

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

CRYPTOSPORIDIUM SPP. TÜRLERİNİN REAL TIME PZR YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Güllü ELGÜN EVCİL

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

***CRYPTOSPORIDIUM* SPP. TÜRLERİNİN REAL TIME
PZR YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI**

Güllü ELGÜN EVCİL

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2022

KABUL ve ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“CRYPTOSPORIDIUM SPP. TÖRLERİNİN REAL TIME PZR YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI ” adlı çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 22/08/2022

TEZ SINAV JÖRİSİ

Prof. Dr. Macit İlkit Çukurova Üniversitesi Üye	Prof. Dr. Davut Alptekin Çukurova Üniversitesi Üye
Mustaf Kemal Üniversitesi Üye	Mustafa Kemal Üniversitesi Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

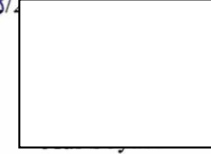
Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 22.08/2022



Güllü Elgün Evcil

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Parazitoloji Doktora Programı
Tezin Konusu : Cryptosporidium Spp. Türlerinin Real Time Pcr Yöntemi ile Tanımlanması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon

E-Posta

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon

E-Posta

:

Adresi

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım, bakış açımın değişmesini sağlayan, desteğini her zaman üzerimde hissettiğim, biz öğrencilerine bir baba şefkati ile yaklaşan ve maalesef şu anda hayatta olmayan birinci tez danışmanım, sayın hocam Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. İsmail Soner KOLTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Tezimin devamında bana yardımcı olan ikinci danışmanım, sayın hocam Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Fatih KÖKSAL'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, eğitimim süresince maddi manevi her zaman yanımda olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim sevgili anneme, şu anda hayatta olmayan sevgili babama, hayatımda büyük bir yere sahip olan sevgili eşime ve sevgili kızıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım, güler yüz ve samimiyetlerini benden esirgemeyen, beni destekleyen ve çalışmalarına katkısı bulunan Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarına ayrı ayrı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasını TF.2011.D.7 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü.Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkürlerimi sunarım.

Uzman Biyolog Güllü EVCİL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Taksonomi.....	3
2.3. <i>Cryptosporidium</i> Tür ve Genotipleri.....	5
2.4. Epidemiyoloji.....	7
2.5. Morfoloji ve Evrim	10
2.6. Hastalığın Bulaşması Ve Bulaş Yolları.....	13
2.7. Parazitin Yerleştiği Organlar Ve Konak Parazit İlişkisi	13
2.8. Patojenite.....	14
2.9. İmmünite	15
2.10. Tanı	16
2.10.1. Kriptosporidiyoz Olgularında Klinik Tanı	17
2.10.1.1. İntestinal Kriptosporidiyoz.....	17
2.10.1.2. Respiratuar Kriptosporidiyoz	18
2.10.1.3. Hepatobiliyer Kriptosporidiyoz	18
2.10.1.4. Pankreatik Kriptosporidiyoz	18
2.10.2. Kriptosporidiyoz Olgularında Laboratuvar Tanı	18
2.10.2.1. Doğrudan Preparat İnceleme	19
2.10.2.2. Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi	19

2.10.2.3. Konsantrasyon Yöntemleri.....	19
2.10.2.4. Serolojik Tanı Yöntemleri.....	20
2.10.2.4.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ...	20
2.10.2.4.2. DFA (Direkt Floresan Antikor).....	20
2.10.2.4.3. IFA (İndirekt Floresan Antikor).....	20
2.10.2.4.4. Hızlı Immunokromatografik Yöntem	21
2.10.2.5. Kültür	21
2.10.2.6. Flow Sitometri Yöntemi.....	21
2.10.2.7. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	22
2.10.2.7.1. Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	22
2.10.2.7.2. Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR (qPZR).....	23
2.11. Tedavi.....	26
2.11.1. İmmun Sistemi Sağlam Kişilerde Tedavi	27
2.11.2. İmmun Sistemi Baskılanmışlarda Tedavi	27
2.12. Korunma.....	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Gereçler	30
3.2. Örneklerin Toplanması.....	31
3.3. Yöntemler.....	31
3.3.2. Formol Etil Asetat Çöktürme Yöntemi	32
3.3.3. Feconomics®(Salubris Inc, Boston, USA) Yöntemi.....	33
3.3.4. Modifiye Asit- Fast Boyama Yöntemi	34
3.3.5. ELISA Testi	35
3.3.6. DNA İzolasyon Yöntemi	37
3.3.7. Standart PZR Yöntemi.....	38
3.3.7.1 Agaroz Jel Elektrophorezi	39
3.3.8. Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR Yöntemi	41
4. BULGULAR.....	45
4.1. Doğrudan Preparat, Formol Etil Asetat ve Feconomics Çöktürme Yöntemlerinin Sonuçları	45
4.2. Modifiye Asit Fast Boyama Yöntemi Sonucu	46
4.3. ELİSA Test Sonucu	47

4.4. Standart PZR Yöntemi Sonucu	47
4.5. Real-Time PZR Yöntemi Sonucu	48
4.6. Duyarlilik-Özgüllük Sonuçlari.....	51
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	71



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. 2021 yılında <i>Cryptosporidium</i> cinsinde tanımlanan <i>Cryptosporidium</i> türleri.....	7
Şekil 2. Ookistlerin parçalanmasıyla serbest kalan enfektif sporozoitler	11
Şekil 3. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin yaşam döngüsü.....	12
Şekil 4. <i>Cryptosporidium</i> 'un evrimi ve evrim şekilleri.....	12
Şekil 5. Gerçek zamanlı (Real time) PZR test cihazı (Rotor Gene 3000 Corbertt Research cihazı).....	41
Şekil 6. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin ookistlerinin modifiye asit-fast boyamadaki görüntüsü (x100) Orjinal.	46
Şekil 7. ELISA test sonucu	47
Şekil 8. Standart PZR yöntemi ile pozitif bulunan birkaç örneğin agaroz jel görüntüsü. (1.100 bp'lik marker (Bio Basic), 2.Negatif kontrol, 3.Pozitif kontrol, 4,5,6 pozitif örnekler)	48
Şekil 9. <i>Cryptosporidium</i> spp. için pozitif saptanan örneklerin real time PZR' de eş zamanlı analizleri sonucu belirlenen amplifikasyon grafikleri	49
Şekil 10. Melting curve analiz sonucu	50
Şekil 11. Melting curve analiz sonucu farklı pikler yapan ve tür tayini için sekansa gönderilen örnekler.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No:

Sayfa No:

