enfeksiyonuna karşı HLA sınıf I ve II alelleri içeren immün yanıtın genetik bir bileşenin ilk tanımlaması olmuştur (Cacciò ve Putignani 2014).

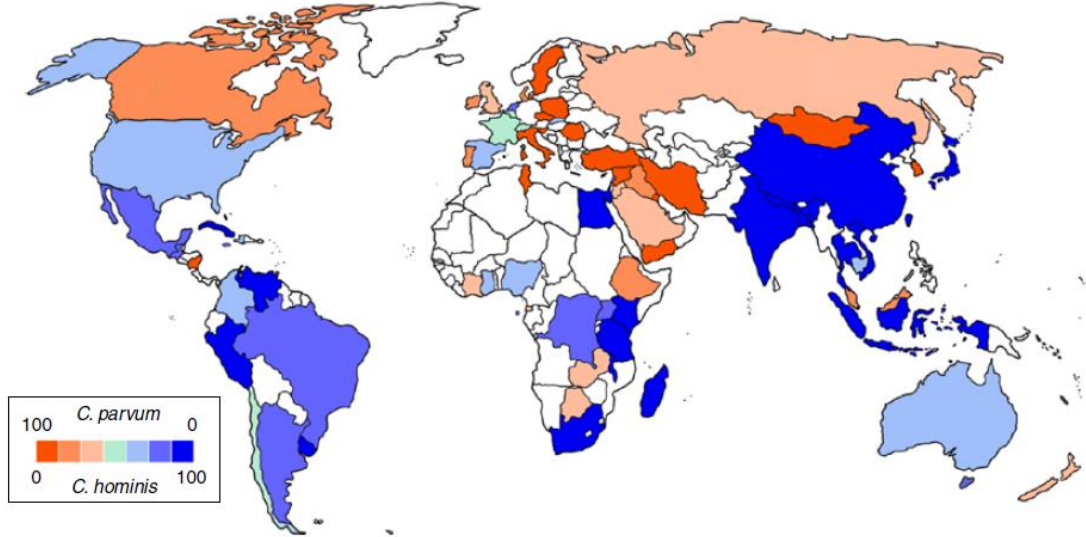


**Şekil 2.7** Kriptosporidiyozun bulaşındaki risk faktörleri (Cacciò ve Putignani 2014)

### 2.8.1. Coğrafya

Kriptosporidiyoz dünya çapında bir dağılıma sahiptir, ancak enfeksiyon prevalansının gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olduğu varsayılmaktadır. Birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede, kriptosporidiyozun rutin tespiti için sürveyans sistemleri bulunmamaktadır. Ayrıca hastalığın prevalansının zaman içinde nasıl değişebileceğini tahmin etmek için az sayıda çalışma yapılmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar *Cryptosporidium* spp.'nin coğrafik dağılımının dünyada farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda *C. parvum* ve *C. hominis*'in kriptosporidiyoz olgularının %90'ından sorumlu olduğu bildirilmiştir. *C. hominis* Güney Amerika, Avustralya, Çin, Japonya ve çoğu gelişmekte olan ülkede yaygınken; *C. parvum* Britanya başta olmak üzere A.B.D., Avrupa ve Yeni Zelanda'da daha fazla görülmektedir.(Şahin vd 2018). Ortadoğu ülkelerinde ise *C. parvum*'un daha yaygındır. *C. parvum* ve *C. hominis*'in dağılımı tek bir ülke içinde bile değişebilir; örneğin, *C. parvum* Amerika Birleşik Devletleri, İrlanda ve Yeni Zelanda'nın kırsal eyaletlerinde *C.*

*hominis*'ten daha yaygındır. Bulaşma yollarındaki büyük farklılıklar, *Cryptosporidium* türlerinin dağılımında gözlemlenen farklılıkları açıklayabilir (Şekil 2.8) (Cacciò ve Putignani 2014).



**Şekil 2.8** 222 hakemli yayının sistematik incelemesine dayanarak hazırlanan *C. parvum* (turuncu) ve *C. hominis*'in neden olduğu insan kriptosporidiyozunun göreceli küresel dağılımı (Nader vd 2019).

### 2.8.2. Mevsimsellik

Kriptosporidiyoz insidansı, mevsimsel değişimlerden çok fazla etkilenmektedir. Yapılan meta analizlerde sıcaklık ve yağıştaki artışlar kriptosporidiyoz insidansındaki artışla ilişkilendirilmiştir. Yağışların, nemli tropik iklimlerde kriptosporidiyoz için güçlü bir mevsimsel katalizör olduğu bulunmuştur. Öte yandan, ılıman iklimlerde, kriptosporidiyoz insidansının sıcaklıktaki artışla zirve yaptığı gösterilmiştir. Ancak mevsimsel kalıplar konuma göre değişiklik gösterme eğilimindedir. Örneğin Hindistan'ın daha ılıman kuzey kesiminde yaşayan çocuklar arasında kriptosporidiyoz kökenli ishal insidansı, sıcaklık ile pozitif ve nem ile negatif korelasyon göstermiştir. Ancak bu korelasyon daha tropikal güney bölgesinde yaşayan çocuklar için gözlenmemiştir. Bulaşma yollarındaki farklılıktan dolayı, farklı *Cryptosporidium* türleri için mevsimsel kalıpların değişmesi muhtemeldir. Nitekim, Birleşik Krallık ve Yeni Zelanda'da yapılan genotipleme çalışmalarında, ilkbahar sonlarında *C. parvum*'un neden olduğu insan vakalarının pik yaptığı, *C. hominis*'in neden olduğu vakaların ise sonbaharda pik yaptığını bulunmuştur. Bu durumun nedeni, *C. parvum* için buzağılama ve kuzulama mevsiminin ardından artan hayvan oookistlerine maruz kalma ve *C. hominis* için artan

seyahat, suya maruz kalma ve gündüz bakım merkezlerine devam etme olarak yorumlanmıştır (Cacciò ve Putignani 2014).

Diğer taraftan dünyamızda yaşanan iklim değişikliği nedeniyle meydana gelen şiddetli yağış, sel ve sıcak dalgaları sonuçlarıyla birlikte su kaynaklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Aşırı yağmur olayları, yaban hayatı veya evcil hayvanların dışkısının harekete geçmesine ve kanalizasyon taşkınlarına neden olmaktadır (Semenza 2020). Şiddetli yağmur sırasında ve sonrasında oluşan sel sonucu yüzey sularının mikrobiyolojik kirliliğinin artması nedeniyle *Cryptosporidium* spp.'nin 2,61 kat daha fazla görüldüğü gösterilmiştir (Lal vd 2019). Bu kirlenmeler neticesinde hayvan veya insan dışkısı kaynaklı patojenik mikroorganizmaların su dağıtım sistemine, yer altı ve çevre sularına sızmasına ve sonuçta su kaynaklı bir salgınlara neden olabilmektedir (Semenza 2020).

Sıcak hava, su ihtiyacını ve su tüketimini arttırmaktadır. Bu durum kaliteli su miktarını azaltır ve fırsatçı patojenler için uygun koşullar yaratabilir. İklim değişikliği, özellikle Akdeniz bölgesinde, geniş kapsamlı etkileri olabilecek kuraklık koşullarına katkıda bulunmuştur. Özellikle Fırat ve Dicle havzaları, muhtemelen iklim sistemindeki antropojenik müdahalenin bir sonucu olarak güçlü bölgesel ısınma ile oluşan bir yağış açığı yaşamıştır. Bu kuraklık sonucu tarımsal üretkenlikteki sert düşüş ve ülkede yaşanan iç savaş nedeniyle yüz binlerce insanın Suriye kırsalında zorla yerlerinden edilmesine yol açmıştır. 2015 yılında göç dalgası nedeniyle sınırlı veya aralıklı su mevcudiyeti nedeniyle insanlar güvenli olmayan su kaynaklarına güvenmek zorunda olmuş ve ishal hastalıkları için riski arttırmıştır (Semenza 2020).

### 2.8.3. Çocuklarda enfeksiyon

Kriptosporidiyoz hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yetişkinlere göre bebeklerde ve çocuklarda daha sık görülmektedir. Bunun hem kişisel hijyen eksikliğinden dolayı patojene daha fazla maruz kalma hem de bağışıklık eksikliği ile bağlantılı olması muhtemeldir. Kriptosporidiyoz esas olarak 1-9 yaş arası çocuklarda görülür ve gelişmiş ülkelerde enfeksiyonun başlangıcı ortak yüzme alanları ve eğlence amaçlı su kullanımı ile birlikte yaz aylarında zirve yapar. Bebeklerde en yaygın ikinci patojen olan *Cryptosporidium* 12-23 aylık bebeklerde artan ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir. Küresel olarak, her on çocuktan biri yaşamının ilk 5 yılında ishal ile ilişkili hastalıklar nedeniyle yaşamını kaybeder ve bu ölümlerin çoğu Sahra altı Afrika ve Güney Asya'da meydana gelmektedir (Cacciò ve Putignani 2014). Gelişmekte olan ülkelerde ishalleri çocukların %20'sinde kriptosporidiyoz var iken Kuzey Amerika ve



Avrupa'da bu oran %1 ile %5 arasında değişkenlik göstermektedir (Usluca ve Aksoy 2006).

Gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklar, immün hassasiyet, yetersiz beslenme ve HIV enfeksiyonunun yoğunluğunun oluşturduğu sinerjik etkilerden dolayı kalıcı enfeksiyona karşı benzersiz şekilde savunmasızdır. Bu bölgelerde, kriptosporidiyoz, erken çocukluk döneminde en yaygın görülen enfeksiyondur. Gelişmekte olan ülkelerde çocukların %45'i hastalığı 2 yaşından önce yaşamıştır (Cacciò ve Putignani 2014).

#### **2.8.4. İmmün yetmezliği olan kişilerde enfeksiyon**

Kriptosporidiyoz; bağışıklığı baskılanmış bireylerde şiddetli diyare ve ekstraintestinal enfeksiyonun önde gelen bir nedenidir. HIV ile enfekte hastaların yanı sıra, yüksek risk altındaki bireyler arasında X'e bağlı hiperimmünoglobulin M sendromu (XHIM), CD40 ligand veya gama-interferon eksikliği, lösemili çocuklar ve organ nakli alıcıları bulunur (Cacciò ve Putignani 2014).

#### **2.8.5. Gezginlerde enfeksiyon**

Gelişmekte olan dünyaya seyahat edenlerin yaklaşık %8'i seyahat sırasında veya sonrasında tıbbi bakıma ihtiyaç duyar ve tıbbi yardım arayanların dörtte birinden fazlasında gastrointestinal(GI) semptomlar görülmektedir.

Gezgin ishali (Seyahat ishali-TD), tropik bölgelerdeki Avrupalı veya Kuzey Amerikalı gezginlerin %20-60'ında görülür. Bakteriler, virüsler ve parazitlerin tümü TD'ye katkıda bulunabilir, ancak bunların göreceli önemi hala belirsizdir; bununla birlikte, başta Giardia ve *Cryptosporidium* olmak üzere protozoon enfeksiyonları, geri dönen yolcularda GI şikayetlerin nedeni olarak sıklıkla tanımlanmaktadır. Gelişmekte olan ülkelere gerçekleştirilen yolculuklardan sonra meydana gelen GI şikayetlerin nedeninin yolcuların kendi ülkelerinde dolaşımında olmayan parazit türlerine/genotiplerine maruz kaldıkları ve bu parazitlerle semptomatik enfeksiyonun, önceki maruziyetlerden kaynaklanan çapraz korumanın olmaması veya yetersiz olması nedeniyle ortaya çıktığı hipotezine dayandırılmaktadır (Cacciò ve Putignani 2014).

#### **2.8.6. Su kaynaklarında yapılan çalışmalar**

Dünya çapında atık sularda bildirilen en yaygın parazitler arasında yer alan *Cryptosporidium* küresel su kaynaklı hastalık yüküne önemli katkılarda bulunurlar.



Dünya genelinde atık sularda 1995-2017 yılları arasında *Cryptosporidium*'ün moleküler yöntemlerle tespiti için yapılan çalışmalar Tablo 2.3'te özetlenmiştir. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde örneklerin genelde USEPA protokolü izlenerek konsantre edildiği ve tespit için PCR ile IFA moleküler yöntemlerinin kullanıldığı anlaşılmaktadır (Tablo 2.3). Küresel olarak yürütülen bu araştırmalarda, atık sudaki *Cryptosporidium* için 20'den fazla tür ve genotipi bildirilmiştir. Bu çalışmalarda *Cryptosporidium* için prevalans oranları %11,4 ila %100 arasında ve ookist konsantrasyonu genellikle 10 ookist/L üzerinde tespit edilmiştir. Arıtılmamış atık sularda *Cryptosporidium* ookistlerinin oluşumu ve dağılımı genellikle popülasyondaki enfeksiyon ve ookist atılım oranları ile ilişkili olduğu, bu durumun da enfekte evcil ve vahşi hayvanlar tarafından su kaynaklarının kontamine edilmesinden etkilendiği düşünülmektedir (Zahedi vd 2021).

Dünya çapında yapılan bu araştırmalarda, atık sularda tespit edilen en yaygın *Cryptosporidium* türü insanda baskın tür olan *C. hominis* olduğunu bildirilmiştir; örneğin Avustralya (King vd 2015a, Zahedi vd 2018), Brezilya ve Peru (Ulloa- Stanojlović vd 2016, Martins vd 2019), Çin (Feng vd 2009, Li vd 2012, Huang vd 2017), Japonya (Hashimoto vd 2006, Hirata ve Hashimoto 2006), İsviçre ve Almanya (Ward vd 2002), ABD (Xiao vd 2001, Zhou vd 2003) ve Tunus (Ben Ayed vd 2012) (Tablo 2.3). Avrupa'da ise atık sulardaki baskın türün *C. parvum* olduğunu bildirilmiştir (Hänninen vd 2005, Spanakos vd 2015, Imre vd 2017, Ramo vd 2017). Çin, İran, Tunus ve ABD gibi diğer ülkelerde, atık su örneklerinde *C. andersoni* ve *C. xiaoi* gibi hayvancılıkla ilişkili türler baskındır. (Xiao vd 2001, Liu vd 2011, Ben Ayed vd 2012, Hatam-Nahavandi vd 2016, Ma vd 2019) (Tablo 2.3).

**Tablo 2.3** Atık sularda moleküler teknikleri kullanarak *Cryptosporidium*'u tespit etmek için yapılan çalışmalar (Zahedi vd 2021)

| Yıl       | Ülke             | Örnek Tipi                  | Tespit Edilen <i>Cryptosporidium</i> Türü  | Tespit Edilen <i>Cryptosporidium</i> Ookist Ortalaması   | Tespit ve Konsatrasyon Yöntemi                           | Referans                  |
|-----------|------------------|-----------------------------|--|--|--|---------------------------|
| 2016      | Romanya          | Aritilmiş su                | <i>C. parvum</i>   | 0.3 ± 6.89 ookist/L  | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623) | Imre vd 2017              |
| 2015-2017 | Çin              | Aritilmemiş lağım suyu      | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. canis</i>                           | Rapor edilmedi   | PCR;Filtrasyon, Santrifüj                                | Ma vd 2019                |
| 2014-2015 | Avustralya       | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> ve 18 tane tür daha                             | 7.0 × 10 <sup>1</sup> –18 × 10 <sup>3</sup> ookist/L   | PCR(NGS); Santrifüj                                      | Zahedi vd 2018            |
| 2014-2015 | Brezilya         | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> , <i>C. baileyi</i> ve <i>C. suis</i>           | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Martins vd 2019           |
| 2014-2015 | İran             | Aritilmemiş Su              | <i>C. xiaoi</i> ve <i>C. andersoni</i>   | Rapor edilmedi   | IFA ve PCR; Santrifüj                                    | Hatam-Nahavandi vd 2016   |
| 2014-2015 | Çin              | Aritilmiş su                | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. Meleagridis</i> ve 7 tane tür daha                        | Algılama limitinin altında – 1 ookist/L  | IFA ve PCR; Kalsiyum karbonat floksilasyon ve IMS        | Ma vd 2016                |
| 2013-2015 | İspanya          | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. cuniculus</i> ve 6 tane tür daha                          | Aritilmemiş: 9.6 × 10 ± 10.5 × 10 ookist/L<br>Aritilmiş: 3.1 × 10 ± 7.0 × 10 ookist/L  | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623) | Ramo vd 2017              |
| 2013-2014 | Brezilya         | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>Cryptosporidium</i> spp.  | Aritilmemiş: 4.1 × 10 <sup>1</sup> ± 1.2 × 10 <sup>2</sup> ookist/L<br>Aritilmiş: 1.7 × 10 <sup>1</sup> ± 1.0 × 10 <sup>2</sup> ookist/L | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj                        | Yamashiro vd 2019         |
| 2013      | Avustralya       | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> ve <i>C. parvum</i>  | Aritilmemiş: 1.0 × 10 <sup>4</sup> ookist/L  | IFA ve PCR; Kalsiyum karbonat floksilasyon ve IMS        | King vd 2015a             |
| 2013      | Yunanistan       | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. parvum</i> ve <i>C. muris</i>  | Rapor edilmedi   | IFT ve qPCR; Alimünyum sülfat floksilasyon ve Santrifüj  | Spanakos vd 2015          |
| 2012-2014 | Çin              | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. meleagridis</i> ve 6 tane tür daha                        | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Huang vd 2017             |
| 2012-2013 | Brezilya ve Peru | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> ve <i>C. cuniculus</i>   | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Ulloa-Stanojlović vd 2016 |
| 2011-2013 | İsrail           | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i> ya da <i>muris</i> ve <i>C. meleagridis</i> | Aritilmemiş: 4 – 1.2 × 10 <sup>2</sup> ookist/L<br>Aritilmiş: 0.1 – 1.2 × 10 <sup>2</sup> ookist/L                                       | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623) | Taran-Benshoshan vd 2015  |

**Tablo 2.3** (Devam) Atık sularda moleküler teknikleri kullanarak *Cryptosporidium*'u tespit etmek için yapılan çalışmalar (Zahedi vd 2021)

|                   |                             |   |  |  |                          |
|-------------------|-----------------------------|---|--|--|--------------------------|
| 2011-2012 A.B.D.  | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>Cryptosporidium</i> spp.   | Aritilmemiş: $7.4 \times 10^1 - 3.0 \times 10^2$ ookist/L<br>Aritilmiş: $4 - 1.3 \times 10^1$ ookist/L               | IFA ve PCR; Elektonegatif Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1622) | Schmitz vd 2018          |
| 2011-2012 A.B.D.  | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>Cryptosporidium</i> spp.   | Aritilmemiş: $< 4.0 \times 10^1 - 7.2 \times 10^2$ ookist/L<br>Aritilmiş: $4 - 4 \times 10^1$ ookist/L               | IFA ve PCR; Elektonegatif Filtrasyon, Santrifüj, IMS                   | Kitajima vd 2014         |
| 2011-2012 İsveç   | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>Cryptosporidium</i> spp.   |  | RT-PCR; Santrifüj  | Berglund vd 2017         |
| 2009-2011 Almanya | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. parvum</i>  | Aritilmemiş: $5.0 \times 10^1 - 1.3 \times 10^3$ ookist/L<br>Aritilmiş: $3.0 \times 10^1 - 1.2 \times 10^3$ ookist/L | IFA, DAPI ve PCR ; Santrifüj, IMS (USEPA Metot 1623)                   | Ajonina vd 2012          |
| 2009-2011 Almanya | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>Cryptosporidium</i> spp.   | Rapor edilmedi   | IFA ve PCR; Alimünyum sülfat floksilasyon ve sükröz santrifüj          | Gallas-Lindemann vd 2013 |
| 2009-2010 Çin     | Aritilmemiş Su              | <i>C. andersoni</i> ve <i>C. ubiquitum</i> ,                                    | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Liu vd 2011              |
| 2009 Çin          | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> ve <i>C. meleagridis</i>                                      | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Jiang vd 2020            |
| 2009 Tunus        | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> ve <i>C. andersoni</i>   | Aritilmemiş: $1 - 2.1 \times 10^1$ ookist/L<br>Aritilmiş: tespit edilememiştir                                       | IFA ve PCR ; MBMI ve IMS (USEPA Metot 1623)                            | Khouja vd 2010           |
| 2008-2009 İspanya | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>                      | Aritilmemiş: $1 - 5.0 \times 10^1$ ookist/L<br>Aritilmiş: $1 - 1.2 \times 10^2$ ookist/L                             | PCR ; Filtrasyon ve IMS (USEPA Metot 1623)                             | Castro-Hermida vd 2011   |
| 2007-2009 Türkiye | Aritilmemiş lağım suyu      | <i>Cryptosporidium</i> spp.   | Rapor edilmedi   | PCR ve Mikroskopi (Kinyonun aside dirençli boyama); Filtrasyon         | Aslan vd 2012            |
| 2006-2009 Çin     | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. cuniculus</i> ve 9 tane tür daha   | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Li vd 2012               |
| 2006-2007 Çin     | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. meleagridis</i> ve 5 tane tür daha | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj   | Feng vd 2009             |
| 2006-2007 İtalya  | Aritilmiş su                | <i>C. parvum</i>  | $3.6 - 5.8 \times 10^3$ ookist/L   | IF ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj                                       | Gianguaspero ve vd 2009  |
| 2005-2008 Tunus   | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> ve 6 tane tür daha       | Rapor edilmedi   | Perkoll- sükröz floksilasyon PCR; Sedimentasyon ve santrifüj           | Ben Ayed vd 2012         |

**Tablo 2.3** (Devam) Atık sularda moleküler teknikleri kullanarak *Cryptosporidium*'u tespit etmek için yapılan çalışmalar (Zahedi vd 2021)

|                  |            |                             |   |  |   |                          |
|------------------|------------|-----------------------------|---|--|---|--------------------------|
| <b>2004-2006</b> | İtalya     | Aritilmiş su                | <i>C. parvum</i>  | $5.62 \times 10^1 \pm 8.06 \times 10^1$ ookist/L<br>(ortalama konsantrasyon)                           | IF ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj ve Perkoll- sükröz floksilasyon          | Lonigro vd 2006          |
| <b>2004</b>      | İspanya    | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. baileyi</i> ve <i>C. muris</i>  | Aritilmemiş: $1.6-1.1 \times 10^3$ ookist/L<br>Aritilmiş: $3.6 \times 10^1 - 5.2 \times 10^2$ ookist/L | IFAT ve PCR; Santrifüj  | Gómez-Couso vd 2006      |
| <b>2003</b>      | Japonya    | Aritilmemiş Su              | <i>C. parvum</i>  | Rapor edilmedi   | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623)                  | Hirata ve Hashimoto 2006 |
| <b>2003</b>      | Japonya    | Aritilmemiş Su              | <i>C. parvum</i>  | Rapor edilmedi   | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623)                  | Hashimoto vd 2006        |
| <b>2001</b>      | A.B.D.     | Aritilmiş su                | <i>C. parvum</i>  | $2 \times 10^2 - 3 \times 10^2$ ookist/L   | IFA ve PCR; Seri Filtrasyon, Santrifüj, IMS (USEPA Metot 1622)            | Tsuchihashi vd 2003      |
| <b>2000-2002</b> | A.B.D.     | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> ve 3 tane tür daha                         | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj ve IMS   | Zhou vd 2003             |
| <b>2001</b>      | Finlandiya | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>C. parvum</i>  | Rapor edilmedi   | IFA ve PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623)                  | Hänninen vd 2005         |
| <b>2000</b>      | A.B.D.     | Aritilmemiş Su              | <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. ubiquitum</i> ve <i>C. felis</i> | Rapor edilmedi   | PCR; Filtrasyon, Santrifüj, IMS(USEPA Metot 1623)                         | Xiao vd 2001             |
| <b>2000</b>      | Almanya    | Aritilmemiş Su              | <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i> ve <i>C. baileyi</i>                       | Rapor edilmedi   | PCR; Santrifüj ve IMS   | Ward vd 2002             |
| <b>1995</b>      | A.B.D.     | Aritilmiş ve aritilmemiş su | <i>Cryptosporidium</i> spp.   | Aritilmemiş: $1.5 \times 10^3$ ookist/L<br>Aritilmiş: $1.7 \times 10^1$ ookist/L                       | IFA ve PCR; Santrifüj ve Perkoll- sükröz floksilasyon (USEPA Metot, 1995) | Mayer ve Palmer 1996     |

2022 yılında yapılan derlemede, MENA bölgesini (Orta Doğu Ülkeleri ve Kuzey Afrika) oluşturan ve tez çalışmasının yapıldığı Mardin ili ile benzer mevsimsel özellikler gösteren Cezayir, Bahreyn, Mısır, İran, Irak, İsrail, Ürdün, Kuveyt, Lübnan, Libya, Fas, Umman, Filistin, Katar, Suudi Arabistan, Suriye, Türkiye, Tunus, Birleşik Arap Emirlikleri ve Yemenin yer aldığı 20 ülkede 2005-2021 yılları arasında *Cryptosporidium* ile ilgili yayınlanan makaleler taranmıştır. *Cryptosporidium* ile ilgili en fazla makale İran'dan alınmış (17), ardından Mısır (11), Cezayir (10), Irak (7), Türkiye (4), Ürdün, Kuveyt, Suriye, İsrail ve Tunus (1'er adet) çalışma yer almıştır. MENA bölgesinin geri kalan 10 ülkesinde çalışmalar bulunamamıştır. Çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* spp. moleküler karakterizasyonu ile ilgili Mısır, İran, Irak, Tunus ve Türkiyeden toplam 10 çalışmada rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda *Cryptosporidium* spp.'nin farklı su türlerindeki prevalansı %5,2 - %80 arasında tespit edilmiştir. MENA bölgesinden alınan su ve çevre örneklerinde 10 tane *Cryptosporidium* türü rapor edilmiştir (Tablo 2.4). Genel olarak, MENA bölgesindeki kriptosporidyozun ortaya çıkmasıyla ilişkili risk faktörleri kötü hijyen, kirli içme suyu, yoksulluk, aşırı kalabalık, ishalleri aile bireyleri ve hayvanlarla temas olarak tespit edilmiştir (Hijjawi vd 2022).

**Tablo 2.4** MENA bölgesinden 2005-2021 yılları arasında alınan su ve çevre örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin ve alt tiplerinin prevalansı ve moleküler karakterizasyonu (Hijjawi vd 2022)

| Ülke   | Su Kaynağı                            | Örnek Konsantrasyon ve Ookist Geri Kazanım Yöntemi | PCR ya da Mikroskopi ile Tespit Edilen Pozitiflik Yüzdesi | Genotipleme Yöntemi (Hedef Gen)    | Tespit Edilen Tür  | Referans                  |
|--------|---------------------------------------|--|---|------------------------------------|--|---------------------------|
| Mısır  | Musluk suyu                           | Membran filtrasyon                                 | Mikroskopi ile %36,3 (29/80)                              | Nested PCR (COWP)                  | <i>C.parvum</i> %20,7<br><i>C.hominis</i> (%75,9)<br><i>C.parvum-C.hominis</i> %3,4  | Hamdy vd 2019             |
| İran   | Kanalizasyon ile kirlenmiş nehir suyu | Membran filtrasyon                                 | PCR ile % 52,6 (10/19)                                    | Nested PCR (18 rRNA)               | <i>C. parvum</i> %30<br><i>C. hominis</i> %10,<br><i>C.muris</i> %10   | Mahmoudi ve Karanis, 2020 |
| İran   | İnsan ve hayvancılık atık suyu        | Santrifüj ve ardından su-eter çöktürme prosedürü   | Mikroskopi ile %62,9(34/54)<br>PCR ile %70,5 (24/34)      | PCR (18S rRNA) %91,6 (22/24)       | <i>C.andersoni</i> %95,4 ,<br><i>C. xiaoi</i> % 4,6  | Hatam-Nahavandi vd 2016   |
| İran   | Nehir suyu                            | Membran filtrasyon ve immünomanyetik ayırma        | PCR ile % 48,97 (24/49)                                   | PCR (18S rRNA ve gp60)             | <i>C. parvum</i> %45,8 ,<br><i>C. hominis</i> %29,2,<br><i>C.muris</i> %12,5,<br><i>C.andersoni</i> 8,3,<br><i>C.canis</i> 4,2 | Mahmoudi vd 2015          |
| Kuveyt | Su deposu                             | US EPA 1623  | İFA %20 (1/5)   | PCR-RFLP (ss rRNA, COWP ve TRAP C) | <i>C. parvum</i> %100  | İqbal vd                  |

**Tablo 2.4** (Devam) MENA bölgesinden 2005-2021 yılları arasında alınan su ve çevre örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin ve alt tiplerinin prevalansı ve moleküler karakterizasyonu (Hijawi vd 2022)

|                |   |  |  |  |   |                      |
|----------------|---|--|--|--|---|----------------------|
| <b>Tunus</b>   | Atık Su Arıtma Tesisi                                 | Modifiye Bailenger yöntemi (MBM), immüno manyetik ayırma (IMS) ve ardından immüno floresan tahlil mikroskobu kullanılarak mikroskopi | İmmunoflorosa n Mikroskopi ile toplam %50 (10/20), Ham atık su %72 (5/7), Arıtılmış atık su %12,5 (1/8), Çamur %80 (4/5) | Nested PCR (ss rRNA)                   | Ham atık su <i>C. parvum</i> 4/5 , <i>C. hominis</i> 2/5, <i>C.muris/C.andersoni</i> 1/5 Arıtılmış Atık su <i>C. muris</i> , Çamur <i>C. parvum</i> 4 , <i>C. hominis</i> 3, <i>C.andersoni</i> 1 | Khouja vd 2010       |
| <b>Tunus</b>   | Atıksu ve lağım suyu                                  | Peletlerin %2,5 potasyum dikromat içinde santrifüjlenmesi ve depolanması   | PCR ile Ham su %38,2 (42/110) Arıtılmış su %12,7 (14/110) Çamur %41,7 (5/12)   | Nested PCR (ss rRNA ve gp60)           | <i>C. parvum</i> 10/19, <i>C. hominis</i> 10/22, <i>C. andersoni</i> % 47,9, <i>C.muris</i> 4/11, <i>C. ubiquitum</i> (4/6), <i>C.meleagridis</i> (1/2)   | Ben Ayed vd 2012     |
| <b>Türkiye</b> | Çevre Su Kaynağı                                      | Belirtilmemiş  | İFA ve PCR ile Çevresel su kaynakları %38,3 (92/240) ve 38.8% (70/180)   | LAMP(SAM geni) ve Nested PCR (ss rRNA) | <i>C. parvum</i> 61.1% (11/18) <i>C. bovis</i> 33.3% (6/18) <i>C. felis</i> 5.6% (1/18)   | Koloren ve Ayaz 2016 |
| <b>Türkiye</b> | Deniz ve Musluk Suyu Örnekleri                        | Belirtilmemiş  | İmmunoflorosa n Mikroskopi ile %43.3 (26/70) Deniz suyu %68.6 (48/70) Musluk suyu  | Nested PCR (18S rRNA)                  | <i>C. parvum</i> 65.5% <i>C. hominis</i> (NSh), <i>C. meleagridis</i> (NS)  | Koloren vd 2013      |
| <b>Türkiye</b> | Su numuneleri (70 musluk, 50 kuyu ve 15 kanalizasyon) | Membran Filtrasyon ve ardından santrifüjleme   | Mikroskopi ile tespit edilen pozitif numunelere göre %5,2 (7/135) (modifiye soğuk Kinyoun acid fast)                     | PCR ve RLFP                            | <i>C. parvum</i> 100% (7/7)   | Aslan vd 2012        |

Türkiye’de ilk kez 1989’da keçilerde *C. parvum* bildirilmiş (Özkul vd 1989) olup, prevalans çalışmasını Erman vd (2000) yapmış, yoğun ölüm olayı ise 2005’te Sevinç vd tarafından bildirilmiştir (Birdane vd. 2017).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. oranı içme sularında %0-11.36, yüzey sularında %0-86.6 ve atık sularda %21.0-41.6 arasında belirlenmiştir (Şahin vd 2018).

### 2.8.7. Su kaynaklı salgınlar

Su kaynaklı bulaşıcı hastalıklar, küresel olarak ortaya çıkan bir halk sağlığı sorunudur. Suyun kontaminasyonundan kaynaklanan çeşitli topluluk salgınları, bağırsak protozoonlarının halk sağlığındaki önemini vurgulamıştır. Bu önemli patojenler arasında *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Microsporidia* ve daha önemli olarak *Cryptosporidium* bulunmaktadır. Su ortamında *Cryptosporidium* spp.'nin her yerde bulunması; çok çeşitli sayıda konak, bu konaklar tarafından dökülen aşırı yüksek sayıda ookist ve ookistlerin olağanüstü kararlılığı ile açıklanmaktadır. Bu nedenle su, nüfus için çok önemli bir enfeksiyon aracını temsil eder ve su kaynaklı kriptosporidiyoz, özellikle ciddi enfeksiyon riski altındaki popülasyonlar (hamile kadınlar, çocuklar, HIV pozitif ve organ nakli yapılmış hastalar) için ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Örneğin geçen yüzyılın başından 2016'ya kadar meydana gelen su kaynaklı salgınların taranması neticesinde; *Cryptosporidium*, protozoon parazitlerin neden olduğu bildirilen tüm su kaynaklı salgınların %60'ından (524/905) sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Ryan vd 2018).

1984 yazında Amerika Birleşik Devletlerinin Braun Station Teksas şehrinde yaklaşık 5900 kişinin etkilendiği salgın, rapor edilen ilk su kökenli kriptosporidiyoz salgınıdır. Tarihinin en büyük su kökenli hastalık salgını olarak bildirilen 1993 yılında Amerika Birleşik Devletlerinin Milwaukee şehrinde ortaya çıkan salgından yaklaşık 403.000 kişi etkilenmiştir. Salgının bölgenin içme suyunu sağlayan ve Michigan gölünden beslenen *Cryptosporidium* ookistleri ile enfekte 2 adet su deposundan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Çetinkaya 2004).

Rapor edilen çoğu salgın gelişmiş ülkelerde kaydedilmiş olup coğrafi bölgeler arasında rapor edilen salgınların sayısında büyük farklılıklar görülmüştür. Gelişmekte olan ve tropik ülkelerde kriptosporidiyoz prevalansının daha yüksek olmasına rağmen, bu bölgelerdeki risk faktörlerini belirlemek için çok az çalışma yapılmıştır. Ülkeler arasındaki salgınların prevalansındaki farklılıklar, muhtemelen, patojenik protozoa ile su kontaminasyonunu izlemek için teşhis yeteneklerinin ve gözetim programlarının mevcudiyetine bağlanmaktadır.

Yapılan bir çalışmada gelişmiş ülkelerin halk sağlığı, içme suyu kalitesi ve güvenliği konusundaki çok fazla bilgi birikimlerine rağmen, 2001'den 2016'ya kadar olan dönemde, söz konusu ülkelerde en az 24 su kaynaklı hastalık salgını meydana geldiği bildirilmiştir. Tüm bu salgınlar önlenemez nitelikte idi. Örneğin 2010 yılında İsveçin Östersund şehrinde 27.000 kişinin etkilendiği Avrupa tarihindeki en büyük kriptosporidiyoz salgınında altta yatan sebep, su otoriteleri tarafından ham su kaynağının bozulmamış durumuna olan inancı idi. Bir apartmanın kanalizasyonundan

kaynaklanan kontaminasyonun, *Cryptosporidium* oookistlerini ortadan kaldıracabilecek bir verimlilik seviyesinde çalışmayan su arıtma tesisi tarafından bertaraf edilememesi sonucu oluşmuştur. Bir başka örnekte 2008 yılında İngilterenin Northampton şehrinde 258.000 su kullanıcısının etkilendiği 422 vakanın rapor edildiği salgında etkin bir su arıtım tesisinde su geri kazanım tankına bir tavşanın girmesi ve orada boğularak ölmesi neticesinde hastaneye başvuran vakalarda *C.cuniculus* tespit edilmiştir. Arıtma tesisinde arıtılmış suyun sürekli kontrol edilmemesi nedeniyle bu salgının maliyeti 4.9 milyon Euro olmuştur. Gelişmiş ölkelerdeki salgınlar; genellikle su havzalarının temizliğine ya da su arıtma tesislerinin düzgün çalıştığına fazla güvenilmesi nedeniyle gerekli kontrollerin yapılmaması, suların klor gibi kimyasallarla kirletilmemesi gerektiği düşüncesi(kemofobi) ve cehalet gibi nedenlerle olmuştur (Hrudey ve Hrudey 2019).

2009-2017 döneminde Amerika Birleşik Devletlerinde meydana gelen salgınların incelendiği bir araştırmada 40 eyalet ve Porto Rikoda, 444 kriptosporidiyoz salgını ve 7.465 vaka bildirildi. Bildirilen 444 kriptosporidiyoz salgınının 183 tanesi (%41,2) su kaynaklıydı. Rapor edilen salgınların sayısı yılda ortalama yaklaşık %13 artmıştır. Salgınların başlıca nedenleri arasında havuzlarda veya su oyun alanlarında kirlenmiş suyun yutulması, enfekte sığırlarla temas ve çocuk bakım evlerinde enfekte kişilerle temas yer alır. Salgınlar daha çok temmuz ve ağustos aylarında meydana gelmiştir (Gharpure vd 2019).

Türkiye’de 2007 yılında İzmir’in bir köyünde ortaya çıkan içme suyu kaynaklı salgında, 191 kişinin dışkı örneğinin kinyounun aside dirençli boyaması sonucu 15 (%8) *Cryptosporidium* pozitif örnek olarak tespit edilmiştir (Dubey vd 1990).

## 2.9. Klinik Belirtiler

*Cryptosporidium* türlerinin neden olduğu bir bağırsak enfeksiyonu olan kriptosporidiyoz, küresel olarak akut ve kronik ishalin önde gelen nedenlerinden biridir. Klinik olarak diğer enterik patojenden ayırt edilmesi güçtür (Xiao ve Griffiths 2020). Hastalık nedeniyle ortaya çıkan belirtilerin şiddeti, süresi ve türü; hastanın yaşı ve bağışıklık durumu, parazitin türü ve yükü, enfeksiyon bölgesi ve enfeksiyonun kapsamına göre değişiklik göstermektedir (Dubey vd 1990, Şahin 2018). Hastalık bağışıklığı yeterli hastalarda çoğunlukla asemptomatik olmakla beraber semptom görülmesi durumunda 2 haftaya kadar görülen ishalden sonra kendi kendini sınırlar (Şahin, 2018, Xiao ve Griffiths, 2020). Ancak bazı durumlarda bu süre 5 haftaya kadar çıkmaktadır (Xiao ve Griffiths, 2020). 2 yaşından küçük çocuklarda ve bağışıklığı yetersiz kişilerde semptom görülme sıklığı ve şiddeti daha fazladır (Dubey vd 1990,



Şahin 2018). Kriptosporidiyoz karakteristik olarak bazen bol ve uzun süreli olabilen sulu ishal neden olur (Çetinkaya 2004, Abeledo-Lameiro vd 2019). İshal ve karın ağrısı genellikle hastaların tıbbi yardım istemesine neden olan ve kriptosporidiyozun laboratuvar tanısına yol açan semptomlardır. Diğer klinik özellikler bulantı, kusma ve düşük dereceli ateştir. Bazen kas ağrısı, halsizlik, baş ağrısı ve anoreksiya gibi spesifik olmayan semptomlar ortaya çıkabilir (Abeledo-Lameiro vd 2019). Çoğunlukla bağışıklığı yetersiz hastalarda görülen solunum yolunun parazit tarafından enfekte edilmesi durumunda öksürük, nefes darlığı, ateş ve göğüs ağrısı semptomları görülebilir (Cacciò ve Putignani 2014). Yine bağışıklığı yetersiz hastalarda hepatobiliyer sistemin enfekte olması durumunda ise kolanjit, pankreatit, sklerozan kolanjit, karaciğer sirozu görülebilir (Cacciò ve Putignani 2014, Leav vd 2003). Dışkı örneklerinde kan veya lökositler nadiren görülebilir. Hem düşük dereceli ateş hem de öksürük diğer enterik enfeksiyonlardan daha sık bulunur. Tekrarlanan maruziyetin yaygın olduğu gelişmekte olan ülkelerde, enfekte çocukların çoğu asemptomatiktir. Kriptosporidiyoz, yetersiz beslenen çocuklarda ve kalıcı ishali olan çocuklarda daha yaygındır. Bu çocuklarda kilo kaybı ve dehidrasyon görülür. Hem asemptomatik hem de semptomatik kriptosporidiyozun yetersiz beslenme, boy kısalığı ve bozulmuş bilişsel işleve neden olduğu görülmektedir. Sanayileşmiş ülkelerde kriptosporidiyozu olan bağışıklık sistemi yetersiz kişiler genellikle ortalama 9 ila 11 gün sürebilen klinik patlayıcı, sulu ishal semptomlarına sahiptir. Hastane yatışı, hastaların %7 ila %22'sinde görülebilir. Ancak hafif ishali çok az kişinin kriptosporidiyoz açısından test edildiği, test edilen kişilerin de ciddi semptomları olması ya da bir salgının parçası olması nedeniyle teste tabi tutulduğu göz önüne alınırsa söz konusu hastaneye yatış oranı yanıltıcı olabilir (Xiao ve Griffiths 2020). *Cryptosporidium* türleri ve alt türleri arasındaki klinik belirtilerdeki farklılıkları bildirilmiştir. *C. canis* ve *C. felis* sadece ishal ile belirti verirken *C. hominis* enfeksiyonunda eklem ağrısı, göz ağrısı, tekrarlayan baş ağrısı ve yorgunluk gibi bağırsak dışı belirtilerin de ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (Bouزيد vd 2013).