Çizelge 1. Cryptosporidium cinsine ait sınıflandırma	4
Çizelge 2. <i>Cryptosporidium</i> türleri ve yerleştiği konaklar	6
Çizelge 3. Çalışma gruplarındaki kadın ve erkek sayıları	32
Çizelge 4. <i>Cryptosporidium</i> cinsine ait spesifik primer dizilimi	39
Çizelge 5. CX2F ve CX2R Primerleri için kullanılan PZR programı	39
Çizelge 6. Real time PZR testinde kullanılan stok primer ve problardan hazırlanan primer-prob karışımı	42
Çizelge 7. Real time PZR testinde her bir örnek için kullanılan reaksiyon karışımı.....	43
Çizelge 8. Real time PZR testinde her bir örnek için uygulanan protokol	44
Çizelge 9. Doğrudan preparat, formol etil asetat çöktürme ve Feconomics® yöntemleri ile bulunan bağırsak parazitleri ve toplam sayıları	45
Çizelge 10. Modifiye asit fast boyama sonucu.....	46
Çizelge 11. Melting curve ve DNA sekans sonuçlarına göre <i>Cryptosporidium</i> türleri.....	51
Çizelge 12. Real time PZR ve modifiye asit fast boyama yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması	51
Çizelge 13. ELİSA ve real time PZR yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması	52
Çizelge 14. Real time PZR ve standart PZR yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

AE	: Elüsyon tamponu
AL	: Lizis tamponu
ASL	: Stool lizis tamponu
AW ₁ -AW ₂	: Yıkama tamponu
Bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
CD ₄ T lenfosit	: Lenfosit Sitotoksik T
COWP	: <i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
C _T	: Threshold cycle (Eşik değeri)
DFA	: Direkt Immunfloresans Antikor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELİSA	: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Enzim bağlı immünolojik deney)
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfer
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFA	: İndirekt Floresan Antikor (İmmunfluoresan boyama)
IFN	: İnterferon
IgA	: Immunoglobulin A
Ig G	: Immunoglobulin G
Ig M	: Immunoglobulin M
IL	: İnterlökin
ml	: Mililitre
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
QPZR	: Gerçek zamanlı (Real Time) PZR
SAF	: Sodyum asetat-asetik asit formol(fiksatif)
SNP	: Single nükleotid polymorphism
SSU Rna	: Smallsunit ribosomal ribonükleik asit (Ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge)

Tm : Erime sıcaklığı
UV : Ultraviyole
 μm : Mikrometre



ÖZET

Cryptosporidium Spp. Türlerinin Real Time Pzr Yöntemi İle Tanımlanması

Cryptosporidium spp. immun sistemi baskılanmış veya sağlam bireylerde ve çocuklarda öldürücü diyareye neden olabilen zorunlu hücre içi yerleşim gösteren bir protozoondur. Kriptosporidiyozun tanısında genellikle aside dirençli boyama tekniği kullanılmaktadır. Günümüzde geliştirilen moleküler yöntemler sayesinde, epidemiyolojik verilerin elde edilmesine yönelik olarak asemptomatik taşıyıcılarda *Cryptosporidium* saptanması ve tür düzeyinde tanımlanması mümkün olmuştur. Bu çalışmanın amacı, küçük alt ünite (SSU) rRNA genine dayalı sekanslama ve gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real time PZR) sonrası erime eğrisi (melting curve) analizi kullanılarak Adana'daki insanlardaki *Cryptosporidium* türlerini saptamaktır. Bunun için 2011 Nisan ve 2014 Şubat ayları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji bölümüne başvuran ishalli kişilerden toplam 320 dışkı örneği toplanmıştır. Bu dışkı örnekleri, doğrudan preparat inceleme, yoğunlaştırma, modifiye asit fast boyama, ELİSA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), standart PZR ve SSU rRNA genini temel alan uygun primer ve hibridizasyon problemlerinden Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) kullanılarak real-time PZR yöntemleri ile incelenmiştir. *Cryptosporidium* spp. saptanan pozitif örneklerde real time PZR yöntemi sonrası melting curve analizi uygulayarak tiplendirme yapılmıştır. Çalışma sonucunda, boyama yöntemiyle 22, ELİSA ile 26, standart PZR ile 27 ve real-time PZR ile 31 örnekte *Cryptosporidium* varlığı saptanmıştır. Tür olarak *Cryptosporidium hominis* (12), *Cryptosporidium parvum* (7) *Cryptosporidium meleagridis* (7) ve *Cryptosporidium andersoni* (5) türleri tanımlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Adana'daki enfeksiyonlardan *Cryptosporidium hominis*'in *Cryptosporidium parvum*'dan daha yaygın olduğunu ve real time PZR yönteminin *Cryptosporidium* türlerinin ayrımında ve tanımlanmasında kolay, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium*, Melting Curve Analizi, Real-Time PZR, SSU rRNA Geni,

ABSTRACT

Identification of *Cryptosporidium* Species By Real Time Pcr Method

Cryptosporidium spp. are protozoa which only live in a host cell and may cause an infection that may result in the death of people with immune deficiency, in healthy individuals and children. Resistant to acid staining technique is often used in the diagnosis of cryptosporidiosis. Today, thanks to the development of molecular methods , in order to obtain epidemiological data in asymptomatic carrier detection and identification of *Cryptosporidium* species level was possible. The aim of the present study was to determine *Cryptosporidium* species/genotypes in humans in Adana, Turkey using melting curve analysis after real-time PCR and sequencing based on the small subunit rRNA gene. A total of 320 faecal samples were collected from humans with diarrhea applying to Parasitology Department of Medicine Fakulty in Cukurova University between April 2011 and February 2014. This stool samples were examined with direct smears, concentration, modified acid- fast staining, ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and based on the SSU rRNA genes by real time PCR method. Moreover, genomic DNA of each fecal sample was screened for the presence of *Cryptosporidium* with real-time PCR using primers and hibridization probes, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), which was genotyped by analyzing the DNA sequences of small subunit rRNA (SSU rRNA). In the results of working, 22 positive with staining method, 26 positive with ELISA, 27 positive with standart PCR and 31 positive with real time PCR were found *Cryptosporidium* spp. Molecular and genotype characterization found the following protozoan species; *Cryptosporidium hominis* (12), *Cryptosporidium parvum* (7), *Cryptosporidium meleagridis* (7) and *Cryptodporidium andersoni* (5). The results obtained in this study support previous findings showing that *Cryptosporidium hominis* infections are more prevalent than *Cryptosporidium parvum* infections in Adana and they demonstrate that real time PCR procedure is a simple, fast and voluable tool for the detection and differentiation of *Cryptosporidium* species.

Keywords: *Cryptosporidium*, Melting Curve Analysis, Real-Time PCR, SSU rRNA Gene,

1. GİRİŞ

Paraziter hastalıklar, dünyada özellikle gelişmekte olan ülkeler için en önemli sağlık sorunlarından biridir. Bu hastalıklar, ülkemizde de önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Paraziter enfeksiyonlar, büyüme çağındaki çocuklar ve immün suprese hastalar için daha çok önemlidir. Bağırsak enfeksiyonlarında parazitin sayısı, cinsi, konağın bağışıklık durumu, enfeksiyon süresi, konak ve parazit arasındaki etkileşim, beslenme durumu ve etkilenen organa göre farklı şiddette değişiklikler ortaya çıkmaktadır¹.