## 2.10. Tanı

### 2.10.1. Boyama ve mikroskopi

*Cryptosporidium* spp.'nin dışkı örneklerinde teşhisi; moleküler teknikler geliştirilmeden önce uzun bir süre boyunca çeşitli tekniklerle konsantre edilen ve boyanan dışkı örneklerinde parazit ookistlerinin mikroskopta tespiti ile mümkün olmuştur. Parazitin ayrıca balgam, duodenum sıvısı ve bağırsak biyopsi örneklerinde

de tanısı yapılabilir. Ookistlerin verimli bir şekilde tespiti için öncelikle örneklerin konsantre edilmesi gerekmektedir. En yaygın kullanılan ookist konsantrasyon teknikleri; santrifüj ve ardından doymuş sükröz çözeltisi (Sheather solüsyonu) içinde yüzdürme ile eter-formalin ve asetat-formalin gradyanları aracılığıyla sedimentasyondur. Konsantrasyon tekniklerini her zaman ookistlerin gözlemlenmesini kolaylaştıran boyama yöntemleri takip eder (Cunha vd 2019).

*Cryptosporidium* tespiti için örnekler boyama yapılmadan direkt yaş preparasyon yöntemi ile taranabildikleri gibi geleneksel olarak kullanılan modifiye edilmiş Ziehl-Neelsen ve Kinyoun'un aside dirençli boyaması, Heine'nin "negatif boyama tekniği" gibi farklı boyama yöntemlerinin yanı sıra floresan bazlı Auramin Fenol ve Safranin Metilen Mavisi boyama gibi farklı boyalar ve trikom boyama gibi daha az geleneksel uygulamalar kullanılarak da taranabilir (Adeyemo vd 2018, Xiao ve Griffiths 2020). *Cryptosporidium*'un dokularda görselleştirilmesi için yaygın olarak kullanılan boyama yöntemi, histolojik kesitlerde epitel hücrelerinin yüzeyinde yer alan, evrimsel formların 2.0 ila 7.5 µm arasında bazofilik küresel cisimler olarak görselleştirildiği hematoksilen-eozindir. Histolojik kesitlerde kullanılacak diğer teknikler, Schiff periyodik asit ve gümüş bazlı boyalardır. Transmisyon elektron mikroskobu, parazitlerin ultrastrüktürel morfolojinin görselleştirmesine izin verir (Cunha vd 2019).

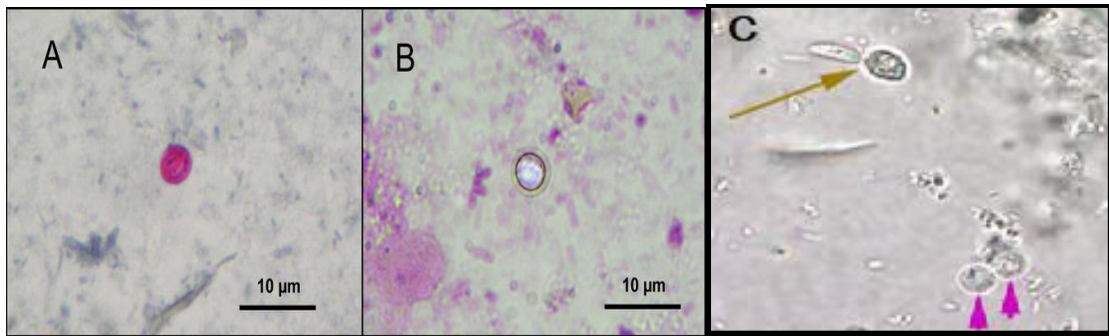
#### **2.10.1.1. Yaş preparat yöntemi**

Numunelerin su, tuzlu su, gliserin ve immersiyon yağı gibi sıvılarda askıya alınarak ışık mikroskobu, faz kontrast ve diferansiyel interferans kontrast mikroskopisi kullanılarak incelenmesi sonucu tespit edilen ookistler, mayalara benzer küçük yuvarlak yapılar (4 ila 6 µm) olarak görünür. Yaş preparat yöntemi esas olarak tarama için kullanılır ve özellikle orta ila yüksek sayıda ookist içeren numunelerde faydalıdır (Xiao ve Griffiths 2020).

#### **2.10.1.2. Aside dirençli boyama yöntemi**

Genellikle klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için düşük maliyet, kolay uygulanabilme ve çok sayıda numune taranabilme özellikleri nedeniyle tercih edilen yöntemdir. Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerini göstermek için en yaygın olarak kullanılan bu boyama teknikleri, ookist duvarının aside dayanıklı boyama özelliğine dayanmaktadır. Modifiye Ziehl-Neelsen asit fast sıcak boyama yöntemi, Kinyoun'un asit fast soğuk boyama yönteminin kullanıldığı iki çeşit aside dirençli boyama yöntemi vardır. Bu boyama yöntemlerinde ookistler kırmızı, arka plan ise

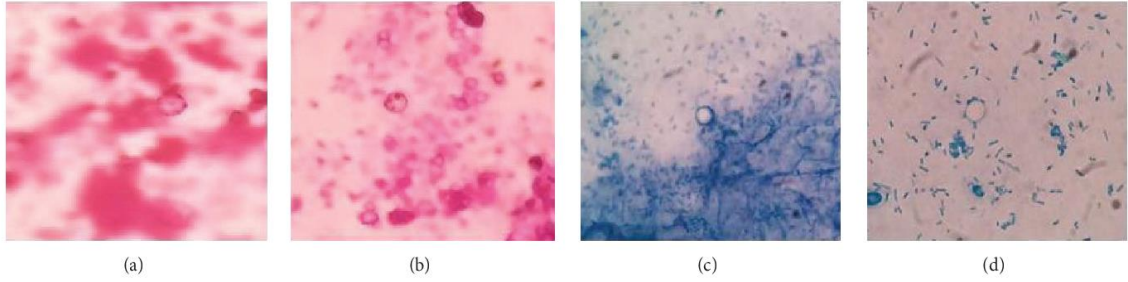
kullanılan karşıt boyaya göre yeşil ya da mavi görünür (Dubey vd 1990). Bazı çalışmalar bu boyama yöntemine soluk yeşil bir arka plana karşı ookistlerin parlak pembe ile fuşya renginde görüldüğü bir modifikasyon olarak dimetil sülfoksiti dahil etmiştir (Adeyemo vd 2018). Her ne kadar modifiye edilmiş Ziehl-Neelsen boyama *Cryptosporidium* için ana teknik olsa da zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren bir yöntemdir. Mikroskop lamplarındaki kalıntılar arasındaki ookistleri doğru ve tutarlı bir şekilde tanımlamak için önemli ölçüde uzmanlık gerekli olduğundan duyarlılık ve özgüllükten yoksundur. Yanlış pozitif sonuçlar, *Cryptosporidium* ookisti gibi boyanabilen yağ kabarcıklarının ve mayaların yanlış tanımlanması nedeniyle de ortaya çıkabilir. Bu yöntemle tür ya da genotip tespiti yapılamaz (Cunha vd 2019).



**Şekil 2.9** a) Modifiye EZN ile ookist görünümü b) Heinenin negatif boyama ile ookist görünümü (Potters ve Esbroeck 2010) c) Yaş Preparasyon yönteminde *Cryptosporidium* ookistleri pembe oklarla, tomurcuklanan bir maya kahverengi okla işaretlenmiştir (Xiao ve Griffiths 2020)

### 2.10.1.3. Heine'nin negatif boyama yöntemi

Taze dışkı örneklerinde daha iyi sonuç veren bu yöntem aside dirençli boyama yöntemine göre daha kısa hazırlık süresi ve daha az prosedür içermesi nedeniyle *Cryptosporidium* için basit, ucuz ve verimli bir tarama yöntemidir. Orijinal Heine boyama tekniğinde kullanılan karbol fuksin yerine malaşit yeşili, metilen mavisi ve kristal menekşe kullanılarak yapılan değişiklikler sonucu yöntemin duyarlılığı artırılmaya çalışılmıştır. En başarılı iyileştirmeler, yapıların görünürlüğünü en çok artıran malaşit yeşili ve kristal viole ile elde edilmiştir. Arka planın koyu renkte ookistin şeffaf olarak görüldüğü bu yöntem ookistlerin mayalardan ayırt edilebilmelerini daha da kolaylaştırır ve daha az deneyimli laboratuvar personeli tarafından teşhis için daha uygundur. Bu tekniğin duyarlılığı, faz kontrast mikroskobu inceleme ile daha da artırılabilir (Khanna vd 2014).



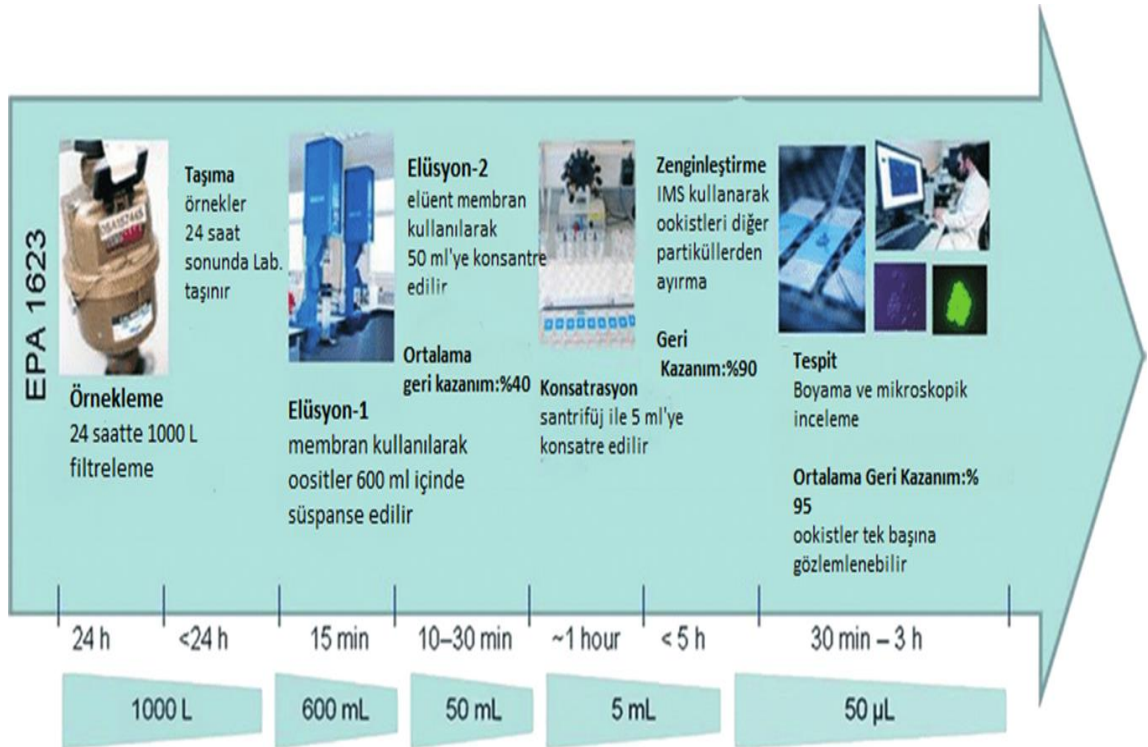
**Şekil 2.10** Heine negatif boyama yönteminde yapılan modifikasyonlar sonucunda *Cryptosporidium* ookistlerinin görünümü: a) Karbol fuksin b) Kristal viole c) Metilen mavisi d) Malaşit yeşili (Khanna vd 2014)

### 2.10.2. İmmünojenik yöntemler

Antijen tespiti için kullanılan immünojenik testler basit, hızlı ve spesifiktir. Daha yüksek bir maliyete sahip olmasına rağmen, immünojenik testler, tür farklılaşması için spesifik hedeflere yönelik monoklonal antikorlar kullanılır. Böylece bu yöntemler geleneksel boyama tekniklerine kıyasla mükemmel özgüllük ve hassasiyet sunarlar. Dışkıda antijenlerin tespiti (koproantijenler), *Cryptosporidium*dan kaynaklanan şüpheli enfeksiyon vakalarının teşhisinde faydalı bir araç haline gelmiştir. Dolaylı immünofloresans gibi immünojenik testler, su örneklerinde *Cryptosporidium*'u tanımlamak için de kullanılabilir. İmmüno manyetik ayırma yöntemi (IMS) ve floresan monoklonal antikor testi ile kombine edilmiş Direkt floresan antikor (DFA) ve immünofloresan antikor testleri (IFA), tüm parazitik protozoanların tespiti için sıklıkla kullanılmıştır (Adeyemo vd 2018, Cunha vd 2019). Genel olarak, immünojenik testlerin çoğu, zayıf geri kazanımlar ve çeşitli antikorlar tarafından hedeflenen antijenin yetersiz tanınması nedeniyle çevresel numuneler için duyarlı değildir. Bu durum çevresel suda bulunan karmaşık matrislerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, immünoassaylara dayalı çevresel verilerin yorumlanması, bu yöntemlerin sınırlamaları göz önünde bulundurularak yapılmalıdır (Adeyemo vd 2018).

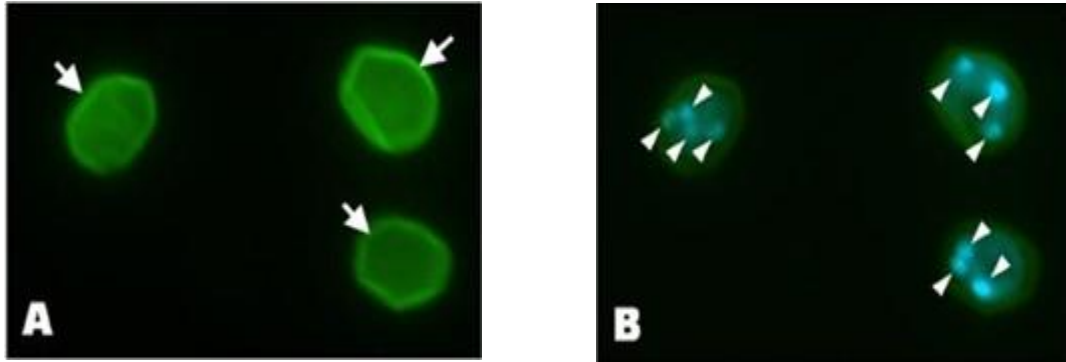
### 2.10.3. İmmüno manyetik ayırma saflaştırmasını kullanan immünofloresan testi (USEPA 1622 ve 1623)

ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından *Cryptosporidium*'u saptamak için tasarlanan US EPA 1622 veya 1623 metotları dünyada *Cryptosporidium* ookistlerinin çevresel örneklerde belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Yöntem su numunesi filtrasyonu; immüno manyetik ayırma (IMS); floresan boyama ve immünofloresan mikroskopi adımlarından oluşmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 US EPA 1623 Yöntemi aşamaları (Bridle vd 2012).

40 L'ye kadar su membran filtre kullanılarak doğrudan sahada filtrelendir. *Cryptosporidium*, diğer kirlenmelerle birlikte membran filtrede tutulur. Bu yöntemin önemli bir sınırlaması, *Cryptosporidium* oositlerine benzer boyuttaki istenmeyen toprak ve su parçacıklarının genellikle geri kazanılan oosit ile birlikte birikmesidir. Bu, *Cryptosporidium*'un saptanmasını zorlaştırır ve yanlış pozitiflerin sayısını artırır. Bu sorunun üstesinden gelmek için, genellikle oositleri diğer istenmeyen maddelerden ayırmak için bir anti-*Cryptosporidium* antikoru ile işlevselleştirilmiş süper paramanyetik boncuklardan oluşan immünomanyetik ayırma (IMS) yöntemi kullanılır. IMS, *Cryptosporidium* oositlerinin numunedeki diğer maddelerden ayırma verimliliğini artırır ve yanlış pozitif sayısını azaltır. Sonraki adımda oositler, floresan izotiyosyanat (FITC) ya da 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile konjüge edilmiş *Cryptosporidium*'a özgü antikolarla boyanır. Boyanmış oositler daha sonra bir floresan mikroskopu kullanılarak görselleştirilir. Bu yöntem pahalı, zaman alıcı, kapsamlı numune hazırlığı gerektiren, deneyimli personel, gelişmiş laboratuvar ve ekipman ihtiyacı nedeniyle saha araştırmaları için uygun değildir. Ayrıca, *Giardia* spp. gibi diğer patojenlerle çapraz reaktivitesi ve örnek kirliliği nedeniyle yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar oluşabilmesi nedenleriyle yöntemin seçiciliği ve duyarlılığı sınırlanmaktadır (Luka 2021).



**Şekil 2.12** A) Floresein izotiyosiyanat (FITC) ile konjüge edilmiş *Cryptosporidium*'a özgü antikorlarla boyanmış ookistler, parlak bir şekilde vurgulanmış kenarları olan parlak elma yeşili FITC floresansı sergileyen, 4 ila 6  $\mu\text{m}$  çapında oval ya da küresel bir görünüm sergiler B) Nükleik asit boyası olan DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyanan bir ookist aşağıdaki tipik özellik kategorilerinden birini sergileyecektir: yeşil kenarlı ve belirgin çekirdeksiz açık mavi dahili boyama (DAPI negatif), yoğun mavi dahili boyama veya dört adede kadar farklı, gök mavisi çekirdek (DAPI pozitif) (Rhodes vd 2012).

#### 2.10.4. Direkt ve indirekt İmmüno Floresan testi

Gaita örneklerinde fluorescein isothiocyanate (FITC) bağlı monoklonal antikorlar kullanılarak kistlerin tanımlanması esasına dayanan floresan antikor testleri tanımlama esnasında daha pahalı floresan mikroskoplar gerekli olsa da test, mükemmel özgüllük ve gelişmiş hassasiyet sağlaması, daha az zaman alması ve uygulanması için daha az beceri gerekmesi gibi avantajlar sunar. Direkt ve indirekt immüno floresan testleri arasında uygulamada farklar vardır. İndirekt immüno floresan, iki antikordan yararlanır. Bu durumda birincil antikor konjuge değildir ve ikinci floroforla konjuge antikor, hedeflenen patojenin saptanması için birincil antikora karşı afinite gösterir. Direkt floresan antikor testinde parazitin antijenine bağlanabilen floroforla konjuge tek bir antikor kullanılır. Bu durum direkt immüno floresan testinde daha az spesifik olmayan bağlanma ve daha kısa test süresi olmasına neden olur. DIF, insan doğrulama çalışmalarında %100 duyarlılık ve özgüllük göstermiştir ve diğer birçok çalışmada referans standart olarak kullanılmıştır (Adeyemo vd 2018).

#### 2.10.5. Enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELİSA)

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium*'a özgü antijenlerin antikorlar vasıtasıyla kalitatif tespiti için kullanılır (Adeyemo vd 2018). Genel olarak ELISA'da, sıvı fazdaki antijen, katı bir faz üzerinde hareketsizleştirilir. Daha sonra antijen ve spesifik antikor arasındaki etkileşim, alkalın fosfat, yaban turpu peroksidaz ve galaktosidaz gibi

enzimlerle etiketli ikincil bir antikor tarafından tespit edilir. Enzimatik reaksiyon, söz konusu antijenin varlığını gösteren renkli bir ürünle sonuçlanır. Son olarak, oluşan renkli ürünler kantitatif analiz için optik aletler kullanılarak tespit edilir (Luka 2021).

ELISA için bildirilen duyarlılığı ve özgüllük oranı % 93 - 100 aralığındadır. Bu test geleneksel boyama tekniklerinden daha hassas olması, çok sayıda numunenin daha kısa sürede çalışabilmesi, numune başına maliyetin daha düşük olması ve uygulamasının daha kolay olması gibi avantajlar sunar. ELISA testi, *Cryptosporidium*'u epidemiyolojik çalışmaların rutin olarak yapılmadığı laboratuvarlarda ve tanı standardizasyonuna ihtiyaç duyan laboratuvarlarda özellikle yararlı olabilir (Adeyemo vd 2018, Luka 2021).

ELISA'nın yüksek özgüllüğüne ve hassasiyetine rağmen, bu tekniğin hazırlık aşamasının zaman alıcı olması, yanlış pozitif ve yanlış negatif analiz sonuçların olabilmesi, gelişmiş laboratuvarlara, ekipmana ve eğitilmiş personele ihtiyacı gibi dezavantajları vardır (Luka 2021).