Cryptosporidium, insan ve hayvanlarda gastrointestinal sistem ve solunum yollarında yerleşen Apicomplexa şubesinde yer alan hücre içi protozoon parazitlerdendir. Neden oldukları enfeksiyona kriptosporidiyoz denmektedir. Bu organizmalar, diğer koksidialarla benzerliği ve ookistlerinin içinde sporokist olmayışı nedeni ile *Cryptosporidium* olarak isimlendirilmiştir. *Cryptosporidium* cinsi, insanlar, çiftlik hayvanları, kuşlar, sürüngenler ve balıklar gibi en az 79 hayvan türünü enfekte edebilmektedir^{2,3}. *Cryptosporidium* türleri, her yaştaki konakta görülebilmektedir; ancak genç insan ve hayvanların enfeksiyona daha duyarlı olduğu bilinmektedir⁴. Bulaşmanın gerçekleşebilmesi için enfektif ookistlerin yiyecek içeceklerle, hayvan ya da kontamine yüzeylerle yakın temasla, hava, toprak ve taşıyıcı konaklarla dolaylı yollardan alınması gerekmektedir. *Cryptosporidium* türleri en fazla ince bağırsağa, apendikse, daha az oranda ise mide, akciğer, karaciğer ve safra kesesine yerleşmektedir. Klinik olarak hastalarda, sulu ve mukuslu ishal, karında kramp şeklinde ağrı, bulantı, kusma, düşük ateş, halsizlik ve kilo kaybı görülebilmektedir. Klinik bulgular konağın yaşı, genel sağlık durumu ve alınan parazit sayısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir^{5,6,7}.

Kriptosporidiyoz özellikle HIV (Human Immunodeficiency Virus) ile enfekte olan bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ve immün sistemi baskılayıcı ilaç kullanan tüketicilerde ishal etkeninin en önemli nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yetişkin popülasyonun yaklaşık %30'unda ve gelişmekte olan ülkelere %60'ında ishal etkeninin nedeninin çalışılan serolojik testler sonucunda bu organizmanın olduğu saptanmıştır^{8,9}.

Cryptosporidium tanısı için dışkı, balgam ve safra örneklerinde parazitin ookistlerinin veya biyopsi materyalinde değişik gelişim dönemlerinden birisi görülmelidir. Laboratuvarda tanı yöntemleri olarak nativ lügol, yoğunlaştırma, boyama, kültür, seroloji ve moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır. 1982 yılına kadar daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış grubun enfeksiyonu olarak bilinen kriptosporidiyozun özellikle laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte bağışıklık sistemi sağlam toplumlarda da salgınlara yol açtığı ve hayati tehlike oluşturduğu saptanmıştır. Her geçen yıl salgınlardaki artış, kriptosporidiyozun da önemini arttırmaktadır^{10,11}.

Bu çalışmada, *Cryptosporidium* türleri için epidemiyolojik koşulların uygun olduğunu düşündüğümüz Adana'da, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'ne bağlı kliniklerden Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na sebebi bilinmeyen akut veya kronik ishal şikayeti nedeni ile gönderilen farklı yaş grubundaki hastaların dışkı örnekleri öncelikle nativ-lugol ve yoğunlaştırma yöntemleri ile bağırsak parazitleri yönünden incelenecek ve sonra modifiye asit fast boyama yapılarak *Cryptosporidium* olup olmadığına karar verilecektir. Aynı dışkı örnekleri ile serolojik yöntemlerden antijen aramaya yönelik ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi çalışılacak ve bu örneklerde *Cryptosporidium*'a ait antijen araştırılacaktır. Kalan dışkı örnekleri, moleküler yöntemlerden standart PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve real time PZR uygulanana kadar - 20°C'de saklanacaktır. Zamanı gelince bu dışkı örneklerinden DNA (Deoksiribo nükleik asit) izole edilecek ve uygun primerler kullanılarak önce standart PZR çalışılacak ve sonuçta oluşan bantlara göre *Cryptosporidium* varlığı tespit edilecektir. Daha sonra aynı primerler ve uygun hibridizasyon problemlerinden Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) kullanılarak real time PZR yöntemi ile *Cryptosporidium*'lu örnekler tespit edilecek ve bu örneklerle melting curve (erime eğrisi) analizi uygulanacaktır. Bunun sonucunda oluşan farklı eğriler tespit edilerek bu örneklerin hangi *Cryptosporidium* türüne ait olduğunu öğrenmek için sekansa gönderilecek ve sonuçta türler tanımlanacaktır. Bu *Cryptosporidium* türleri, bulaş kaynağının zoonotik mi yoksa antropotik mi olduğunu göstermiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Cryptosporidium türleri insan ve hayvanlarda gastro-intestinal sistemin mikrovillus kenar kısımlarında, intra-cellüler-extrasitoplazmik olarak bulunan protozoon parazitlerdir. *Cryptosporidium*, gelişmekte olan ülkelerde, çocuklarda (özellikle beslenme yetersizliği olanlarda) ve immun sistemi baskılanmış ya da sağlam olan kişilerde ve hayvanlarda ishal etkeni olarak bilinmektedir ve hayati tehlike oluşturmaktadır^{12,13}.

2.1. Tarihçe

Cryptosporidium ilk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilerek fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri şeklinde tarif edilmiş ve bundan yaklaşık 12 yıl sonra 1907 yılında Ernest Edward Teyzzer tarafından laboratuvar faresinin gastrik kriptlerinde tanımlanmıştır^{14,15}. Sonrasında ise birçok hayvan ve insandan izole edilmiştir. Önceden bilinen koksidian parazitlerin aksine ookistlerinin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistlerinin olmaması nedeni ile *Cryptosporidium* (=gizli sporokistler) olarak isimlendirilmiştir^{13,16}.

İnsanda ilk kriptosporidiyoz olgusu 1976 yılında rapor edilmiştir. 1976-1980 yılları arasında bildirilen insan olguları incelendiğinde enfeksiyonu alan kişilerin bağışıklık sisteminde bir bozukluk yoksa *Cryptosporidium*'ların ciddi bir hastalığa neden olmadığı ve fırsatçı parazit olarak tanımlandıkları görülmektedir. Ancak bazı araştırmacılar, kriptosporidiyozun immünolojik problemi olmayan kişilerde de sıklıkla gastroenterite, kronik bir enfeksiyona hatta ölüme neden olabileceğinden bahsetmektedirler^{13,17}. Gelişmiş ülkelerde retrovirüslere karşı uygulanan tedavi sayesinde 1997 ve 2007 yılları arasında kriptosporidiyoz kısmen kontrol altına alınmış gibi görünürken, gelişmekte olan ülkelerdeki HIV'li hastalarda ve özellikle çocuklarda ciddi komplikasyonlar oluşturmaya devam etmiştir¹⁸.

2.2. Taksonomi

Cryptosporidium cinsi, Protozoa alemi, Apicomplexa şubesi, Sporozoasida sınıfı, Coccidiosina alt sınıfı, Eucoccidiorida takımı, Eimeriorina alttakımı, Cryptosporidiidae ailesinde yer almaktadır. *Cryptosporidium* spp.'nin sistematikteki

yeri (taksonomisi) araştırmacılar tarafından aşağıdaki çizelge1’de detaylı bir şekilde bildirilmektedir^{1,12,13,19}.

Çizelge 1. *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma¹⁹

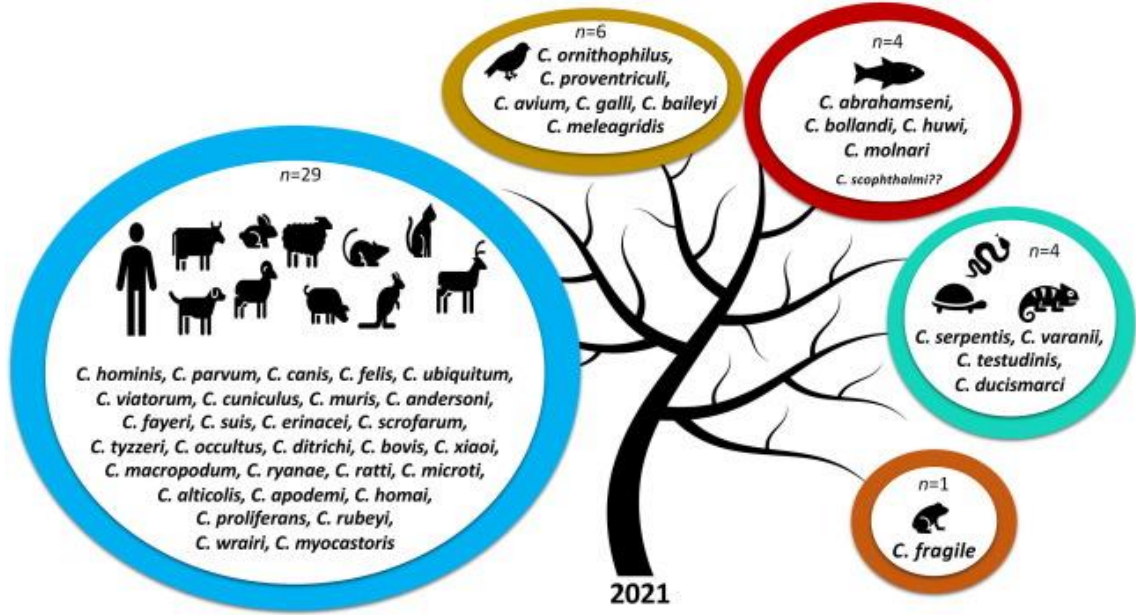
Sınıflandırma	İsim	Biyolojik Özellikleri
Regnum	Animalia	
Supregnum	Protista	Ökaryotik, tek hücreli canlı
Phylum	Apikomplexa	Veziküler bir çekirdeğe sahip olup tüm türleri parazittir.
Class	Sporozoa	Ookist oluşumu, seksüel ve aseksüel üreme özellikleri vardır.
Supclass	Coccidia	Biyolojileri merogoni, gametogoni ve sporogoni şeklindedir. Seksüel faz hücre içinde gerçekleşir. Ergin gamontlar küçük olup yine hücre içidir, çoğu vertebralılarda parazitlenir.
Ordo	Eucoccidia	Merogoni ve vertebralı konakta geçer.
Supordo	Eimeriina	Makro ve mikrogamet oluşumu farklıdır. Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet gelişir. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet gelişir. Zigot hareketsizdir.
Familiya	Cryptosporidiidae	Momksen gelişim söz konusudur ve konak süreci hücrenin yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez, çıplak 4 sporozoiti vardır. Mikrogametleri flagella taşımaz.
Genus	<i>Cryptosporidium</i>	
Tür	<i>Cryptosporidium</i> spp.	

2.3. *Cryptosporidium* Tür ve Genotipleri

Farklı konaklardan izole edilen *Cryptosporidium* türlerinin ookist duvarı ve sporozoit antijenleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve türler arasındaki farklılıklar gösterilmiştir²⁰. *Cryptosporidium* türleri; morfolojileri, konak özgüllükleri, konakta yerleşim yerleri, son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler ile belirlenen moleküler özelliklerine göre isimlendirilmiştir. Bugüne kadar bu cinse ait farklı omurgalı konaklarda parazitlenen 44 ayrı tür tanımlanmıştır (Çizelge 2). Bu türlerin 29'u memelilerde, 6'sı kuşlarda, 4'ü sürüngenlerde, 4'ü balıklarda ve 1 tanesi de kurbağalarda tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu 44 türün 19'u insanlarda rapor edilmiştir. Bunlar; *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*), *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. erinacei*, *C. tyzzeri*, *C. bovis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, *C. occultus*, *C. xiaoi*, *C. fayeri* ve *C. ditrichi*'dir. İnsan enfeksiyonlarının yaklaşık %95'inden genellikle *C. hominis* ve *C. parvum* sorumludur, bunları *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum* ve *C. suis* takip etmektedir^{21,22,23,24,25}.

Çizelge 2. *Cryptosporidium* türleri ve yerleştiği konaklar²¹

Tür adı	Yerleştiği konak
1. <i>Cryptosporidium hominis</i>	İnsan
2. <i>Cryptosporidium parvum</i>	Geviş getitenler, insan
3. <i>Cryptosporidium felis</i>	Kedi, insan
4. <i>Cryptosporidium canis</i>	Köpek, insan
5. <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Hindi, insan
6. <i>Cryptosporidium baileyi</i>	Tavuk
7. <i>Cryptosporidium muris</i>	Kemirgenler, insan
8. <i>Cryptosporidium andersoni</i>	Sığır, insan
9. <i>Cryptosporidium nasorum</i>	Balık
10. <i>Cryptosporidium saurophilum</i>	Kokarca, kertenkele, yılan
11. <i>Cryptosporidium ducismarci</i>	Sürüngeçler, özellikle kaplumbağa
12. <i>Cryptosporidium fragile</i>	Kurbağa
13. <i>Cryptosporidium suis</i>	Domuz, insan
14. <i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	Sığır, insan
15. <i>Cryptosporidium bovis</i>	Sığır, insan
16. <i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Tavşan, insan
17. <i>Cryptosporidium abrahamseni</i>	Balık
18. <i>Cryptosporidium bollandi</i>	Balık
19. <i>Cryptosporidium huwi</i>	Balık
20. <i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	Tavuk, Kemirgenler, insan
21. <i>Cryptosporidium proventriculi</i>	Kuşlar
22. <i>Cryptosporidium occultus</i>	Kemirgenler, insan
23. <i>Cryptosporidium ditrichi</i>	Kemirgenler, insan
24. <i>Cryptosporidium ratti</i>	Kemirgenler
25. <i>Cryptosporidium microti</i>	Kemirgenler
26. <i>Cryptosporidium alticolis</i>	Kemirgenler
27. <i>Cryptosporidium fayeri</i>	Keseliler, insan
28. <i>Cryptosporidium ornithophilus</i>	Kuşlar
29. <i>Cryptosporidium galli</i>	Kuşlar
30. <i>Cryptosporidium marcopodum</i>	Keseliler
31. <i>Cryptosporidium molnari</i>	Balık
32. <i>Cryptosporidium ryanae</i>	Sığır
33. <i>Cryptosporidium varanii</i>	Kertenkele
34. <i>Cryptosporidium viatorum</i>	İnsan
35. <i>Cryptosporidium scrofarum</i>	Domuz, insan
36. <i>Cryptosporidium erinacei</i>	Kirpi, at, insan
37. <i>Cryptosporidium homai</i>	Kemirgenler
38. <i>Cryptosporidium apodemi</i>	Kemirgenler
39. <i>Cryptosporidium proventriculi</i>	Kuşlar
40. <i>Cryptosporidium prolipferans</i>	Kuşlar
41. <i>Cryptosporidium rubei</i>	Kemirgenler
42. <i>Cryptosporidium wrairi</i>	Kemirgenler
43. <i>Cryptosporidium myocastoris</i>	Kemirgenler
44. <i>Cryptosporidium serpentis</i>	Yılan ve kertenkele