#### **2.10.6. Antijen tespit testleri**

Daha kesin, basit ve hızlı antijen algılama testleri uygun maliyetli rutin muayene için uygun bir alternatif sunar. Bu testler mikroskopik incelemeden üstündür ancak birden fazla reaktif ilavesi, yıkama adımları ve inkübasyon gerektirir. Ayrıca, daha yeni bir teknoloji olan immüno-kromatografik teknoloji, ek teşhis seçenekleri sağlar. Bununla birlikte, avantajlarına rağmen, bu hızlı immüno-kromatografik testlerin klasik immüno-lojik testler kadar duyarlı olmadığını ve daha yüksek yanlış pozitif oranlarına sahip olabileceğini iddia eden raporlar vardır (Adeyemo vd 2018).

##### **2.10.6.1. İmmunocard stat testi**

Ticari olarak üretilen immüno-kromatografik test olan ImmunoCard STAT, *Cryptosporidium*'u tek bir hızlı testte ayırt edebilen enzimatik olmayan hızlı bir immüno-lojik testtir. ImmunoCard STAT'ın basit olduğu ve zamandan tasarruf sağladığı kanıtlanmıştır ve *Cryptosporidiosis* için hızlı araştırma testleri olarak kullanılabilirler. Hatta tanıyı doğrulamak için diğer tanı profilleriyle entegre edilebilir. Testin uygulanması ve sonuçların yorumlanması, yüksek uzmanlık gerektirmediğinden kullanımı kolaydır (Adeyemo vd 2018).



### 2.10.6.2. Akış sitometrisi

Akış sitometrisi, etiketlenmiş *Cryptosporidium* ookistlerinin yer aldığı numunenin yaklaşık 100 µm çapında akış hücresinin içindeki hızlı akan bir sıvı akışına verilmesi ve numune içindeki hücrelerin tek bir dizi halinde odaklanmış bir ışık huzmesinin önünden geçmesi sonucunda bu hücrelerinin optik özelliklerini nicel olarak ölçülmesi prensibine dayanır. Akış sitometrisi, otomasyon ve nesnellik avantajlarına sahiptir ve saniyede binlerce hücreyi analiz edebilir. Diğer bir avantaj, floresan mikroskopik incelemeye kıyasla numunelerin daha doğru bir tanımını sağlayarak daha büyük hacimli numunelerin analiz edilebilmesidir. Yöntemin IMS, qPCR gibi yöntemlerle kombine edilerek hassasiyet ve seçiciliğinin artırılmaya çalışıldığı çalışmalar da mevcuttur. Enfekte olmuş farelerden alınan dışkı örneklerinin analizleri sonucu akış sitometrisi yönteminin geleneksel immünofloresan testinden neredeyse 10 kat daha duyarlı olduğunu doğrulanmıştır (Adeyemo vd 2018).

### 2.10.7. Nükleik asit bazlı yöntemler

Patojenlerin nükleik asit bazlı tespiti, geleneksel metodolojilere göre geri kazanılan ookist suşlarının/türlerinin konak özgüllüğünün tanımlanabilmesi, enfeksiyonların spesifik kaynağının ve ciddiyetinin belirlenebilmesi, ve herhangi bir salgın durumunda önleyici tedbirlerin uygulanması ve epidemiyolojik sürveyans çalışmaları için türlerin genotiplendirilebilmesi gibi potansiyel avantajlar sunar. Çevresel örneklerde parazitik protozoonların doğru, hassas ve sağlam bir şekilde tanımlanmasını sağlayabilirler. Çevresel örneklerde *Cryptosporidium* türlerinin tespiti ve genotiplenmesi için FISH, PCR, qPCR gibi moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Adeyemo vd 2018).

#### 2.10.7.1. Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), flüoresan etiketli oligonükleotidin veya problemlerin hedeflenen organizmanın DNA veya RNA'sındaki spesifik bölgeye hibridizasyonuna dayanır. FISH tekniği, mikrobiyolojide filogenetik, ekolojik, tanısal ve çevresel çalışmalar için güçlü bir araç olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem, hücresel düzeyde hayatta kalma ve enfeksiyon mekanizmalarını ortaya çıkarmaya yardımcı olabilir. Türe özgü problemlere dayanan yöntem, çevresel örneklerde *Cryptosporidium* ookistlerinin tespiti için uygulanmıştır. *Cryptosporidium* spp.'nin (*C. parvum* ve *C.*



*hominis*) türe özgü tanımlaması ve canlılığının tespiti için FISH ve monoklonal antikor insan dışkı ve su temini örneklerinde kullanımı da rapor edilmiştir. Duyarlılığı artırmak için kültürel ön zenginleştirme ve IMS gibi yöntemler ile zenginleştirme adımları sıklıkla gereklidir. FISH'in 3 saatlik bir zaman dilimi içinde klinik, su ve çevresel numunelerde patojenik *Cryptosporidium* türlerinin saptanması ve tanımlanması nedeniyle PCR ve RFLP analizlerine güvenilir bir alternatif olması avantajını sunar. Ayrıca FISH problemlerinin monoklonal antijenlere göre oosistlerin canlılık tespitinin yapılabilmesi ve türe özgü olması gibi ek bir avantajı vardır. *C. parvum* oosistlerinin canlılığını belirlemek için FISH kullanımı karmaşıktır çünkü canlı hücrelerden alınan rRNA numune işleme sırasında bozulabilir ve bu nedenle yanlış negatif FISH sonuçları üretilebilir. Ayrıca, yetersiz RNaz aktivitesi veya geçirgen olmayan inaktivasyon koşulları yoluyla canlı olmayan oosistlerde rRNA'nın uzun süreli korunması, yanlış pozitif FISH sonuçları üretebilir (Adeyemo vd 2018).

#### **2.10.7.2. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) testi**

Polimeraz zincir reaksiyonu; Numunede tespit edilmek istenen mikroorganizmanın çeşitli yöntemlerle ekstrakte edilen gen dizisinin, bu gen dizilerine özgü primerler kullanılarak birden fazla saptanabilir kopyaya çoğaltılmasını sağlayan güçlü moleküler araçlardır. PCR kaynatma, dondurma-çözme veya genomik DNA'yı çıkarmak için boncukların kullanılması gibi yöntemlerle oosistlerin kırılması, ekstrakte edilmiş DNA'nın, uygun primerler içeren bir PCR karışımı ile karıştırılması, DNA hedef dizisinin çoğaltılması, amplifiye ürünü saflaştırması ve son olarak amplifiye ürünün jel elektroforezi ve floresan boyalar kullanarak ayırma ve görselleştirme aşamalarından oluşmaktadır. Bu yöntemin avantajı, tekniğin geleneksel yöntemlere göre duyarlılığı fazla olması ve genotiplemenin yapılabilmesidir. PCR'ın standardize edilmemiş olması, pahalı ekipman ve malzeme ihtiyacı gibi dezavantajları vardır. Ayrıca PCR çevresel örneklerde *Cryptosporidium*'un tespiti için sıklıkla kullanılmakla birlikte artan yanlış pozitiflik oranlarına sahiptir. Diğer bir dezavantaj ise tüm PCR tabanlı tespit yöntemlerinin yalnızca önceden tanımlanmış hedefleri tanımlayabilmesidir. Bu nedenle, moleküler tekniklerin yüksek hassasiyet ve özgüllüğüne rağmen, yerinde tespit uygulamaları için uygun değildirler (Adeyemo vd 2018, Luka 2021).

### 2.10.7.2.1 Kantitatif PCR (qPCR)

Kantitatif PCR (qPCR), klinik örneklerde olduğu kadar çevresel örneklerde de patojenlerin saptanması ve miktarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmıştır. qPCR'ın normal PCR'dan farkı, başlangıç DNA miktarının hesaplanabilmesidir. Bu metot DNA amplikasyonunun gerçek zamanlı izlenmesine izin verir ve artan floresan ölçümleri ile ilişkilendirip kantitatif sonuçlar elde edilir (Khanna vd 2014, Adeyemo vd 2018). Geleneksel PCR'nin son nokta analiziyle karşılaştırıldığında, geniş bir dinamik aralıkta genetik hedeflerin nicelleştirilmesi qPCR'nin avantajlarından biridir. Başlangıçta qPCR tahlillerinde ss rRNA'yı hedef alınarak *Cryptosporidium* cinsinin neredeyse tüm üyeleri tespit edilmiştir. Ancak ss rRNA'nın genotiplendirmede ve alt tiplendirmede bazı sınırlamalarının olması nedeniyle başka hedef genler kullanılmaya başlanılmıştır (Adeyemo vd 2018).

### 2.10.7.2.2 Nested PCR

Nested PCR'da standart PCR reaksiyonuna göre duyarlılığı arttırmak için ard arda uygulanan iki polimeraz zincir reaksiyonu için iki primer seti kullanılır. Birinci primer setinin hedef DNA dışındaki dizilere bağlanarak bu dizler çoğaltılır ardından İkinci amplifikasyon mekanizmasında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak küçük alanın çoğaltılması sağlanmaktadır. Böylece reaksiyonun özgülüğü artar. Çünkü eğer ilk primer çiftinin spesifik olmayan bağlanması varsa, ikinci primer setinin de spesifik olmayan şekilde amplifiye edilmiş DNA şablonuna bağlanması pek olası değildir (Sevindik ve Abacı 2013, Adeyemo vd 2018) Yöntemin en önemli dezavantajı birincil amplifikasyon tüpünden ikincisine örnekler aktarılırken çok az da olsa çevreye örnek saçılması ve daha sonraki çalışmalarda hava yolu ile kontaminasyona neden olmasıdır (Sevindik ve Abacı 2013).

### 2.10.7.2.3 Droplet digital PCR

Bu teknik 20.000 ve hatta çok daha küçük droplet adı verilen reaksiyon kapları içinde nükleik asitlerin porsiyonlanması temeline dayanır. Standart bir PCR reaksiyonu daha sonra her bir droplet hedefini çoğaltmak için kullanılabilir, böylelikle ayrı ayrı pozitif ve negatif şekilde hedef bağımlı floresan sinyali ölçülebilecektir. "1" olan sinyal pozitif, "0" olan sinyal negatif olmak üzere ikili kod tekniğinin dijital kısmını temsil eder ve veriler Poisson dağılımına uygun olarak hesaplanabilmektedir (Carhan vd 2016). Bu da Droplet dijital PCR (ddPCR), geleneksel qPCR'den farklı olarak referans standart

eğrilerin olmaması nedeniyle üretilmesi zor olan standart kalibrasyon eğrilerine ihtiyaç duymadan DNA miktar tayinine olanak sağlar (Hassan vd 2020). Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalar ddPCR'ın qPCR'a göre duyarlılığının ve hassasiyetinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Carhan vd 2016). Ayrıca yapılan çalışmalarda, 18S rRNA ve aktin gen lokuslarını hedefleyerek su ve dışkı numunelerinde *Cryptosporidium* miktarının belirlenmesinde kullanılan ddPCR'ın kesinliğinin her iki lokus için qPCR'den daha yüksek olduğu ancak ddPCR'ın kesinliğinin azalan DNA konsantrasyonu ile azalırken, qPCR konsantrasyondan etkilenmediği bildirilmiştir. Diğer taraftan PCR inhibitörlerinin varlığının qPCR'yi etkilediği ancak ddPCR'yi etkilemediği bulunmuştur (Hassan vd 2020).

#### **2.10.7.2.4 Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP)**

*Cryptosporidium* tespiti için spesifik, hassas, hızlı ve verimli bir yeni gelişen teknik olarak kabul edilmiştir (Luka 2021). Bu reaksiyon için toplam 4-6 primer ve yer değiştirme özelliği olan Bst DNA polimeraz enzimi kullanılır. LAMP PCR metodunda; reaksiyon sırasında primer bağlanması için sürekli tek iplikçikli bir bölgenin sağlanması ile izotermal şartlarda PCR reaksiyonu sağlanır. Çift iplikçikli DNA 65°C'de dinamik dengede olduğundan primerlerden biri hedefine bağlanarak reaksiyonu başlatır. Primerlerin karşılıklı oluşturduğu bu reaksiyon sonunda 'dumble' tarzında amplifikasyon için başlangıç ürünü oluşturur. Bu ilmikli (loop), dumble formasyonlu nükleik asitin ilmiklerindeki primer bölgelerinden seri amplifikasyon işlemi gerçekleşir ve sonunda ilmikli, değişik ve büyük boyutlarda DNA ampikonları oluşur (Altındiş vd 2017).

*Cryptosporidium* tespiti için diğer tespit yöntemlerine göre LAMP'nin *Cryptosporidium*'u su örneklerinde nispeten düşük konsantrasyonda tespit edebilme ve çok sayıda biyolojik kirlenici içeren bir numuneyi büyük miktarda DNA izole etme ve sentezleyebilme avantajı sunar. Ayrıca, LAMP çevresel örneklerde yaygın olarak oluşan PCR inhibitörlerine karşı duyarsızdır ve PCR'a kıyasla daha kısa bir analiz süresine sahiptir. Yapılan çalışmalarda LAMP'ın, su örneklerinde immüno Floresans testleri (IFA) ve PCR ile karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyet gösterdiği anlaşılmıştır (Luka 2021).

#### **2.10.7.3. Yeni nesil dizileme (NGS)**

Büyük paralel dizileme olarak da adlandırılan ve son 15 yılda geliştirilen yeni nesil dizileme (NGS), önceden dizi bilgisi olmadan milyonlarca DNA parçasının aynı anda dizilenmesine izin vermektedir. Bu ileri teknoloji, daha önce Polimeraz Zincir

Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiş bir veya birkaç nispeten kısa DNA fragmanının tüp başına dizilenebildiği geleneksel dizileme yöntemlerine kıyasla gerçek bir devrim olmuştur.

Yeni nesil dizileme şu basamaklarda açıklanabilir:

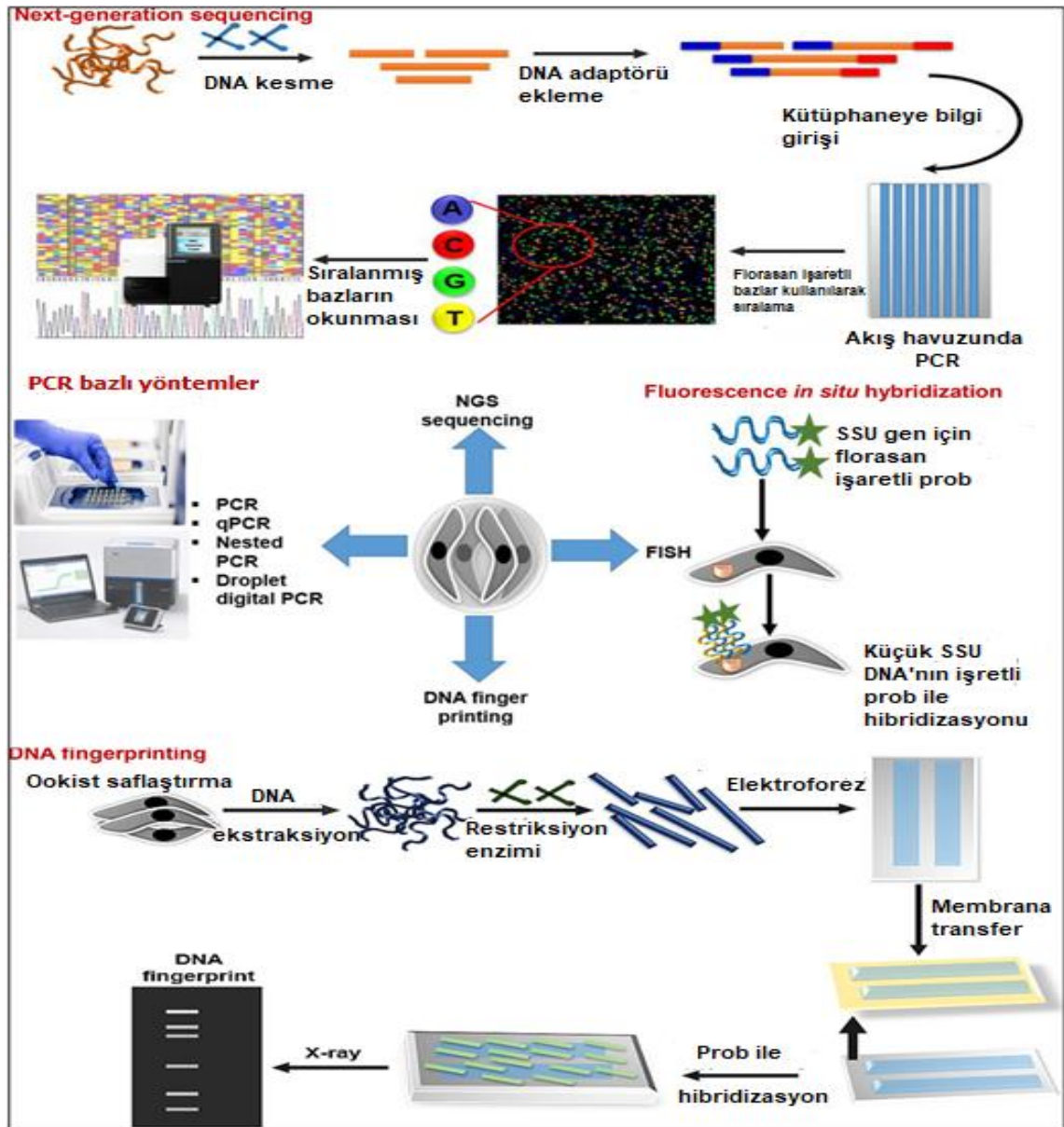
- Dizilenecek olan DNA bir veri kütüphanesi oluşturmak için mekanik veya enzimatik olarak 200-300 nükleotidlik parçalara ayrılır.
- Daha sonra bu parçaların uçlarına adaptör dizileri ve barkod dizileri eklenir.
- Adaptör dizileriyle katı yüzeye tutturulmuş olan tek zincir halindeki DNA parçalarına işaretli bazlar eklenerek diğer zincirin sentezi gerçekleştirilir.
- Her yeni bazın eklenmesi ile ortaya çıkan ışık, pH veya iyon dengesinin değişimi nedeniyle kimyasal ve foto-sensörler hangi bazın eklendiği belirlenmekte ve kaydedilmektedir. Reaksiyon bittiğinde bilgisayarda kompleks biyoinformatik analizler yapılır.

NGS'de daha önceki genetik dizileme tekniklerden farklı olarak, paralel birçok dizileme reaksiyonu aynı anda yapılarak yüksek hacimli ve hızlı sonuç alınmaktadır. Yüksek hacimli bir analiz yöntemi olmasının yanı sıra barkod yöntemi ile DNA parçalarının hangi örneğe ait olduğu kolayca takip edilmekte ve bu sayede aynı reaksiyonda onlarca örnek bir arada çalışılıp örnek başına maliyet düşürülmektedir (Kamps vd 2017). NGS analizi kantitatif değildir. Niceliksel bir analiz sağlamak için, numunelerdeki tüm mikroplar qPCR / ddPCR üzerinde yürütülebilir, ancak bu pahalı ve taksonomik açıdan çok daha az kapsamlı olacaktır (Zahedi vd 2019).

#### **2.10.7.4. DNA Parmak izi yöntemi(DNA Fingerprinting)**

*Cryptosporidium* türlerinin genotiplemesi için kullanılan bir diğer yöntem olan DNA parmak izi yöntemi; DNA'da sayısı genellikle canlılar arasında değişen 2-100 nükleotid uzunluğundaki tekrar dizilerinin yer aldığı DNA bölgeleri olarak tanımlanan minisatellit bölgelerinin çeşitli yöntemlerle bant dizileri halinde görselleştirilmesidir. Araştırmacılar bu tekrar dizilerinin uzunluğunu belirlemek için mikrosatellit bölgesi için çeşitli yaklaşımlar kullanmışlardır. DNA parmak izi çalışmalarında kullanılan en eski yöntem, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizidir. RFLP analizinde, mikrosatellit bölgeleri restriksiyon enzimleri ile kesilmesinin ardından agaroz elektroforezi ile ayrıldıktan sonra bu DNA bölgeleri bir zar üzerinde immobilize edilir. Burada radyoaktif olarak etiketlenen bu DNA probu ile bu DNA bölgeleri hibridize edilir veya durumunda Oligonükleotid problemlerinin sayısı - doğrudan kurutularak hareketsiz hale getirilir. Radyo etiketli prob, tekrar birimlerinin sayısındaki varyasyon nedeniyle genomik DNA'daki bir dizi minisatellit dizilerle hibritleşir. Daha sonra fazla DNA probu

yıkılarak uzaklaştırıldıktan sonra membran X-ışınına maruz bırakılarak bu değişken parçaların görselleştirilmesi sağlanır (van Belkum 1994). RFLP analizi, genom dizisi hakkında bilgi gerektirmese de, bu tür verilerin yokluğunda RFLP çalışmaları son derece zaman alıcı ve zorlayıcı olabilir. Sekans verileri mevcut olmadığında, çalışılan genomun enzimler tarafından kesilecek kadar büyük bir bölgesini fiziksel olarak klonlamalıdır ve bu işlem çok fazla zaman ve kaynak gerektirir. Bu dezavantajlar nedeniyle, araştırmacılar, tekrar dizilerinin uzunluğunu belirlemek için mikrosatellit bölgesini çevreleyen primerlerle PCR tabanlı yaklaşımları kullanabilirler. Elde edilen PCR ürünlerinin boyutu, yüksek çözünürlüklü jel elektroforezi kullanılarak belirlenir. Bu yaklaşım, primerleri tasarlamak için genom dizisi hakkında bilgi gerektirir, ancak belirli bir mikrosatellit bölgesi için çoklu alelleri tespit etmek için kullanılabilir (Chial 2008).



Şekil 2.13 Nükleik asit bazlı tanı yöntemleri (Hassan vd 2020)

### 2.10.8. Kültür yöntemleri

*Cryptosporidium* araştırmalarındaki en büyük zorluk, sürekli enfeksiyonu ve yaşam döngüsünün tamamlanmasını destekleyen bir in vitro kültür sisteminin bulunmamasıdır (Oruç ve Akpınar 2019). Bu durum patogenez ve ilaç hedeflerinin belirlenmesinde rol oynayan mekanizmaları anlamamızı sınırlandırmıştır. Bir dizi statik iki boyutlu (2D) in vitro tek katmanlarda yetiştirilen birincil hücreleri kullanan kültür sistemlerinin enfeksiyona izin verdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu sistemlerin çoğunda, enfeksiyon 3 gün içinde zirveye ulaşır ve bunu keskin bir düşüş ve eksik replikasyon izler. Bu sistemlerin hiçbirisi 5 günden fazla bir süredir enfeksiyonu desteklememektedir. Yakın zamana kadar, *Cryptosporidium* spp.'nin genetik manipölasyonu mümkün değildi. Son zamanlarda biyomühendislik çalışmaları sonucunda enfeksiyonu daha uzun süre destekleyebilen üç boyutlu (3D) insan bağırsak doku modelleri geliştirilmiştir (DeCicco vd 2017).

#### 2.10.8.1. İçi boş elyaf teknolojisi

Bu yöntemde HCT-8 hücreleri, her bir içi boş elyaf fiberin dış yüzeyinde kültürlenmiştir. Bir pompa sistemi ile *C. parvum*'a özgül büyüme ortamı, besin ve oksijen konsantrasyonu ve redoks koşulları açısından insan bağırsak lümeninin koşullarını taklit edilmiştir. Bu sistemde günde mL başına yaklaşık 108 ookist üretimini ve 6 aydan uzun süren *C. parvum*'un sürekli kültürü bildirilmiştir. Bu yöntemin pahalı olması ve özel ekipman gereksinimi gibi dezavantajları vardır (Gunasekera vd 2020).

#### 2.10.8.2. İpek proteinli iskele modeli

Silindirik bir polidimetilsiloksan kalıbına viskoz bir ipek protein çözeltisi dökülmüş ve içi boş ve gözenekli bir lümenin yüzeyinde insan epitelyal kolorektal adenokarsinom (Caco-2) hücreleri ve mukus salgılayan goblet hücrelerinin (HT29-MTX) kültürlenmesi sonucu oluşturulan bir modeldir. *C. parvum* enfeksiyonu 15 gün boyunca destekleyen bu modelde az sayıda ookist üretilbildi (Gunasekera vd 2020).

#### 2.10.8.3. Kolon explant modeli

Şiddetli kombine immün yetmezlik hastalığı olan yetişkin farelerden alınan kolon eksplantlarının kullanıldığı bu modelde bağırsak epitel tabakasının üç boyutlu yapısı 35 gün boyunca korunabilmiştir. Ayrıca bu model 27 gün boyunca *C. parvum*

enfeksiyonunu destekleyebilmiştir. Bu modelin konak-parazit etkileşimlerinin analizine izin veren hassas bir algılama modeli olabileceği düşünülmektedir (Gunasekera vd 2020).

#### **2.10.8.4. Akciğer ve ince bağırsak organoidleri**

Organların in vivo yapısına ve işlevine benzeyen kök hücreden türetilmiş, üç boyutlu hücre kümeleri olan organoid bazlı kültür yönteminde *C. parvum*un yaşam döngüsünün hem eşeysiz hem de eşeyli aşamaları 28 güne kadar desteklenmiştir. Bu model çok sayıda ookist üretememesine rağmen kök hücreden türetilmiş organoidleri başarıyla kullanan ilk, insanlarda hem solunum hem de gastrointestinal sisteminde kriptosporidyozun patofizyolojisini incelemek için mevcut tek kültür modelidir (Gunasekera vd 2020).

#### **2.10.8.5. Kök hücre kaynaklı kültür**

Hava-sıvı arayüz koşulları altında çoğaltılan bir fare ileum kök hücre türevi kültürü kullanan çalışmada havaya maruz kalan hücrelerin apikal yüzeyi vasıtasıyla bazal yüzeyden kültür ortamının beslemesi sağlandı. Bu kültürde 20 güne kadar *C. parvum*'un tüm yaşam döngüsü boyunca büyümesini destekledi ve günde 100 ila 1000 ookist üretimi gözlemlendi (Gunasekera vd 2020).

**Tablo 2.5** *Cryptosporidium* için kullanılan kültür yöntemlerinin karşılaştırılması (Gunasekera vd 2020)

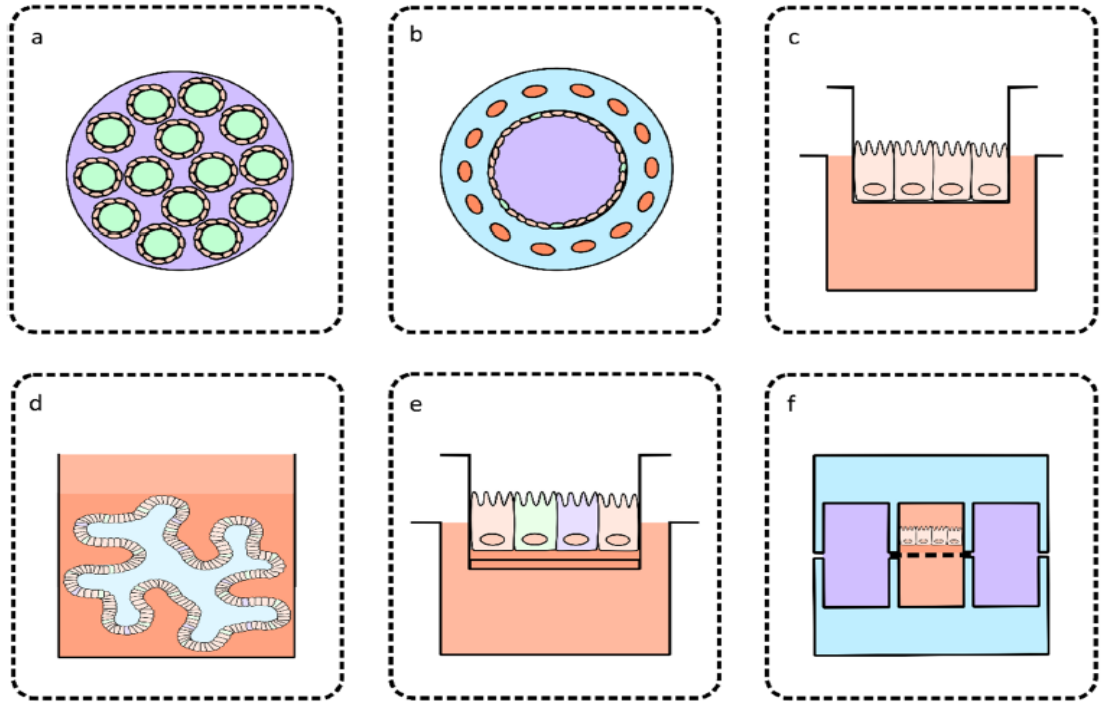
| İn vitro kültür yöntemleri            | Tam çoğalma döngüsünü destekleme | Büyümenin desteklendiği maksimum süre | Konak etkileşim | patojen | Büyük Ölçekli Ookist Üretimi |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|---------|------------------------------|
| HCT-8 hücre hatları                   | Hayır                            | 25 gün                                | Kısmen          |         | Hayır                        |
| Hücresiz kültür                       | Evet                             | 46 gün                                | Hayır           |         | Kısmen                       |
| İçi boş elyaf teknolojisi             | Evet                             | <180 gün                              | Kısmen          |         | Evet                         |
| İpek proteinli iskele modeli          | Evet                             | 15 gün                                | Kısmen          |         | Hayır                        |
| Kolon explant kültürü                 | Evet                             | 27 gün                                | Evet            |         | Hayır                        |
| Akciğer ve ince bağırsak organoidleri | Evet                             | 28 gün                                | Evet            |         | Hayır                        |
| Kök hücre kaynaklı kültürler          | Evet                             | <20 gün                               | Evet            |         | Hayır                        |

Tablo 2.5 incelendiğinde kültürleme sistemlerinin herhangi birinin sürekli *C. parvum* büyümesini destekleyebildiği maksimum süre, içi boş elyaf teknolojisi haricinde 40-45 gündür. Konak parazit etkileşimlerini ve kriptosporidiyoz patofizyolojisini incelemek için kullanılan üç boyutlu modeller için farklılaşmış enterositlerin varlığı ve görüntüleme tekniklerini kültürleme sistemine uygulama yeteneği son derece önemlidir. Tüm üç boyutlu kültürleme sistemleri enterositlerin yapısal özelliklerini yeniden üretmeyi başardı, ancak çoğu ya çok sayıda bulaşıcı ookist üretme ya da zaman içinde konak-parazit etkileşimlerini görselleştirme yeteneğinden yoksundu.

#### 2.10.8.6. Çip üzerinde organ oluşturma

Çip üzerinde organ oluşturma teknolojisi, vücuttaki belirli dokuların üç boyutlu yapısının ve işlevinin temel özelliklerini in vitro olarak minyatür bir ölçekte yeniden üretmeyi amaçlamaktadır. Bu teknolojide kullanılan mikroakışkanlar, cihaz boyunca sıvı akışının kontrolü, hücreler üzerindeki kayma stresi ve mekanik uyarıların girişi dahil olmak üzere hücresel mikro ortamın taklit edilmesini sağlar. Bu teknoloji *Cryptosporidium* biyolojisi çalışmasında çeşitli uygulamalarda kullanılmak için yeterince küçük ve ekonomik olup yeniden üretilebilir özelliktedirler (Gunasekera vd 2020).



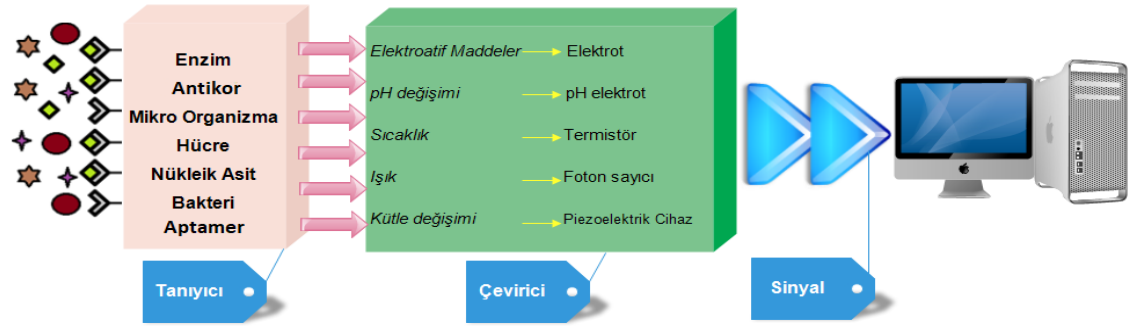


**Şekil 2.14** Üç boyutlu bağırsak modellerinin diyagramları A) İçi boş elyaf teknolojisi B) İpek proteinli iskele modeli C) Kolon explant modeli D) Akciğer ve ince bağırsak organoidleri E) Kök hücre kaynaklı kültürler F) Çip üzerine organ oluşturma modelleri (Gunasekera vd 2020).

### 2.10.9. Biyosensör kullanımı

Genel olarak biyosensör; biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyali, ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen, kimyasal veya fiziksel çeviriciler ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali içeren bir cihaz veya enstrüman olarak tanımlanabilir (Güven 2022). Biyosensörler, *Cryptosporidium*'un mikroskopik, immünolojik ve moleküler tekniklerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve parazitin doğru, hızlı, ucuz miktar tayini ve tespiti için kullanılırlar (Luka 2021).

Tipik bir biyosensör, bir tanıma elemanı (antikorlar, nükleik asitler, enzimler, aptamerler veya tam hücreler), dönüştürücü ve dedektör içerir (Şekil 2.15). Tanıma elemanı, biyosensörün özgüllüğünü ve seçiciliğini belirler, dönüştürücü ise bir biyo-tanıma olayından üretilen yanıtı ölçülebilir bir sinyale dönüştürür. Sinyal daha sonra uygun bir dedektör kullanılarak tespit edilir. Biyosensörler, güvenilirlik, doğruluk, maliyet etkinliği, seçicilik, hassasiyet ve gerçek zamanlı analiz gibi normal laboratuvar tabanlı tespit yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sunar.



**Şekil 2.15** Biyosensörleri oluşturan elemanlar

Biyosensörler, moleküler tanıma elemanının ve dönüştürücünün türüne göre farklı kategorilerde sınıflandırılabilir. *Cryptosporidium* tespiti için en çok kullanılan biyosensör çeşitleri ve özellikleri tabloda özetlenmiştir.

**Tablo 2.6** Biyosensörlerin karşılaştırması (Luka, 2021)

| Çevirici                | Çalışma Prensibi  | Tespit Limiti  | İşaret ve PCR İhtiyacı | Analiz Süresi | Yerinde Tespit |
|-------------------------|---|----------------|------------------------|---------------|----------------|
| <b>Elektriksel</b>      | Çip tabanlı antikor bazlı biyosensörlerce ookist varlığı nedeniyle oluşan kapasitans değişiminin tespiti  | 40 hücre/ 5 µl | Yok                    | > 24 saat     | Evet           |
| <b>Elektro kimyasal</b> | Çip tabanlı antikor bazlı biyosensörlerce ookistlerin varlığı nedeniyle direnç-yük transferindeki değişikliğin tespiti (Elektrokimyasal empedans spektroskopisi)  | 4 hücre / 4 µl | Yok                    | > 24 saat     | Evet           |
| <b>Kolorimetrik</b>     | Çip tabanlı oligonükleonitlerle modifiye edilmiş altın nanopartiküllerinin <i>Cryptosporidium</i> RNA'sı ile hibridizasyonu sonucu oluşan nanoparçacık kümelerinin oluşturduğu kolorimetrik yanıtın tespiti | 5 µM           | Yok                    | 30 dk.        | Evet           |

## 2.11. Tedavi

*Cryptosporidium* enfeksiyonunun etkin tedavisi için AIDS'li hastalarda günde 10 litreyi aşabilen şiddetli diyare nedeniyle oluşan sıvı ve elektrolit kayıplarının yerine konulması için oral ya da gerektiğinde intravenöz rehidrasyon uygulamalarının yapılması gerekmektedir. Kriptosporidiyoz, laktaz gibi enzimlerde bir kayba neden olur, bu nedenle rehidrasyon rejimlerinden süt ürünlerini kısıtlamak ve/veya bağırsak

hücrelerindeki bozunmalar düzeline kadar laktaz kullanmak gerekebilir (Cacciò ve Putignani 2014).

Bugüne kadar, çok sayıda antiparaziter ajanın özellikle bağıışıklığı baskılanmış konaklarda hiçbir etkisi olmadığından, enfeksiyonun doğrudan tedavisi için sınırlı seçenekler vardır. Bu nedenle, kriptosporidiyoz tedavisinin temel taşı, konak bağıışıklık fonksiyonunun restorasyonudur. Örneğin kriptosporidiyozlu AIDS hastalarında, antiretroviral tedavinin diyareyi önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, HIV proteazlarını inhibe ederek işlev gören antiretroviral ilaçlar, hem in vivo hem de in vitro olarak *Cryptosporidium* türlerine karşı spesifik aktivite göstermiştir (Cacciò ve Putignani 2014).

Yakın zamana kadar *Cryptosporidium*'un uzun süreli üretimine izin veren ve yaygın olarak kullanılan in vitro kültür sisteminin olmaması nedeniyle *Cryptosporidium* biyolojisinin ve parazitin konak ile etkileşim mekanizmaları hakkında bilgi sınırlı olmuş ve aynı zamanda bu parazitin genetik manipülasyonu için standart protokollerin ve araçların oluşturulması geciktirmiştir. Bu durum da etkili bir kriptosporidiyoz tedavisi için ilaç geliştirme sürecine engeller çıkarmıştır. Hedefe yönelik ilaç geliştirme yaklaşımlarının eksikliği ve hedef patojenin insidansının yoksul ülkelerde yüksek olduğu göz önüne alınarak yeni bir ilaç geliştirmenin yüksek maliyeti nedeniyle araştırmalar mevcut ilaçların ve ilaç benzeri bileşiklerin kullanımına yönelik yapılmıştır (Cacciò ve Putignani 2014).

### 2.11.1. Antiparazitik ajanlar

Nitazoksanit, paromomisin, spiramisin, sığır hiperimmün kolostrum ve sığır diyalize edilebilir lökosit özü dahil olmak üzere HIV ile enfekte yetişkinler üzerinde yapılan klinik çalışmalarda çok sayıda ajan araştırılmıştır. Spesifik olarak *Cryptosporidium*'a yönelik hiçbir farmakolojik veya immünolojik tedavinin, kombine antiretroviral tedavi olmadan kullanıldığında tutarlı bir şekilde etkili olduğu gösterilmemiştir (Cacciò ve Putignani 2014).

#### 2.11.1.1. Nitazoksanit

Bağıışıklığı yeterli çocuklar ve yetişkinlerde *C. parvum* nedenli enfeksiyonun tedavisi için Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış tek ilaç olan Nitazoksanitin bağıışıklığı yeterli bireylerde hastalığın şiddetini ve süresini azaltmada etkinliği gösterilmiştir. AIDS hastalarında günde iki kez 500 ila 1.000 mg olarak uygulanarak yapılan çalışmalarda CD4+ sayısı > 50 hücre/mm<sup>3</sup> olan hastaların %70'i yanıt verirken,

CD4+ hücre sayısı düşük olan hastaların %20'sinin yanıt verdiği dolayısıyla ilacın etkinliğinin hastanın bağışıklık durumuna bağlı olduğu anlaşılmıştır. AIDS hastalarında ilacın etkinliğinin değişiklik göstermesi nedeniyle ideal tedavinin antiretroviral tedavi ile nitazoksanitin kombine edilerek yapılması önerilmektedir (Cacciò ve Putignani 2014).

### 2.11.1.2. Paromomisin

Giardiasis ve intestinal amebiasis tedavisinde kullanılan bir aminoglikozit olan paromomisin ile ilgili 11 insan çalışmasına yönelik yapılan meta analizde yetişkinlerde 2 ila 4 bölünmüş dozda 25 ila 35 mg/kg/gün olarak uygulanan ilaç dozu sonucunda ilaca %67 oranında bir yanıt tespit edilmiş ancak uzun süreli başarı oranının %33 olduğu ve hastalıkta nöksler mevcut olduğu anlaşılmıştır. AIDS hastalarında nitazoksanit yerine paromomisin kullanılabilir, ancak antiretroviral tedavi ile kombine edilmesi gerekir (Cacciò ve Putignani 2014).

### 2.11.1.3. Makrolitler

Spiramisin, azitromisin, roksitromisin ve klaritromisin dahil olmak üzere makrolidler, kriptosporidiyoz için bir miktar aktivite göstermişse de yapılan çalışmalar bu etkinliğin tutarlı olmadığını göstermiştir. Ancak yine de AIDS hastalarında, antiretroviral tedavi ile kombine edilmesi şartıyla nitazoksanit yerine makrolidler kullanılabilirliği belirtilmiştir (Cacciò ve Putignani 2014).