Şekil 1. 2021 yılında *Cryptosporidium* cinsinde tanımlanan *Cryptosporidium* türleri²¹

Memelileri enfekte eden *Cryptosporidium parvum* ookistlerinde bulunan sporozoitlerin çeşitli nükleik asit ve enzimlerini (18S rRNA, COWP, TRAP, gp60 ve hsp 70 gibi) kodlayan genlerin moleküler analizlerine göre konağa adapte olmuş 7 farklı genotipinin bulunduğu bildirilmiştir^{26,27,28}. Moleküler biyoloji çalışmaları sonucunda, insanda kriptosporidiyozdan sorumlu olan *Cryptosporidium parvum*'un iki farklı genotipinin olduğu, bunlardan insan genotipinin (genotip 1; genotip H; anthroponotik genotip) sadece insanlarda bulunduğu, sığır genotipinin (genotip 2; genotip C; zoonotik genotip) ise sığır, koyun, geyik, insanlar ve nadiren domuz ve farelerde enfeksiyona yol açabileceği saptanmıştır. Bu genotipler sonradan *Cryptosporidium hominis* (genotip 1, insan genotipi) ve *Cryptosporidium parvum* (genotip 2, sığır genotipi) adlarında iki farklı tür olarak tanımlanmıştır²⁹.

2.4. Epidemiyoloji

Düşük sayıda ookistin enfeksiyonu oluşturma yeteneğine sahip olması, hızla çoğalma yeteneği, ookistlerin uzun süre dış ortamda canlı kalması, ookistin çapının küçük olması ve çökme hızının az oluşundan dolayı su birikintilerinde uzun zaman yaşayabilmesi ve birçok dezenfaktana karşı dirençli olması, bazı genotipler için hayvanların rezervuar olması ve son olarak konağın bağışıklık sisteminin baskılanmış olması kriptosporidiyoz epidemiyolojisini belirleyen faktörlerdir^{30,31}.

Cryptosporidium paraziti, Antartika dışında, sıcak iklime sahip bölgelerde daha yaygın olmak üzere tüm dünyada bulunmaktadır. Enfeksiyonun mevsimsel özellik gösterdiği, sıcak ve nemli aylarda daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir. Enfeksiyonun Avrupa ve Amerika'da %1-3, gelişmekte olan ülkelerde ise %5-10 arasında olduğu bildirilmiştir³². Tanı yöntemlerindeki gelişmeler daha fazla olguya tanı konmasını sağlamış ve bu enfeksiyonun çok daha yaygın olduğu saptanmıştır. Az gelişmiş ülkelerde, özellikle 2 yaşın altındaki çocuklarda, beslenme bozukluğu olanlarda ve evcil hayvan besleyenlerde enfeksiyonun daha sık olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyona yakalanma riskinin bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde CD₄ sayısı ile doğru orantılı olduğu, enfeksiyon riskini çeşitli sosyal ve davranışsal faktörlerin de arttırdığı bildirilmiştir. Kriptosporidiyozun homoseksüellerde, HIV pozitif olgularda ve ilaç bağımlılarında sık görüldüğü bildirilmiştir^{33,34,35}. ABD'deki bir çalışmada, enfeksiyona HIV enfeksiyonunu cinsel yolla alanlarda diğer yolla alanlara göre daha fazla rastlanması seksüel davranış ile kriptosporidiyozun yakın ilişkisi olduğu anlaşılmıştır. Kaynatılmamış kuyu suyu da bulaşmadan sorumlu tutulmuştur. Elma şarabı ile ilişkili kriptosporidiyoz, kontamine inek otlaklarında yere düşmüş elmaların kullanılması ile ilişkili olduğu bulunmuştur^{36,39}.

Su ile ookist bulaşması, en önemli bulaşma yolu olarak düşünülmektedir ve en büyük salgınlar bu yol ile oluşmuştur. Su ile bulaşmanın olduğu ilk vakalar 1983'te St. Petersburg (daha sonra Leningrad), Rusya'ya seyahat eden ishali olan Finlandiyalı kişilerde tanımlanmıştır. İngiltere'deki salgınlar ile ilgili yapılan bir derlemede, 1992-2003 tarihleri arasında su kaynaklı 89 salgının %69'una *Cryptosporidium*'un neden olduğu bildirilmiş ve toplam 62 kriptosporidiyoz salgınının 21'inde belediye suyundan, 6'sında özel ambalajlı sulardan ve 32'sinin ise yüzme havuzundan kaynaklandığı saptanmıştır³⁸. Kriptosporidiyozun en büyük su kaynaklı salgını 1993'ün baharında Wilwaukee'de 403.000 kişinin *Cryptosporidium hominis* ile kontamine suyun içilmesi ile ortaya çıkarken, İngiltere'deki salgınlarda ise *Cryptosporidium parvum* ile kontamine içme sularının salgına neden olduğu bildirilmiştir^{10,39}.

Ülkemizin farklı bölgelerinde, küçük çocuklarda, hemodiyaliz, kronik böbrek yetmezliği olanlarda, böbrek transplantasyonlularda, çocuk onkoloji ve kemoterapi gören ishali kişilerde de *Cryptosporidium* araştırılmıştır ve farklı sayılarda bulunduğu bildirilmiştir^{40,41}.

Adana’da Çukurova Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 1-85 yaş arasındaki ishallerde yaptığımız önceki araştırmada, ELISA yöntemi ile 154 kişinin 37’sinde (%24) *Cryptosporidium* antijeni saptanmıştır⁴².