## 2.12. Korunma ve kontrol

*Cryptosporidium* oookistlerinin fekal-oral bulaşmasının önlenmesi için, kişisel hijyene dikkat edilmesi gerekmektedir (Leav vd 2003). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından kriptosporidiyozun kontrolü için çeşitli hijyen yöntemleri önerilmektedir. Yemek yemeden önce ve sonra, tuvalet kullanımından sonra, hasta insanlarla ve hayvanlarla temastan sonra, tarım faaliyetlerinden sonra ellerin sabunla yıkanması tavsiye edilmektedir. Ayrıca ishal olan çocukların okul ve kreşlere gönderilmemesi; ishal olan kişilerin yüzme havuzlarından uzak durması, göller, nehirler, kaynaklar, göletler, akarsular veya sığ kuyulardan arıtılmamış su içilmemesi; içme suyunun güvenliğinden şüphe duyuluyorsa şişelenmiş su kullanılması; enfeksiyon riskini azaltabilmek için belediye veya kuyu suyu kaynaklarından elde edilen suların mikron altı por genişliğine sahip su filtreleri kullanılarak filtrelenmesi veya 3 dakika

kaynatılması; içme suyunun güvenliğinden şüphe duyuluyorsa çiğ yenecek meyve ve sebzeleri yıkamak için şişelenmiş, kaynatılmış veya filtrelenmiş su kullanılması; seyahat edilen ülkelerde yetersiz arıtılmış suyun kullanılmaması veya içilmemesi, suyun güvenli olmadığı ülkelerde buz kullanılmaması; yemek arzının güvenli olmadığı ülkelerde pişmemiş yiyeceklerin yemekten kaçınılması; dışkı ile doğrudan veya dolaylı temasa yol açabilecek korunmasız cinsel uygulamalardan kaçınılması önerilmektedir (Cacciò ve Putignani 2014, Painter vd 2015)

Günümüze kadar kriptosporidiyoza karşı kullanılan mevcut bir aşı yoktur. Diğer taraftan sığırlarda maternal ve fatal dolaşımın ayrı olduğu sindesmokorial plasenta bulunur ve bu nedenle fetüs, anneden transplasental bulaşma yoluyla immünoglobulin almaz. İmmünoglobulinlerin buzağılara pasif transferi, ilk sağılan kolostrumun beslenmesi ile sağlanır. Buna göre, kolostrumdaki yüksek düzeyde antikörlerin, hiperimmün kolostrum ile beslenen buzağıları koruyabildiği gösterilmiştir (Tomazic vd 2018).

Kriptosporidiyoz enfeksiyonu taşıyan insan ve hayvanlar sürekli ve çok sayıda ookisti çevreye bırakmaktadırlar. Bu ookistler çok dirençli olup nemli çevrelerde bir yıl kadar canlı kalmakta, bilinen dezenfektanlarla (klor, amonyak, formaldehit vb.) yok edilememektedir. Suların bu çok küçük boyutlu ookistlerden arıtılması zor olmaktadır. Koagülasyon, sedimentasyon ve filtrasyon ile fiziksel olarak ookistlerin uzaklaştırılması, su kökenli kriptosporidiyoza karşı ilk bariyerdir. Geleneksel işleme tekniklerinin (koagülasyon, sedimentasyon ve filtrasyon) gerektiği şekilde uygulanması ile, ookistler %99 veya daha fazla oranlarda uzaklaştırılabilmektedir. Ookistlerin filtrasyon bariyerinden geçebildiği kritik zamanlarda, takiben geri yıkama işlemi uygulanmalıdır. Klorlu dezenfektanlara dirençli olan ookistler, koagülasyon/filtrasyon prosesi uygulanan sularda bile görülmektedir. Bu nedenle *C. parvum*'un kontrolü için, filtrasyon ve dezenfeksiyon işlemlerinin birlikte uygulanması gerekmektedir. Diğer taraftan *Cryptosporidium* ookistlerini elimine etmek için, yalnızca klorlama işleminin uygulanması yeterli olmamakla birlikte yapılan çalışmalarda 80 mg/l düzeyindeki serbest klorin veya monokloramin'e 90 dk, 1.3 mg/l klordioksit'e 60 dk süreyle maruz bırakılan ookistlerin, yaklaşık %90'ının inaktive edildiğini bildirilmiştir. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada 8 pH'da, 21°C'da 1000 mg/l klordioksit'e 1 dk süreyle maruz bırakılan ookistlerin sırasıyla %99'luk inaktivasyona uğrattığını belirlemişlerdir (Çetinkaya 2004).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, hücre duvar yapısını bozarak mikroorganizmaları etkisiz hale getiren ozonun ookistlere karşı en etkili dezenfektan olduğu ortaya konmuştur (Proje MNE 2020). 1 mg/l ozonun 25°C'deki suda 1 dakika içinde ookistlerin %90-99'unun inaktivasyonuna yol açtığını bildirilmiştir. Ozon ile ön işlem gören suların

daha sonra monokloraminle muamalesi sonucu inaktivasyon oranının 20°C'de 5 kat ve 1°C'de 22 kat daha hızlı olduğunu rapor edilmiştir (Çetinkaya 2004). Ayrıca Her 10 °C'lık sıcaklık artışı ozonla dezenfeksiyon verimini 2-3 misli artırdığı gösterilmiştir (Proje MNE 2020).

Suların UV ile işlenmesi yöntemi, Ozonla ya da diğer dezenfeksiyon işlemleriyle ilgili olarak duyulan sağlık kaygıları nedeniyle *C. parvum* ookistlerini içeren su kaynaklarının dezenfeksiyonu için ön plana çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda 120 ml/cm<sup>2</sup> dozunda UV uygulaması ile suda bulunan ookistlerin %100 inaktivasyona uğradığını rapor edilmiştir (Çetinkaya 2004).

Ookistlerin canlılığı üzerinde ısının etkisini belirlemek üzere de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Suların ve sütün pastörizasyonunun (71.7°C'de yalnızca 5 sn) ookistlerin enfeksiyon oluşturma kabiliyetini kaybetmeleri için yeterli olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada elma suyuna 71.7°C'de 10 sn veya 20 sn süreyle uygulanan pastörizasyon işleminin ookistlerin sayısında %99.9 azalmaya neden olduğunu bildirilmiştir (Çetinkaya 2004). Yemek yapmak, yiyeceklerde *Cryptosporidium*'u öldürür. Ookistler pastörizasyonun yanısıra 60 °C'de 30 dakika ısıtılarak veya -7 °C'de 1 saat dondurularak öldürülebilir (Xiao ve Feng 2020).

Alternatif dezenfeksiyon yöntemlerinden biri de gama ışınlamadır ve gama radyasyonun *Cryptosporidium* ookistlerini inaktif hale getirdiği birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Gama ışınlama suda ve su ortamında bulunan maddelerde kimyasal ve biyolojik değişim oluşturmakta, uygun dozda kullanılan iyonlaştırıcı radyasyonun başka bir yönteme gerek kalmadan mikroorganizmaları yok ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda 15 kGy gama ışınlama dozunun sularda *Cryptosporidium* spp. ookistlerini inaktif ettiği belirlenmiştir (Emre vd 2017).

Ookistlerin inaktivasyonu için kullanılan antibakteriyel aktivite sergilediği bilinen bazı nanopartiküllerin protozoonlar üzerine etkisi üzerine yapılan çalışmalarda gümüş nanopartiküllerinin ve gümüş iyonlarının su kaynaklı *Cryptosporidium* için toksik olduğu belirlenmiştir (Cameron vd 2016).

### 2.13. Hipotez

Su kontaminasyonuna bağlı olarak gelişen toplumsal salgınlar hem bir halk sağlığı sorunlarına (Ryan vd 2018) hem de büyük ekonomik kayıplara (Chyzheuskaya vd 2017) sebep olabilmektedir. Protozoon parazitlerin neden olduğu bildirilen tüm su kaynaklı salgınların en önemli etkeni *Cryptosporidium*dur (Ryan vd 2018). Tez çalışmasının yapıldığı Mardin ili tarım, hayvancılık ve bu sektörlere bağlı sanayinin gelişmiş olduğu bir şehirdir. Şehirde kullanılan suyun %69'u kaynak sularından

karşılırken %31'i kuyu sularından karşılanmaktadır. Mardin ili toplam nüfusunun yaklaşık %35'i kanalizasyon, %46'sı atık su arıtma hizmeti alamamaktadır (Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği İl Müdürlüğü, 2021). Söz konusu bilgiler ışığında ve Mardin ilinin sosyoekonomik yapısı göz önüne alındığında çalışmanın hipotezi Mardin ilindeki çevre sularında *Cryptosporidium* kontaminasyonunun olabileceği yönündedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Numunelerin Toplanması

Tez çalışması için 2022 yılı Nisan ve Mayıs aylarında Mardin ilinin 8 ilçesinde yer alan kuyu, çeşme, dere, gölet, havuz gibi çeşitli su kaynaklarından temiz 5 litrelik bidonlar kullanılarak toplam 56 adet su örneği toplanmıştır. Bu su örneklerinin 16 tanesi Artuklu, 8 tanesi Kızıltepe, 5 tanesi Mazıdağı, 3 tanesi Derik, 8 tanesi Savur, 4 tanesi Ömerli, 3 tanesi Yeşilli, 9 tanesi Nusaybin ilçesinden toplanmıştır (Şekil 3.2). Su numunelerin toplandığı yerlerin harita üzerindeki konumları ve numune alınan yerlerin bazılarının resimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.3-7).

#### 3.2. Numunelerin Filtrasyonu

Toplanan örnekler Mardin İl Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuvarına getirilmiştir. Burada getirilen örnekler, üzerine gözenek büyüklüğü 0,45 µm olan selüloz asetat membran filtresinin (Isolab Membran Filtre) yerleştirildiği üçlü vakum pompalı filtrasyon cihazında filtre edilmiştir (Şekil 3.1). Üzerinde süzülen partiküllerin yer aldığı membran filtreler 20 ml'lik örneğin bulunduğu falkon tüplerin içine alınmıştır. Daha sonra falkon tüplerin içinde yer alan örnekler Artuklu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir. Burada örnekler vortekslenmiş ardından santrifüj cihazında 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerin dip çöktisinden pipetle alınarak 3 ml lik 3 adet ependorf tüpe alınmıştır. Ependorf tüplere alınan her biri sırasıyla % 95'lik etil alkol, saf metanol ve 10 mM %2,5'lik Potasyum dikromat ile tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler ileride incelemelerde kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Diğer taraftan içinde membran filtre bulunan 20 ml'lik falkon tüplerdeki su örnekleri de +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. (Hagos vd 2022).





**Şekil 3.1** Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Laboratuvarı ve üçlü vakum pompalı filtrasyon cihazı



**Şekil 3.2** Mardin ilinde numune toplanılan yerlerin harita üzerindeki konumları \* *Cryptosporidium* spp oocistleri görülen yerler (kırmızı).



**Şekil 3.3** Kızıltepe 2 (Zergan Deresi) istasyonu



**Şekil 3.4** Artuklu 1 istasyonu (Yayla köyü)





**Şekil 3.5** Savur 7 istasyonu (Pınardere köyü)



**Şekil 3.6** Derik 2 istasyonu



**Şekil 3.7** Nusaybin 5 istasyonu (Çağ Çağ deresi)

### 3.3. Yöntem

#### 3.3.1. Boyama Yöntemleri

##### **Kinyoun asit-fast boyama yöntemi:**

##### **Kullanılan Malzemeler**

- %100'lük Metanol
- Karbol Fuksin
- %1'lük Asit-Alkol
- Löffler Metilen Mavisi

##### **Karbol fuksin hazırlanması;**

- a) 4 gram bazik fuksin ile 20 ml %95 alkol karıştırılarak bir solüsyon hazırlanmıştır.
- b) 8 gram kristalize fenol ile 100 ml distile su karıştırılarak ikinci bir solüsyon hazırlanmıştır.
- c) Hazırlanan iki solüsyon karıştırılarak 1 gün bekletilmiştir.

**% 1'lik asit alkolün hazırlanışı;**

1 ml sülfirik asit ile 99 ml etil alkol karıştırılarak hazırlanmıştır.

**Löffler metilen mavisi hazırlanışı;**

- a) 0,3 gram metilen mavisi 30 ml %95'lik etil alkol içinde çözülmüştür.
- b) Bu çözeltinin içine 100 ml distile su konulmuştur.
- c) Hazırlanan solüsyon süzülerek koyu renkli bir şişede saklanmıştır.

**Boyama yöntemi**

Örneklerin dip çökeltisinden hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra %100'lük (absolut) metanolde 1 dakika bekletilerek tespit edilmiştir. Metanolden çıkarılan preparatlar içinde karbol fuksin bulunan şalenin içerisinde konularak 5 dakika boyanmıştır. Daha sonra preparatların fazla boyadan arındırılması amacıyla 1 dakika musluk suyu bulunan behere batırıp çıkarılarak yıkanmıştır. Ardından %1'lik asit-alkol ile renksizleştirme (dekolorizasyon) işlemi yapılmıştır. Preparatlar 1 dakika musluk suyunda yıkanmalarının ardından Löffler Metilen mavisi solüsyonunun içinde 1 dakika süreyle boyanmaları sağlanmıştır. Fazla boyanın giderilmesi amacıyla preparatlar 1 dakika musluk suyunda bekletilmiştir. Boyama işlemi biten preparatlar havada kurutulmuştur.

**Değerlendirme**

Preparatlar 100'lük büyütmede immersiyon yağı ile mikroskopla incelenmiştir. Mavi zemin üzerinde kırmızı-pembe renkteki yuvarlak ya da oval 4-6 µm boyutundaki yapılar *Cryptosporidium* spp. ookisti olarak kabul edilmiştir.

**Heine negatif boyama yöntemi:****Kullanılan Malzemeler**

Karbol fuksin  
Malaşit Yeşili  
Safranin

**Karbol fuksin hazırlanması;**

- a) 4 gram bazik fuksin ile 20 ml %95 alkol karıştırılarak bir solüsyon hazırlanmıştır.
- b) 8 gram kristalize fenol ile 100 ml distile su karıştırılarak ikinci bir solüsyon hazırlanmıştır.
- c) Hazırlanan iki solüsyon karıştırılarak 1 gün bekletilmiştir.

**Malaşit yeşili hazırlanması;**

5 gram malaşit yeşili 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**Safranin hazırlanması;**

- a) 0,5 gram safranin 10 ml %95'lik etil alkol içinde çözülmüştür.
- b) Bu çözeltinin içine 100 ml distile su konulmuştur.
- c) Hazırlanan solüsyon süzülerek koyu renkli bir şişede saklanmıştır.

**Boyama yöntemi**

Tez çalışmasında negatif boyama tekniğinde zemin boyası olarak karbol fuksin, malaşit yeşili ve safranin kullanılmıştır. Lam üzerine bir damla su numunesinden santrifüj ile elde edilen peletten (örnek) konularak %100'lük metanolde tespit edilmiştir. Kuruyan preparatlar 1 dakilka zemin boyası ile muamele edildikten sonra yıkanmıştır. Preparatlar havada kurutulmuştur.

**Değerlendirme**

Preparatlar 100'lük büyütmede immersiyon yağı ile mikroskopla incelenmiştir. Preparat üzerinde, mikroskop sahasında; renksiz yuvarlak ya da oval 4-6 µm boyutundaki yapılar *Cryptosporidium* spp. ookisti olarak kabul edilmiştir.

**Safranin Metilen Mavisi boyama****Kullanılan Malzemeler;**

% 100 Metanol

Safranin

Metilen mavisi

Safranin ve metilen mavisinin hazırlanışı önceki boyama yöntemlerinde açıklanmıştır.

**Boyama yöntemi**

Su numunelerinden (örneklerden) hazırlanan dip çöküntülerinden (pelet) kalın bir damla lamlara konulduktan sonra havada kurutulmuştur. Preparatlar %100 metanol ile 3 dakika muamele edildikten sonra su ile yıkanmıştır. Preparatların üzerine safranin boyası dökülerek kaynama noktasına kadar ısıtılarak 1 dakika boyanmıştır. Daha sonra ile yıkanan preparatlar metilen mavisinde 30 saniye bekletilmiştir. Boyanın giderilmesi amacıyla son defa yıkanan preparatlar kurumaya bırakılmıştır.

### Değerlendirme

Preparatlar 100'lük büyütmede immersiyon yağı ile mikroskopla incelenmiştir. Mavi zemin boyasının turuncu yuvarlak ya da oval 4-6 µm boyutundaki yapılar *Cryptosporidium* spp. ookisti olarak kabul edilmiştir.

Diğer taraftan söz konusu boyama işlemlerinden sonra numunelerin farklı sıcaklıklardaki boyanma özelliklerinin incelenmesi amacıyla numuneler 45°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Numuneler soğuduktan sonra uygulanan boyama yöntemleri için aynı prosedür ile tekrarlanmıştır. Söz konusu işlem numunelerin 70 ve 100°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilmesinden sonra tekrarlanmıştır (Fayer 1994, Anderson 1985).

### 3.3.2 İmmünolojik Yöntem

İncelenen tüm örnekler PCR, IFA, ELISA gibi yöntemlerle çalışılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ancak yürütülen tez çalışmasında bütçe kısıtlılığı, fiyatlardaki aşırı artış, pandemi koşulları nedeniyle yaşanan arz sıkıntısı gibi nedenlerle boyama yöntemlerinin sonuçlarını karşılaştırmak için *Cryptosporidium* Hızlı Kaset Test kiti (Microcult *Cryptosporidium* Test Cassette) kullanılmıştır (Şekil 4.4-a).

### Çalışma Prensipleri

*Cryptosporidium* Antijen Hızlı Kaset Testi, *Cryptosporidium* antijenlerinin tespiti için kullanılan bir yanal akış testidir. Test sırasında eğer numune içerisinde *Cryptosporidium* antijenleri mevcutsa, kit içerisinde yer alan anti-*Cryptosporidium* antikor ile kaplı membran, üzerindeki antikorlar ile konjuge parçacıklara bağlanır. Karışım kılcallık etkisiyle membran üzerinde yukarı doğru hareket eder. Numunelerden pozitif bir sonuç alınması durumunda membranda bulunan özgül antikorlar konjugat antijen kompleksi ile etkileşime girecek ve test hattı bölgesinde renkli bir çizgi oluşacaktır.

### Test prosedürü

1. Toplanan su örneklerinden hızlı kaset test kitinde yer alan damlalık ile 2 damla (yaklaşık 80 µL) ekstraksiyon tamponu içeren numune toplama tüpüne alınarak ağzı sıkıca kapatılmıştır.

2. Numune ile ekstraksiyon tamponunun iyice karışmasını sağlamak için örnek toplama tüpü kuvvetlice sallandıktan sonra reaksiyonun tamamlanması için 2 dakika bekletilmiştir.



3. Paketinden çıkarılan kaset test düz bir zemine konulmasının ardından numune kuyusuna numune-ekstraksiyon tamponu karışımından 3 damla (yaklaşık 120 µL) damlatıldı.

4. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmiştir.

**Değerlendirme:** Kaset test üzerindeki C ve T bölgelerinde renkli çizgi olması durumunda numune pozitif kabul edilmiştir. Sadece C bölgesinde renkli çizgi olması halinde numune negatif kabul edilmiştir. C ve T bölgelerinde renkli çizgi oluşmaması durumunda test hatalı olduğu kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Mardin ilinde toplanan su numuneleri hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı bölgelerden alınmıştır. Mardin ilinde gerek kullanma suyu gerekse de tarımsal kullanım için kuyu suyunun sıklıkla kullanıldığı ve derinliklerinin 350-400 metre olduğu görülmüştür. Toplanan 56 su numunesinin 13'ü (%23,22) kuyu suyu, 14'ü (%25) çeşme suyu, 25'i (%44,64) dere suyu ve 2'si (%3,57) gölet suyu, 2'si (%3,57) ise havuz suyundan oluşmaktadır.(Tablo 4.1)

**Tablo 4.1** Numune toplanılan yerler ve *Cryptosporidium* ookisti tespit edilen yerleri gösterir tablo

| Pozitif Su Numunesi Sayısı/Su Numunesi Alınan Su Kaynağı |      |      |       |       |       |        |  |
|--|------|------|-------|-------|-------|--------|--|
| Su numunelerinin alındığı istasyonlar                    | Kuyu | Dere | Çeşme | Havuz | Gölet | Toplam |  |
| Kızıltepe  | 0/1  | 1/4  | 0/2   | 0/1   | -     | 1/8    |  |
| Artuklu  | 0/8  | 1/4  | 0/4   | -     | -     | 1/16   |  |
| Mazıdağı   | -    | 0/2  | 0/1   | 0/1   | 0/1   | 0/5    |  |
| Derik  | -    | -    | 0/3   | -     | -     | 0/3    |  |
| Savur  | 0/1  | 0/6  | 0/1   | -     | -     | 0/8    |  |
| Ömerli   | 0/1  | 0/1  | 0/2   | -     | -     | 0/4    |  |
| Yeşilli  | -    | 1/2  | 0/1   | -     | -     | 1/3    |  |
| Nusaybin   | 0/2  | 2/6  | -     | -     | 0/1   | 2/9    |  |
| Toplam   | 0/13 | 5/25 | 0/14  | 0/2   | 0/2   | 5/56   |  |

Toplanan su numunelerinde *Cryptosporidium* varlığının saptanması için öncelikle herhangi bir saklama solüsyonu eklenmeden saklanan numuneler kinyoun asit-fast boyama yöntemi, zemin boyası olarak karbol fuksin, malaşit yeşili ve safraninin kullanıldığı negatif boyama yöntemi ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemi kullanılmıştır. Kinyoun asit-fast boyama ile 5 su numunesinde (%8,92), negatif boyamanın üç modifikasyonu ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemleri ile 2 su numunesinde (% 3,57 ) *Cryptosporidium* ookistine rastlanmıştır. Ardından farklı saklama solüsyonları içindeki numunelerden prosedürlere uygun boyama yapılmıştır.

Çalışılan boyama yöntemleriyle boyanmış preparatlara yapılan mikroskopik incelemede; diğer saklama yöntemlerinde ookist tespiti yönünden bir fark görünmezken potasyum dikromat içinde saklanan numunede kinyoun asit-fast boyamada 5 örnekte, negatif boyama yönteminden malaşit yeşili boyama ile 3 numunede, diğer 2 negatif boyama yönteminde 2 numunede ve safranin metilen mavisi boyamada 2 numunede *Cryptosporidium* ookisti görülmüştür.

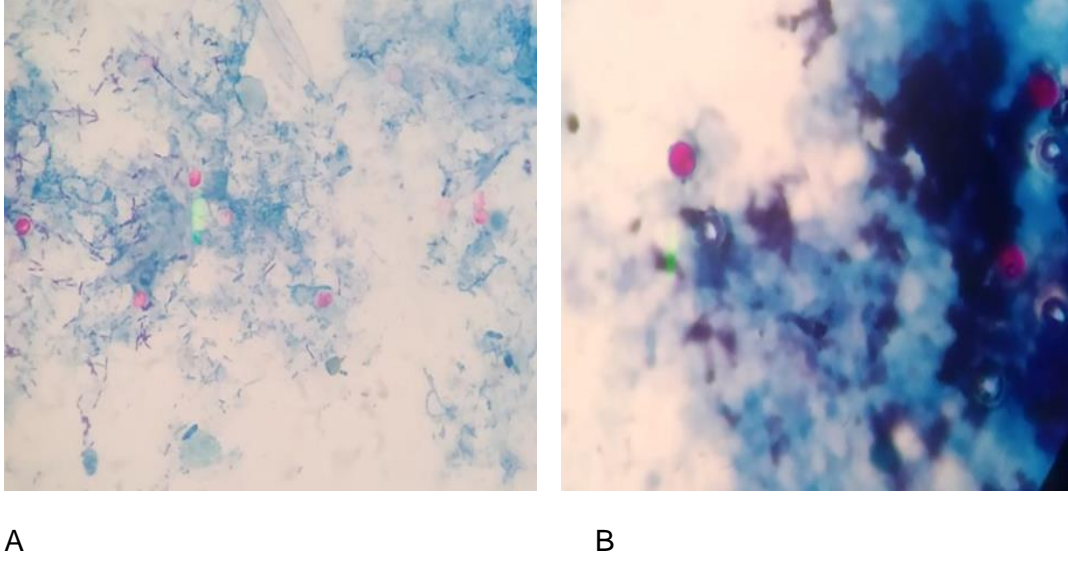
**Tablo 4.2** Su numunelerinin incelenmesinde kullanılan yöntemler ve *Cryptosporidium* ookisti tespitini gösterir tablo

|                                       | Saf numune | %95'lik Etil Alkol içindeki numune | Saf metanol içindeki numune | Potasyum Dikromat içindeki numune |
|---------------------------------------|------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Kinyoun Asit - Fast Boyama</b>     | 5          | 5                                  | 5                           | 5                                 |
| <b>Malaşit yeşili Negatif Boyama</b>  | 2          | 2                                  | 2                           | 3                                 |
| <b>Karbol Fuksin Negatif Boyama</b>   | 2          | 2                                  | 2                           | 2                                 |
| <b>Safranin Negatif Boyama</b>        | 2          | 2                                  | 2                           | 2                                 |
| <b>Safranin Metilen Mavisi Boyama</b> | 2          | 2                                  | 2                           | 2                                 |
| <b>Hızlı Kaset Test</b>               | 2          | 2                                  | 2                           | 2                                 |

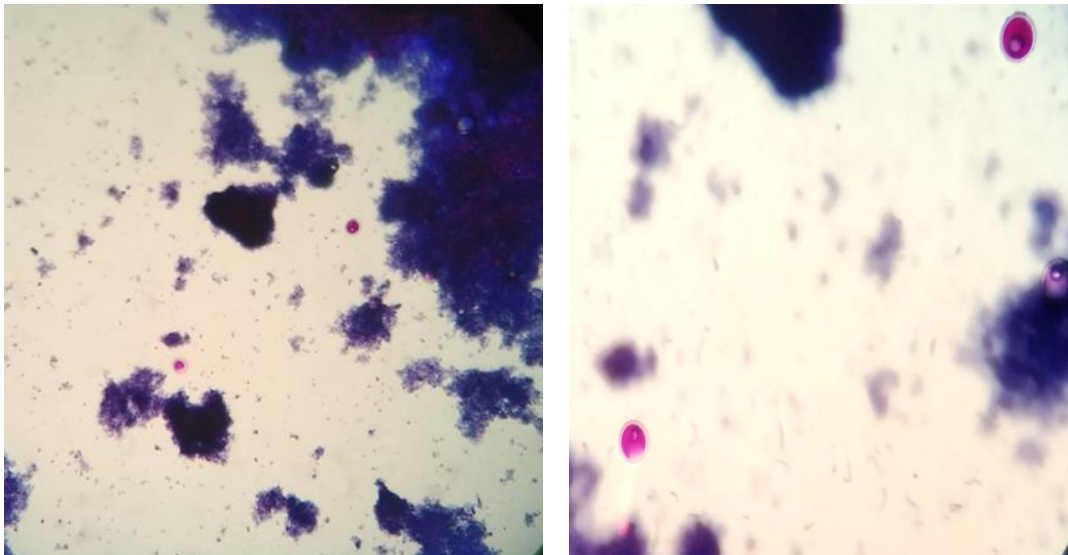
Ookistlerin farklı sıcaklıklara maruz kaldıktan sonra boyanma özelliklerindeki değişimi incelemek için yöntem, Anderson'a (1985) göre modifiye edilerek herhangi bir saklama solüsyonu eklenmemiş numuneler 30 dakika yüksek ısıya (45, 70 ve 100°C) maruz bırakılmıştır. Numuneler oda ısısına getirilerek boyama yöntemlerinde olduğu gibi prosedüre uygun boyama yapılarak 40'luk ve 100'lük büyütmede incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3 içinde özetlenmiştir. Isıya maruz kalan numunelerin zemin son boya rengini almaya başladıkları tespit edilmiştir (Fayer 1994, Anderson 1985).

**Tablo 4.3** Numunelerin yüksek ısıda tutulması ile ookistlerin boyanma özelliklerindeki farklılığın karşılaştırılması

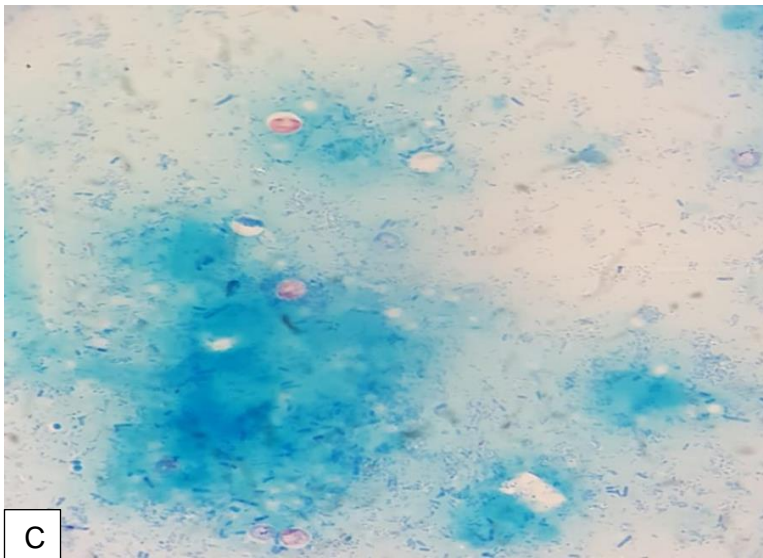
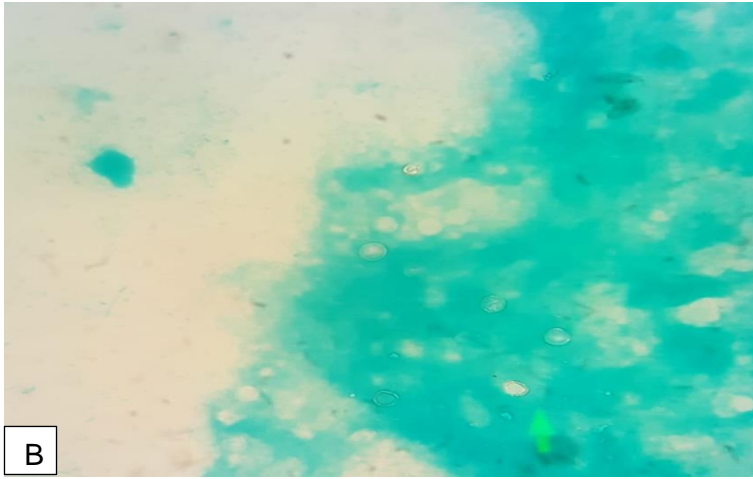
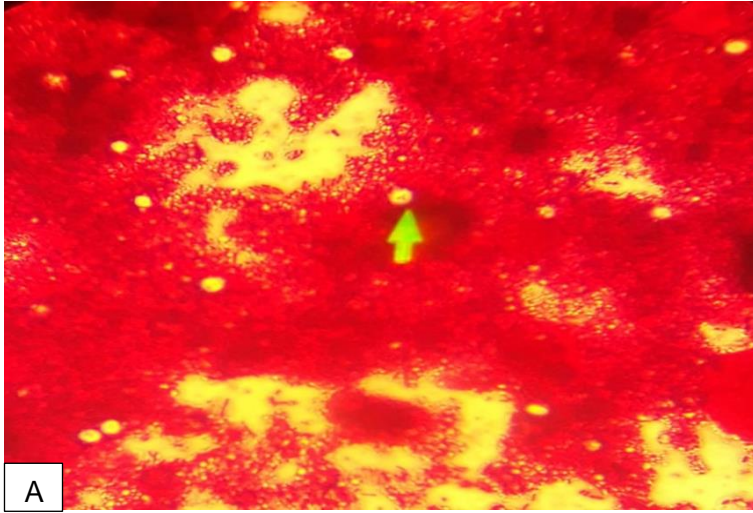
| <b>Yöntem</b>                                | <b>45 °C de 30 dakika<br/>inkübasyon</b> | <b>70 °C / 100 °C<br/>30 dakika inkübasyon</b>   |
|--|--|--|
| <b>Kinyon Aside Fast<br/>Boyama</b>          | Mavi zeminde pembe<br>boyalı ookistler   | İçi mavi boyalı yuvarlak<br>kist yapıları (çoğu kistler),<br>az sayıda hafif pembe<br>boyalı kistler |
| <b>Malaşit Yeşili ile negatif<br/>boyama</b> | Yeşil boyalı ookistler                   | Yeşil – mavi boyalı kist<br>yapıları   |
| <b>Karbolfuksin ile negatif<br/>boyama</b>   | Kahverengi boyalı ookistler              | Koyu kırmızı-kahverengi<br>boyalı yapılar  |
| <b>Safranin ile negatif<br/>boyama</b>       | Kırmızı-Turuncu ookistler                | Turuncu boyalı yapılar   |
| <b>Safranin – Metilen mavisi<br/>boyama</b>  | Mavi zeminde turuncu<br>boyalı ookistler | Koyu mavi boyalı yapılar   |



**Şekil 4.1** Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile boyanan Nusaybin 1 istasyonundan alınan su numunesinin (A) x40'lık büyütmede mikroskop görüntüsü (B) X100'lük büyütmede mikroskop görüntüsü



**Şekil 4.2** Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile boyanan Yeşilli 1 istasyonundan alınan su numunesinin x40'lık büyütmede mikroskop görüntüsü (B) X100'lük büyütmede mikroskop görüntüsü

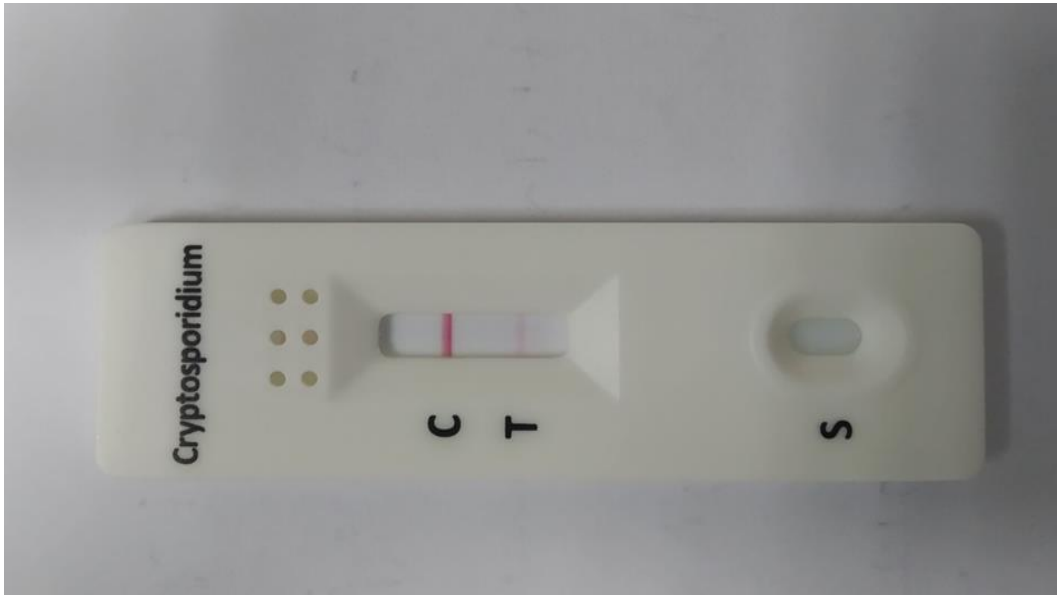


**Şekil 4.3** Nusaybin 1 istasyonundan alınan numunenin A) Safranin negatif boyama B) Malaşit yeşili negatif boyama C) Safranin metilen mavisi boyama yöntemleri ile hazırlanan preparatları

Daha sonra numuneler *Cryptosporidium* antijeninin tespiti için Hızlı Kaset Test kiti (Microcult *Cryptosporidium* Test Casette) kullanılmıştır. Kullandığımız dört farklı tespit yönteminde de rapid test ile 56 su numunesinin 2 tanesinde (%3,57) pozitif sonuç alınmıştır (Tablo 4.1). Tez çalışmasında uygulanan tespit yöntemlerinde *Cryptosporidium* oookisti bulunan tüm numuneler dere suyu numunesidir.



A



B

**Şekil 4.4** A) Hızlı kaset test kiti B) Nusaybin 1 istasyonundan alınan numunenin pozitif test sonucu

## 5. TARTIŞMA

İnsan hayatı için vazgeçilmez bir doğal kaynak olan güvenli içme suyuna erişim toplum sağlığı için elzemdir. Diğer taraftan evrensel bir çözücü olan su, başlıca enfeksiyon kaynağıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre hastalıkların %80'i su yoluyla bulaşmaktadır. Çeşitli ülkelerdeki içme suyu WHO standartlarını karşılamamaktadır. Hijyenik olmayan ve kalitesiz su kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle meydana gelen ölüm oranını %3,1 olduğu bildirilmiştir. Kolera, tifo gibi bulaşıcı hastalıklar ve gastroenterit, ishal, kusma, deri ve böbrek sorunları gibi diğer hastalıklar kirli su yoluyla yayılmaktadır (Haseena vd 2017).

Dünya çapında en sık rastlanılan su kaynaklı protozoon nedenli enfeksiyon kaynağı olan *Cryptosporidium*, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ve küçük çocuklarda ağır ishal tablolarına neden olabilmekte veya toplumda salgınlara yol açabilmektedir. Dünyada yaşanan güvenli içme suyuna erişim problemi ve iklim değişikliği ile bunun daha da karmaşık hal alabileceği hususları göz önüne alındığında *Cryptosporidium*'un önemi daha da artmaktadır. Bu nedenle dünyada ve Türkiyede su kaynaklı enfeksiyon etkenleri özellikle de *Cryptosporidium* üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır.

Türkiyede yapılan çalışmalar incelendiğinde; Çeber ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; Mersin ilinin çeşitli semtlerinden toplanan toplam 44 adet içme suyu örneğinin soğuk modifiye Kinyoun aside dirençli boyama ve Auramin O boyama yöntemiyle boyanarak incelenmesi sonucu 5 (%11,36), 2 adet kullanma suyu örneğinden 1, 35 deniz suyu örneğinden 1 (%2,85), 19 atık su örneğinden 4 adet (%21) *Cryptosporidium* pozitif örnek saptanmıştır (Çeber vd 2005).

Çiçek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; Van ilindeki 440 adet kaynaktan toplanan su örneğinden hazırlanan preparatlar modifiye asit-fast yöntemiyle boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucu su örneklerinin %1,13'ünde *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptanmıştır. İçme suyu olarak kullanılan 191 çevresel suyun %1,57'sinde, şehir merkezi ve ilçelerden temin edilen 241 şebeke içme suyunun %0,82'sinde ookistler görülmüştür. Su örneklerinin 193'ü kırsal alanlardan elde edilen içme suları olup bunların %1,55'inde, şehir ve ilçe merkezlerinde içme suyu olarak kullanılan 247 su örneğinin ise %0,80'inde pozitiflik saptanmıştır (Çiçek vd 2011).



Yalçın ve Doğan tarafından yapılan çalışmada; Erzincan ilinde 140 farklı noktadan çevresel su örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler PCR ve LAMP tekniği uygulanmıştır. PCR ile toplanan örneklerden 6'sı (% 4,3) pozitif sonuç verirken, LAMP ile 9' u (% 6,4 ) *Cryptosporidium* açısından pozitif olarak bulunmuştur (Yalçın vd 2019).

Sağlam ve arkadaşları tarafından Temmuz 2016 - Ocak 2017 tarihleri arasında yapılan çalışmada; Eğirdir Gölü'ndeki 5 farklı istasyondan 3 farklı mevsimde toplam 15 su örnekleri alınmıştır. Örnekler direkt bakı ile incelendikten sonra Modifiye Asit Fast (MAF) ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirilmesi sonucu Eğirdir Gölü'nde mevsimsel olarak en fazla yaz aylarında ortalama %99.2 *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir. Ayrıca kış ve sonbahar mevsimlerinde de %80'in üzerinde yoğunluk tespit edilmiştir (Sağlam vd 2021).

Özçelik ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; Sivas ilçe ve köylerinden toplam 92 örnek toplanarak Modifiye Asit Fast (MAF) boyama yöntemi ve PCR ile yapılan incelenmesinde Modifiye Asit Fast (MAF) ile boyanan 92 su örneğinin hiç birinde *Cryptosporidium* spp. saptanmazken PCR ile 2 örnekte (%2,2) *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır (Özçelik vd 2015).

Karaman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; Samsun İl Merkezi'nde 13 istasyondan Mart 2012-Şubat 2013 arasında alınan su örnekleri kinyonun asit fast, modifiye trichrome ve trichrome boyaları ile boyanmıştır. Işık mikroskobunda parazitolojik açıdan değerlendirilmesi sonucu incelenen 180 çevresel su, 48 içme suyu olmak üzere toplam 228 su örneğinden 132 tanesinde *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır (Karaman vd 2017).

Kolören ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; Samsun'un Terme ilçesinde bulunan Terme ve Kocaman Irmağı'ndan alınan 72 çevresel su örneğinin 60 tanesinde (%83.3) 1-19 ookist/L *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin; kistlerinin varlığı IFA ile tespit edilmiştir. IFA yöntemi ile pozitif bulunan su örneklerinin hepsi nested-PCR tekniği ile de doğrulanmıştır (Kolören ve Karaman 2017).

Sağlam tarafından yapılan çalışmada; Ekim 2017- Ekim 2018 tarihleri arasında Denizli ilinde bulunan su kaynaklarından alınan 84 adet su numunesi *Cryptosporidium* türleri için kinyonun asit-fast boyama yöntemi ile boyanmıştır. Çalışma süresinde toplanan 36 adet tarımsal sulama suyu örneğinin %58,33'ünde *Cryptosporidium* spp. varlığı saptanmıştır. 48 adet içme suyu örneğinin ise *Cryptosporidium* varlığı saptanmamıştır (Sağlam 2018).