Kriptosporidiazun prevalans ve surveyansını etkileyen faktörleri beş ana başlık altında toplayabiliriz Bunlar:

Epidemiyolojik İndeksler:

- Yaş
- Cinsiyet
- Bağışıklık durumu
- Coğrafi dağılım
- Etnik köken

İnsan Aktiviteleri:

- Hijyen ve beslenme uygulamaları
- Kırsal ve kentsel düzenlemeler
- İnsan atıkları kontaminasyonu
- Hayvancılık sonucu oluşan kirlilik
- Su iyileştirme sistemlemleri
- Yemek hazırlama
- Seyahat
- Göç

Surveyans:

- Kontamine sular
- Uygunsuz gıda işleme
- Salgın kaynaklarını yanlış tanımlama
- Protozoon koenfeksiyonu

Çevresel ve sosyal faktörler:

- Çevre kirliliği
- Kıtlık ve yetersiz beslenme
- Susuzluk
- Coğrafya
- Uluslararası evlat edinme

- Doğal felaketler ve iklim değişimi
- Ağaçları yok etme
- Mevsimsel yağışlar

Klinik ve Tanı:

- Zayıf belirtiler
- Hafife alınan semptomlar
- Yetersiz tanı
- Gelişmiş moleküler araçların yokluğu⁴³

2.5. Morfoloji ve Evrim

Ookistler 4-6 µm çapında, kalın bir duvarla çevrilmiş içerisinde 4 sporozoit bulunan yapılardır. Sporokistleri yoktur. Sporozoitler, rhoptri, mikronem ve granüller içeren, konak hücreye invazyonu sağlayan apikal kompleks adı verilen bir organelle sahiptir. Hareketli sporozoitler, ince bağırsak epitel hücrelerinin yüzey reseptörlerine parazitlerin bazı bağları (gp 900, Cpg 40/15, cp 47 vs) ile bağlanmaktadır. Bağlanma sonrası parazitler aktin polimerizasyonuna neden olur ve ince bağırsak epitel hücre membranında bir çıkıntı meydana gelmektedir. Bu membran sporozoiti sarar ve epitel hücresinin mikrovillus tabakasında parazitofor vakuolü meydana getirmektedir⁴⁴.

Konak enterositleri içinde bulunan ookistlerin %80'i kalın duvarlı ve çift cidarlı iken, yaklaşık %20'si ince cidarlıdır. Ookist duvarı bir elektron lucent boşlukla birbirinden ayrılmış elektron yoğun tabakadan oluşmaktadır. Kalın duvarlı ookistlerin tip 1 ve tip 2 duvar şekillendirici cisimlere sahip olduğu, ince duvarlı ookistlerde ise bu cisimlerin bulunmadığı bildirilmiştir. Dış ortama dirençsiz, yalnızca tek bir zarla çevrili olan ince cidarlı ookistler oto-enfeksiyondan sorumludurlar³⁹.

Cryptosporidium türleri, aseksüel (şizogoni, merogoni) ve seksüel (gametogoni, sporogoni) döllenme şekillerinin değişimi ile karakterize yaşam döngüsünü tek bir konakta (monoksen) tamamlamaktadır⁴⁰.

Yaşam döngüsünde başlıca 6 gelişim evresi bulunmaktadır.

Ekskistasyon dönemi: Ağız yoluyla alınan kalın duvarlı sporlanmış ookistlerin çeperlerinin ince bağırsakta safra tuzları ve pankreatik enzimlerin yardımıyla parçalanması (ekskistasyon) sonucunda sporozoitler serbest kalmakta ve bağırsak boşluğuna dökülmektedirler^{1,45} (Şekil 2)⁴⁶.



Şekil 2. Ookistlerin parçalanmasıyla serbest kalan enfektif sporozoitler⁴⁶

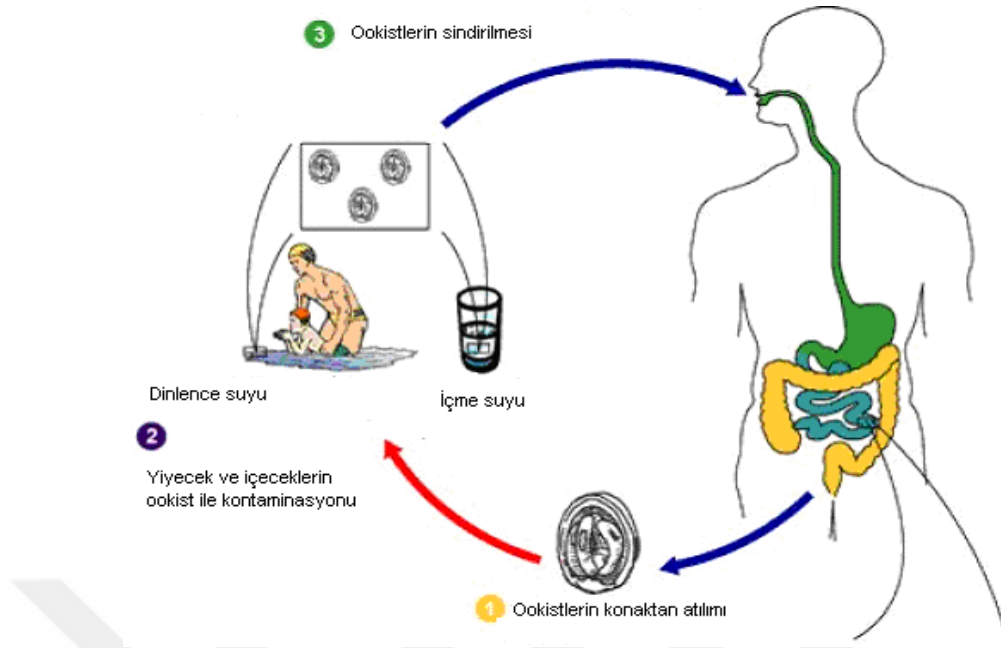
Merogoni Dönemi: Serbest kalan sporozoitler konağın epitel hücreleri (enterosit) içine girmektedirler. Bu hücrelerin mikrovillus bölgesinde parazitofor vakuoller içinde trofozoitlere (tek nukleuslu merontlara) dönüşmekte ve daha sonra eşeysiz olarak (merogoni) çoğalarak Tip 1 merontları oluşturmaktadırlar. Bunlardan meydana gelen merozoitler yeni hücrelere girerek tekrar eşeysiz çoğalma ile Tip 1 merontları (Tip 1 meront döngüsü) veya Tip 2 merontları oluşturmaktadırlar^{1,47}.

Gametogoni Dönemi: Tip 2 merontlardan meydana gelen merozoitler ise yeni bir döngü oluşturmamakta, ancak konak içinde yeni hücrelere girdiklerinde eşey hücrelerine yani mikro ve makrogamontlara dönüşmektedirler^{1,47}.

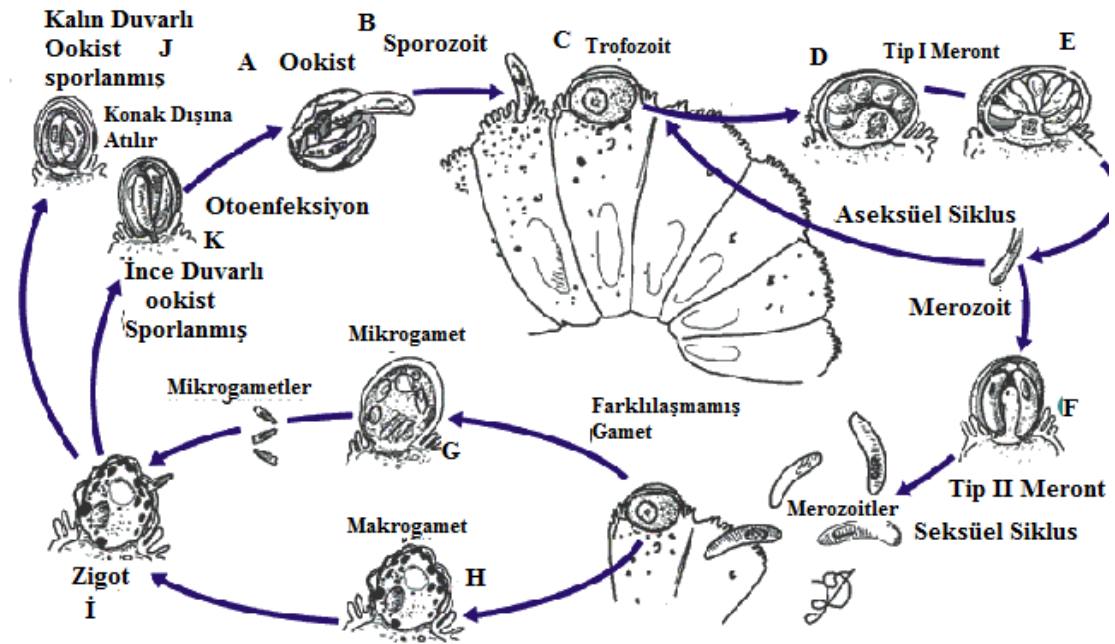
Döllenme Dönemi: Kamçısız fakat hareketli mikrogamont makrogamontu döller ve sonucunda zigot meydana gelmektedir^{1,47}.

Ookist Dönemi: Zigot duvarının kalınlaşmasıyla parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayacak olan, dış çevre koşullarına dayanıklı ookist meydana gelmektedir^{1,47}.

Sporogoni Dönemi: Ookist içinde sporlanma yoluyla enfektif sporozoitler meydana gelmektedir^{1,48,49}.



Şekil 3. *Cryptosporidium* spp.'nin yaşam döngüsü⁴⁵



Şekil 4. *Cryptosporidium*'un evrimi ve evrim şekilleri⁴⁵

Cryptosporidium ookistleri konak hücreleri içinde iken sporogoni geçirmekte, bağırsak boşluğuna döküldüklerinde enfektif hale gelmektedirler. Diğer koksidian parazitlerden *Cyclospora*, *Toxoplasma* ve *Isospora* türlerinin ookistleri ise konağı dışında dış ortamda oksijenle temas edene kadar sporlanmamaktadırlar¹⁵.

Cryptosporidium spp.nin eşeyli üremesiyle kalın ve ince olmak üzere 2 farklı tip ookist oluşumu gözlenir. Kalın duvarlı ookistler dış koşullara dayanıklıdır ve dışkıyla atılarak diğer konaklara enfeksiyonu bulaştırırken, ince duvarlı olanlar, konak hücreden ayrılmalarından hemen sonra içlerindeki sporozoitler serbest hale gelip, diğer enterositlere girerler ve yeni bir yaşam döngüsünü başlatmaktadırlar. Bu otoinfektif ookistlerin ve Tip 1 merontların az sayıda ookistle enfekte olan kişilerde, şiddetli enfeksiyonların gelişiminden sorumlu oldukları, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise etken dışardan yeniden alınmasa da uzun süren ve hastanın yaşamını tehlikeye düşürebilen tabloların ortaya çıkmasına neden olabilecekleri düşünülmektedir⁴⁹.

2.6. Hastalığın Bulaşması Ve Bulaş Yolları

Fecal oral yolla bulaşan *Cryptosporidium* enfeksiyonunun ortaya çıkması için ookistlerin, enfekte insan, hayvan ya da kontamine yüzeylerle yakın temasta, su ve yiyeceklerle, olası hava yoluyla, toprak ve taşıyıcı konaklarla, indirekt yolla ve seksüel yolla alınması gerekmektedir. Parazitin enfeksiyona yol açma gücü oldukça yüksek olup sağlıklı kişilerde 30 ookistin enfeksiyona neden olabildiği gösterilmiştir⁶.

Özellikle çocuklarda sık görülen insandan insana direkt bulaş, kriptosporidiyozun zorunlu zoonotik bir enfeksiyon olmadığını göstermektedir. Kreşlerde ve hastanelerde ortaya çıkan salgınlar insandan insana (anthroponotik) direkt bulaşın göstergesidir^{50,51}.

Bulaş yolları göz önüne alındığında toplu yaşanan yerlerde veya aile içinde enfekte kişilerle yakın temasta bulunmak, endemik bölgeye seyahat etmek, mesleki (çiftçiler, veterinerler, evcil hayvan besleyenler) nedenlerle hayvanlarla yakın temasta bulunmak; konjenital immun yetmezlik, HIV enfeksiyonu, organ nakli, immunosupresif ilaç kullanımı gibi nedenlerle bağışıklık sistemi baskılanması, kötü hijyen ve beslenme koşulları, suların yetersiz filtrasyonu bu enfeksiyon için risk faktörlerini oluşturmaktadırlar^{50,51,52}.

2.7. Parazitin Yerleştiği Organlar Ve Konak Parazit İlişkisi

Bağışıklık sistemi sağlam olan konaklarda *Cryptosporidium*'un sıklıkla terminal jejunum ve ileumda, bağışıklık sistemi baskılanmış olan konaklarda ise akciğerler,

özofagus, mide, duodenum, kolon, safra ve pankreatik kanallar, uterus, konjunktiva, orta kulak ve solunum sisteminde yerleşerek enfeksiyona neden olabileceği bildirilmiştir^{53,54}.

Sporozoitin apikal bölgesinde bulunan parazit organelleri invazyonda rol oynamaktadırlar. Parazite ait bir protein olan ‘CP47’ sporozoit/konak hücre tutunmasında önemli rol oynamaktadır. Bu protein, insan ve hayvan ileal hücrelerin yüzeyine önemli bir bağlanma afinitesi göstermektedir (*Cryptosporidium* spp. diğer hücre içi parazitlerden farklı olarak hücre içi ancak sitoplazma dışında yerleşmektedir^{53,55}.

2.8. Patojenite

Parazitin enfektivitesi ve konağın immun cevabı patofizyolojide rol oynamaktadır. *Cryptosporidium* yüzeyel epitel hücrelerde yerleştiği için minimal invaziv mukozal patojen olarak kabul edilmektedir. Safra kesesine yerleşirse tıkanma, kolenjit veya kolesistit gelişebilmektedir. Kript ve villöz yapıda histolojik bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Villöz atrofi, kript hiperplazisi ve genellikle lamina propriada inflamatuvar hücre birikimi görülmektedir. *Cryptosporidium* enfeksiyonunda görülen ishale üç ana mekanizmanın neden olduğu bilinmektedir. Bunlar:

1. Direkt sitotoksik etkiyle intestinal yapının tahribatı.
2. Konak immun cevabının bir parçası olarak, inflamatuvar metabolit ve hormonların salınımı.
3. Parazitin enterotoksik özellik göstermesi.