Diğer taraftan Dünyada çevresel su örneklerinde 1995-2017 yılları arasında yapılan çalışmaların gösterildiği tablo 2.3 incelendiğinde; *Cryptosporidium* tespit oranının %11,4 ila %100 arasında değiştiği görülmektedir. *Cryptosporidium* ookist konsantrasyonu ise genellikle 10 ookist/L üzerinde tespit edilmiştir (Zahedi vd 2021).

Yapılan tez çalışmasında Mardin ilindeki su kaynaklarından toplanan 56 numuneden hazırlanan ve kinyoun asit-fast yöntemi ile boyanan preparatlardan 5 tanesinde (%8,92), negatif boyama yönteminin 3 farklı modifikasyonu ile boyanan preparatlardan 2 tanesinde (%3,57) *Cryptosporidium* ookisti gözlenmiştir. Diğer taraftan *Cryptosporidium* özgül antijenlerinin arandığı hızlı kaset test ile 2 numunede (%3,57) *Cryptosporidium* ookist varlığı tespit edilmiştir. Mikroskopiden daha özgül bir test olan hızlı kaset testteki pozitiflik oranı, kinyoun asit-fast yöntemiyle boyama yönteminin gerisinde kaldığı görülmüştür. Bunun nedeninin çevresel su numunelerinde *Cryptosporidium* ookist yoğunluğunun az olmasından dolayı hızlı kaset testin tespit sınırının altında kalmış olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan numunelerdeki *Cryptosporidium* varlığının saptanması amacıyla kullanılan boyama yöntemlerinden kinyoun asit-fast yönteminin diğer boyama yöntemlerine göre mikroskopide ookist tespiti için daha uygun olduğu anlaşılmıştır. Numunelerin saklanması için kullanılan solüsyonların ookist tespiti yönünden anlamlı farklar yaratmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca belirli sıcaklıklara çıkarılan numunelerin boyanma özelliklerinde kullanılan son boyayı yani zemin boyasını aldığı görülmüştür. Bu nedenle boyama işlemlerinde numunenin önceden ısıtılmasının ookist tespiti bakımından yararlı olmayacağı anlaşılmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen bilgiler ışığında; Mardin ilindeki tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin fazla olması, iklim koşulları, bazı bölgelerin kanalizasyon ve arıtma sistemlerine erişiminde sıkıntı yaşaması nedeniyle su *Cryptosporidium* kontaminasyon riskinin olduğu anlaşılmıştır.

*Cryptosporidium*'un su kaynaklı hastalıkların önemli bir etkeni olmasına rağmen Türkiyede çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium*'un tespiti için yapılan çalışmalar sayısı hala yeterli seviyede değildir. Yapılan tez çalışması Mardin ilinde *Cryptosporidium*'un tespitine yönelik ilk çalışmadır. Bu tez çalışması; Mardin ilindeki su kaynaklarındaki *Cryptosporidium* ile kontamine su kaynaklarının tespiti sağlanarak halk sağlığını korumak ve *Cryptosporidium* salgınlarını önlemek için gerekli önlemlerin alınması konusunda yardımcı olacağı düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ

Tez çalışmasında elde edilen bilgiler ışığında; Mardin ilinde şehir merkezi, ilçe ya da köy ayrımı olmaksızın yapılan yoğun hayvancılık faaliyeti neticesinde toprak ve su kaynaklarının hayvansal kirlilik yükünün fazla olması, katı atık arıtma hizmetinden halkın yaklaşık %40'nın yararlanamaması, toplumun bir kısmının ekonomik olarak yetersiz yaşama koşulları altında bulunması, kalabalık ailelerin birarada yaşaması, kültürel hijyen alışkanlıkları nedeniyle paraziter hastalıkların özellikle de her yerde bulunabilen *Cryptosporidium* enfeksiyonu riskinin her zaman olası olabileceğini göstermiştir.

Tez çalışmasında elde edilen bulgularda Mardin ili çevresel su örneklerinde yaygın bir *Cryptosporidium* kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. Ancak hayvancılık faaliyetlerinin yoğun olarak yapıldığı yerlerdeki rastlanılan pozitif örnekler nedeniyle dere sularının kontaminasyon riski taşıdığı anlaşıldığından hijyenik koşulların iyileştirilerek halk sağlığını korumak amacıyla hijyen konusunda eğitimlerin verilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Diğer taraftan yapılan tez çalışması sonucu elde edilen bilgiler sonucunda; saklama solüsyonlarının numunelerde *Cryptosporidium* ookisti tespiti için anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür. Su numunelerinde *Cryptosporidium*'un tespiti için en uygun boyama yönteminin kinyoun asit-fast boyama yöntemi olduğu anlaşılmıştır. Boyama yöntemlerinin uygulanmasından önce numunelerin belirli sıcaklıklarda inkübe edilmesinin *Cryptosporidium* ookistlerinin tespitinde pozitif bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Genel itibarı ile *Cryptosporidium* ookist titresi düşük olan su örneklerinde mikroskopi ile *Cryptosporidium* ookist tespiti için tecrübeli laboratuvar personeline ihtiyaç olsa da pahalı moleküler yöntemlerin kullanılmasının mümkün olmadığı yerlerde hızlı kaset testlerle birlikte kullanılması halinde hızlı ve doğruluk oranı yüksek sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir. Ancak rapid kaset testlerin tek başına kullanıldığında ancak parazit titresi yüksek örnekleri çalışmak için uygun olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abeledo-Lameiro MJ., Polo-López MI, Ares-Mazás E, Gómez H. CousoInactivation of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by photo-Fenton process under natural solar conditions. **Applied Catalysis B: Environmental** 2019; 253: 341-347.
- Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and Giardia: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. **Acta Tropica** 2018; 184: 15-28.
- Akalın B. Kütahya ili çevresinde buzağılarda *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907) türlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması. **Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kütahya, 2018, s. 1-69.
- Altindis M, Elmas B, Kılıç Ü Ferhat G, Aslan, Küçükkara G, Koroglu M. Loop-Mediated Isothermal Amplification PCR (LAMP-PCR) For Rapid Molecular Diagnosis of Group A Streptococci. **Biotechnol and Strategic Health Res.** 2017, s. 11-16.
- Anderson BC. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. **Am J Public Health.** 1985 Dec;75(12):1433-4.
- Birdane FM. Çiftlik hayvanlarında kriptosporidiozis ishalleri. **Kocatepe Vet J.** 2017; 91-98.
- Bouzid M, Hunter PR, Chalmers R M, Tyler K M. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clinical Microbiology Reviews** 2013; 26(1): 115-134.
- Bridle H, Kersaudy-Kerhoas M, Miller B, Gavriilidou D, Katzer F, Innes, EA, & Desmulliez MP. Detection of *Cryptosporidium* in miniaturised fluidic devices. **Water Research** 2012; 46(6): 1641-1661.
- Cacciò SM, Putignani L. Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. *Cryptosporidium: parasite and disease.* Cacciò SM, Widmer G. Vienna, **Springer Vienna**, 2014, s. 43-79.
- Cameron P, Gaiser BK., Bhandari B., Bartley PM., Katzer F., Bridle H.. Silver Nanoparticles Decrease the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Applied and Environmental Microbiology** 2016; 82(2): 431-437.
- Carhan A, Ercan E, Yalcinkaya T. "Dijital PZR ve kullanım alanları. **Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi** 2016; 73(2): 183-198.
- Cetinkaya F. "*Cryptosporidium parvum*'un bulaşmasında su ve gıdaların rolü. **Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.** 2004; 103-109.
- Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği İl Müdürlüğü.** Mardin İli 2021 Yılı Çevre Durum Raporu, 2021, Mardin

Chial H. "DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. **Nature Education** 2008; 1(1): 176.

Chyzheuskaya A, Cormican M, Srivinas R, O'Donovan D, Prendergast M, O'Donoghue C, Morris D. Economic assessment of waterborne outbreak of cryptosporidiosis. **Emerging Infectious Diseases**, 2017, 23.10: 1650.

Cunha FS, Peralta RHS., Peralta JM "New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review." **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 2019; 61: 1-12.

Çeber K, Aslan G, Otağ F, Delialioğlu N, Öztürk C, Babür C, Emekdaş G. Mersin ilinde içme suyu, kullanma suyu, atık su ve deniz sularında *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin araştırılması. **Türkiye Parazitol. Derg.**, 2005; 29, 224-8.

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

DeCicco RePass MA, Chen Y, Lin Y, Zhou W, Kaplan DL, Ward HD. Novel bioengineered three-Dimensional human intestinal model for long-term infection of *Cryptosporidium parvum*. **Infection and Immunity** 2017; 85(3): 1-11.

Dubey JP, CAS., Fayer R., General Biology of *Cryptosporidium*. Cryptosporidiosis of man and animals. C. A. S. J. P. Dubey, R. Fayer. Florida, **CRC Press**, 1990, s.1-29.

Dumaine JE, Tandel J, Striepen B. *Cryptosporidium parvum*. **Trends in Parasitology** 2020; 36(5): 485-486.

Emre Z, Alabay BM, Vatansever Y, Düzgün A, Söğüt A, Altay Çapın G, Çerçi H. *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin gama ışınlama ile inaktivasyonu. **Türkiye Atom Enerjisi Kurumu**, Teknik Rapor 2017/2, Ankara, 2017, 1-29.

Fayer R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Appl Environ Microbiol.** 1994 Aug;60(8):2732-5.

Feng Y, Ryan UM, Xiao L. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology** 2018; 34(11): 997-1011.

Gharpure R, Perez A, Miller AD, Wikswo ME, Silver R, Hlavsa MC. Cryptosporidiosis Outbreaks — United States, 2009–2017. Morbidity and Mortality Weekly Report, **US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention**, 2019; 68: 568-572.

Guérin A, Striepen B. The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*. **Cell Host & Microbe** 2020; 28(4): 509-515.

Gunasekera S, Zahedi A, O'Dea M, King B, Monis P, Thierry B, Ryan U. Organoids and bioengineered intestinal models: Potential solutions to the *Cryptosporidium* culturing dilemma. **Microorganisms** 2020; 8: 1-16 doi:10.3390/microorganisms, 8(5), 715.

Güven N. Biyosensörler nedir? <https://www.biyomedikalbilgi.com/biyosensörler/> (alındığı tarih: 28.05.2022).

Haseena M, Malik MF, Javed A, Arshad S, Asif N, Zulfiqar S, Hanif J. Water pollution and human health. **Environmental Risk Assessment and Remediation** 2017; 1(3).

Hassan EM, Örmeci B, DeRosa MC, Dixon BR, Sattar SA, Iqbal A. A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. **Water Science and Technology** 2020; 83(1): 1-25.

Hagos B, Molestina RE. A Simple Alcohol-based Method of Oocyst Inactivation for Use in the Development of Detection Assays for *Cryptosporidium*. **Food Waterborne Parasitol.** 2022 May 13;27:e00163.1-11.

Hijawi N, Zahedi A, Al-Falah M, Ryan U. A review of the molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in the Middle East and North Africa (MENA) region. **Infection, Genetics and Evolution** 2022; 98: 1-28.

Hrudey SE, Hrudey, EJ. Common themes contributing to recent drinking water disease outbreaks in affluent nations. **Water Supply** 2019; 19(6): 1767-1777.

Kaçmaz M. Diyarbakır yöresindeki çeşitli su kaynaklarına *Cryptosporidium* ve giardia türlerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, **Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Kars, 2015, s.88.

Kamps R, Brandão RD, van den Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, Romano A. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. **International Journal of Molecular Sciences** 2017; 18(2): 1-57

Karaman Ü, Seferoğlu KZ, Ayaz O, Demirel EE. Samsun il ve ilçelerinden alınan çevresel sularda parazitlerin varlığı. **Türkiye Parazit Derg** 2017; 41: 19-21.

Khanna V, Tilak K, Ghosh A, Mukhopadhyay C. Modified negative staining of heine for fast and inexpensive screening of *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, and *Cystoisospora* spp. **International Scholarly Research Notices** 2014: 1-4.

Kissinger JC. Evolution of *Cryptosporidium*. **Nature Microbiology** 2019; 4(5): 730-731.

Kolören Z, Karaman Ü. Samsun İli terme ve Kocaman Irmağı'ndan alınan çevresel su örneklerinde su kökenli parazitlerin tespit edilmesi 2017 **Akademik Ziraat Dergisi**, 6(2): 177-182.

LaGier MJ, Keithly JS, Zhu G. Characterisation of a novel transporter from *Cryptosporidium parvum*. **International Journal for Parasitology** 2002; 32(7): 877-887.

Lal A, Fearnley E, Wilford E. Local weather, flooding history and childhood diarrhoea caused by the parasite *Cryptosporidium* spp.: A systematic review and meta-analysis. **Science of The Total Environment** 2019; 674: 300-306.

Laurent F, Lacroix-Lamandé S. Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology** 2017; 47(12): 711-721.

Leav BA., Mackay M, Ward HD, Acheson D. *Cryptosporidium* species: New insights and old challenges. ***Clinical Infectious Diseases*** 2003; 36(7): 903-908.

Leitch GJ, He Q. Cryptosporidiosis-an overview. ***Journal of Biomedical Research*** 2011; 25(1): 1-16.

Lendner M, Dauschies A. (2014). *Cryptosporidium* infections: molecular advances. ***Parasitology*** 2014; 141(11): 1511-1532.

Luka G. On-chip-based biosensors and point-of-care devices for label/PCR-free detection of *Cryptosporidium*. Mechanical Engineering, ***The University of British Columbia***, Doctor, 2021, 168.

Nader JL, Mathers TC, Ward BJ, Pachebat JA, Swain MT, Robinson G, Tyler KM. Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. ***Nature Microbiology*** 2019; 4(5): 826-836.

O'Hara SP, Chen XM. (2011). The cell biology of *Cryptosporidium* infection. ***Microbes and Infection*** 13(8): 721-730.

Oruç E, Akpınar, Y. Kuzu enteritiserinde Cryptosporidiosis hastalığının patolojik yöntemlerle araştırılması. ***Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi***, 2019; 205-210.

Özçelik S, Malatyalı E, Alim A, Değerli S. The investigation of *Cryptosporidium* spp. in water samples by PCR. ***Cumhuriyet Medical Journal***, 2015; 37(3), 182-187.

Painter JE, Hlavsa MC, Collier SA, Xiao L, Yoder JS. Cryptosporidiosis surveillance—United States, 2011–2012. Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries, Centers for Disease Control and Prevention 2015; 64(3): 1-14.

Pinto P, Riberio CA, Kváč M, Tsaousis AD. *Cryptosporidium*. ***Lifecycles of Pathogenic Protists in Humans***. Springer Nature Switzerland AG. Eds. W. d. Souza, 2022, 35: 332-371.

Perkins ME, Riojas YA, Wu TW, Le Blancq SM. CpABC, a *Cryptosporidium parvum* ATP-binding cassette protein at the host-parasite boundary in intracellular stages. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 1999; 96(10): 5734-5739.

Pollok RCG, McDonald V, Kelly P, Farthing MJG. The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. ***Parasitology Research*** 2003;90(3): 181-186.

Potters I, Esbroeck MV. Negative Staining Technique of Heine for the Detection of *Cryptosporidium* spp.: A Fast and Simple Screening Technique. ***The Open Parasitology Journal*** 2010; 4(1): 1-4.

Proje MNE. Criptospridumun inaktivasyonu, 2020.

Rhodes ER, Villegas LF, Shaw NJ, Miller C, Villegas ENA. Modified EPA method 1623 that uses tangential flow hollow-fiber ultrafiltration and heat dissociation steps to detect waterborne *Cryptosporidium* and giardia spp. ***JoVE*** 2012; (65): 1-6.

Ryan U, Hijawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. ***International Journal for Parasitology*** 2018; 48(1): 1-12.

Ryan U, Zahedi A, Feng Y, Xiao L. An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. **Animals** 2021, 11(11): 22.

Ryan UM, Feng Y, Fayer R, Xiao L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). **International Journal for Parasitology** 2021, 51(13): 1099-1119.

Sağlam T. Denizli il merkezi'nde tarımsal sulama ve içme suyu kaynaklarında bulunan bazı tek hücreli (protozoa) parazitler üzerine bir araştırma. Yüksek lisans tezi, **Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**. Denizli, 2018, s.138.

Sağlam T, Düşen S, Yağcı MA, Yağcı A. Eğirdir Gölü'nde (Isparta) *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. varlığının araştırılması. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi**, 2021; 51(4), 363-367.

Semenza JC. Cascading risks of waterborne diseases from climate change. **Nature Immunology** 2020; 21(5): 484-487.

Sevindik E, Abacı ZT. Nested PCR ve kullanım alanları. **Türk.Bilimsel Derleme Derg** 2013; 2: 22-26.

Šlapeta J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology** 2013; 43(12): 957-970.

Stoyanova K, Pavlov S. Immunity and resistance to cryptosporidiosis: the intricate ways of an enigmatic parasitosis. **Biomedical Reviews** 2019; 30: 37.

Şahin S, Ağaoğlu S, Alemdar S. *Cryptosporidium* ve cryptosporidiosis. **Gıda Kaynaklı Paraziter Hastalıklar D. Y.**, 2018; 35-41.

Tandel J, English ED, Sateriale A, Gullicksrud JA, Beiting DP, Sullivan MC, Striepen B. Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. **Nature Microbiology** 2019; 4(12): 2226-2236.

Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections – What's new?. **Infection, Genetics and Evolution** 2019; 75: 103951.1-5.

Thomson S. Cryptosporidiosis in farm livestock. Institute of Biodiversity Animal Health and Comparative Medicine, **University of Glasgow**, 2016, s. 206.

Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. **Veterinary Research** 2017; 48(1): 711-721.

Tomazic ML, Garro C, Schnittger L. *Cryptosporidium*. Parasitic protozoa of farm animals and pets. Eds. Florin-Christensen M, Schnittger L. Cham, **Springer International Publishing**, 2018 s. 11-54.

Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection** 2012; 1047–1058.

Usluca S, Aksoy Ü, Su kaynaklı bir parazit: *Cryptosporidium*, **Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi** 2006, 65-74.



van Belkum A, DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. ***Clinical Microbiology Reviews*** 1994; 7(2): 174-184.

Xiao L, Feng Y, Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. ***Food and Waterborne Parasitology*** 2017; 8-9: 14-32.

Xiao L, Griffiths JK. 96 - Cryptosporidiosis. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition). Eds. Ryan ET, Hill DR, Solomon T, Aronson NE, Endy TP. London, ***Elsevier***, 2020, s. 712-718.

Yalçın S, Doğan NY, Erzincan İli Farklı Su Kaynaklarından *Cryptosporidium* spp'nin Moleküler Yönelimlerle Tespit Edilmesi. ***Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, 2019; 12(1), 1-13.

Yu X. Exploring the Molecular Interactions Between Host Cells and *Cryptosporidium parvum* During Invasion. Doctoral dissertation. Veterinary Pathobiology, ***Texas A & M University***, 2018, s. 87.

Zahedi A, Greay TL, Papparini A, Linge KL, Joll CA, Ryan UM. Identification of eukaryotic microorganisms with 18S rRNA next-generation sequencing in wastewater treatment plants, with a more targeted NGS approach required for *Cryptosporidium* detection. ***Water Research*** 2019; 158: 301-312.

Zahedi A, Monis P, Deere D, Ryan U (2021). Wastewater-based epidemiology—surveillance and early detection of waterborne pathogens with a focus on SARS-CoV-2, *Cryptosporidium* and *Giardia*. ***Parasitology Research*** 2021; 120(12): 4167-4188



T.C.  
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI  
Doğal Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü

Sayı : 21264211-288.04-E.773666  
Konu : Araştırma izni

04.03.2020

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

Üniversiteniz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Dr. Mustafa ŞENGÜL tarafından yürütülecek olan "Mardin ili çevre sularında *Cryptosporidium parvum*'un varlığının araştırılması" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
  - Arazi çalışması öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma ile ilgili Tarım ve Orman Bakanlığının ilgili taşra teşkilatına bilgi verilmesi,
  - Söz konusu çalışmaların 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde kalması durumunda çalışmanın süreç ve sonucu hakkında mutlak suretle ilgili Milli Park Müdürlüğüne bilgi verilmesi,
  - Arazi çalışmalarının 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde olması durumunda bu kısımlarda çalışma yapılırken Bakanlığımız ilgili taşra teşkilatından bir mihmandar eşliğinde araziye çıkılmasının sağlanması,
  - Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
  - Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde izin dosyasında belirtilen miktarın aşılmaması ve bu örneklerin yurtdışına çıkarılmaması,
  - Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,
- şartıyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüştür. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır

Hasan KANCA

Bakan a.

Genel Müdür Yardımcısı V.

Ek : Rapor Genel Tanım Bilgileri (2 sayfa)

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