Enterotoksin saflaştırılmamış olmakla beraber, toksinin absorpsiyon, sekresyon ve epitelyal permeabilite bozukluğuna yol açabildiği ileri sürülmüştür. Hayvan modellerinde *Cryptosporidium* enfeksiyonunun klor sekresyonunda artışa, sodyum ve glukoz malabsorpsiyonuna yol açtığı gözlenmiştir^{56,57}.

Proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL1- β) mukozal epitelyal bütünlüğü direkt olarak değiştiren, bariyer fonksiyonunu bozan faktörlerdir. Kronik kriptosporidyozu olan AIDS’li hastaların biyopsi örneklerinde proinflamatuvar sitokinler gösterilmiştir. Hayvan modellerinde TNF- α ’nın diyarenin major mediatörü olduğu gösterilmiş ancak insanlarda semptomlarla tam olarak ilişkisi kurulamamıştır⁵⁷.

Cryptosporidium'un kompleks bir virulans kapasitesi olduğu bilinmektedir. Epitel hücrelerine tutunarak, enfekte olmayan komşu hücrelerde apoptozis yoluyla epitel hücrelerinin absorpsiyon ve sekresyon özelliklerini bozduğu ileri sürülmektedir. AIDS'li hastalarda sinerjistik bir patolojik etkinin ortaya çıktığı düşünülmektedir. HIV-1 virüsüyle enfekte T hücre ve makrofajlardan salınan HIV-1 tat proteininin *Cryptosporidium* ile ilişkili apoptozisi indüklediği gösterilmiştir⁵⁸.

2.9. İmmünite

Kriptosporidyoza karşı konakta meydana gelen immün yanıt, parazitin patofizyolojisinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. Kriptosporidyozun gelişimi, konağın bağışıklık durumuyla yakından ilişkilidir. Son yıllarda birçok çalışma, enfeksiyonun akut fazının kontrolü için sorumlu bağışıklık mekanizmaları hakkındaki bilimizi geliştirmekte ve doğuştan gelen bağışıklığın önemini vurgulamaktadır⁵⁹.

Cryptosporidium'a karşı olan bağışık yanıt hakkında bilinenlerin çoğu, fareler üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarıdır. Bu çalışmalarda enfeksiyonun önlenmesinde veya iyileşmesinde CD4 T lenfositleri ve gamma interferonun (IFN-gamma) önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. (Borad A and Ward H 2010). HIV ile enfekte olan hastalarda akut sınırlı enfeksiyona sahip olanlarda CD4 sayısı >180 hücre/mm³, kronik enfeksiyonda <100 hücre/mm³, fulminant enfeksiyonlarda ise <50 hücre/mm³ olduğu bildirilmiştir^{30,60}.

Sitokinlerden interlökin 5 (IL-5) ve interlökin 12'nin (IL-12) azalmasının enfeksiyonun şiddetlenmesine neden olduğu, IL-2 ve IL-4'ün ise enfeksiyonun üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir⁶⁰.

Kriptosporidyoza doğal immün cevapta enterositler aktive olur, proinflamatuvar sitokinler ve defensinler gibi antimikrobiyal peptidier oluşmaktadır. Doğal immün cevap, başlangıçta parazit sayısını kısıtlasa da enfeksiyonun tam olarak temizlenmesinde T hücre cevabı gerekmektedir. Özellikle CD4+T lenfositleri, özelleşmiş hücre yüzey proteinleri (MHC sınıf II, CD40-CD154) *Cryptosporidium*'a karşı koruyucu immunitede önemlidir^{61,62}.

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde *Cryptosporidium*'un 27 kDa'luk antijenine karşı güçlü bir serolojik cevap olduğunda diyare ve kilo kaybı riskinde azalma

gözlenmiştir. Su kaynaklı bulaşlarda az sayıda ookist alan kişilerde oluşan serolojik yanıt daha güçlüdür⁶³.

HIV(+) olan kişilerde akut kriptosporidiyoz sırasında IgM (İmmunoglobulin M), kronik enfeksiyonlarda IgG (İmmunoglobulin G) türü antikorlar oluşsa da immünolojik korunmada özgül antikor cevabının rolü fazla değildir. Serum ve/veya mukozal IgG, IgM ve IgA (İmmunoglobulin A) antikorları olan AIDS'li hastalarda persistan kriptosporidiyoz gözlenmiştir^{64,65}.

Sonuç olarak, akut ve kronik kriptosporidiyoz kontrolünde özellikle CD4 lenfositlere bağımlı sistemik hücrel bağışıklığın önemli olduğu, humoral bağışık yanıtın ise kriptosporidiyozdan korunmada rol oynadığı bildirilmektedir⁶⁶.

2.10. Tanı

Cryptosporidium, biyogüvenlik düzeyi 2 gerektiren ve Grup D bildirimi zorunlu enfeksiyon etkenlerinden biridir. Pozitif saptandığı takdirde ilgili haftalık olarak İlçe Grup Başkanlıkları veya İl Sağlık Müdürlüğü'ne bildirilmesi gerekir. 2004 yılında yayınlanan Bulaşıcı Hastalıkların Bildirim Sistemi'ne göre *Cryptosporidium* tanısı için geçerli laboratuvar testleri dışkı, duodenal sıvıda aside dirençli boyama veya direkt floresan antikor (DFA) yöntemi ile ookistlerinin gösterilmesi, duodenal biyopside *Cryptosporidium* gösterilmesi veya dışkıda özgül immünotanısals yöntemlerle antijen varlığının saptanmasıdır. Sağlık Bakanlığı'nın Bulaşıcı Hastalıkların Bildirim Sistemi'ne göre kriptosporidiyozun kesin tanısı, geçerli laboratuvar testlerinin en az birinden pozitif sonuç alınması halinde konulabilmektedir⁶⁷.

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium*'un saptanabilmesi örneğin kalitesi, laboratuvara gönderilme koşulları ve gönderilme zamanı ile doğrudan ilişkilidir. Parazitolojik inceleme için örnek alınmadan önce hastaya herhangi bir nedenle mineral yağ, baryum veya bizmut verilmemiş olmalıdır. Antibiyotik, antidiyareik, antiasid, baryum sülfat veya bizmut gibi ilaçlar parazitlerin saptanmasını engelleyebilir. Bu nedenle bu ilaçların örnek alımından en az bir hafta önce bırakılmış olması veya ilaçların alınmasının bir hafta sonraya ertelenmesi gerekmektedir^{67,68,69}.

Örnekler laboratuvara gönderilirken temiz, ağız sızdırmaz kapaklı kaplara konulmaları gerekmektedir. Laboratuvara gönderilecek örnek 30 dakika içinde incelenmeyecekse iki ayrı kaba ayrılmalıdır. Dışkı örneklerinde bu kaplardan birine

koruyucu koymadan, diğerine %10'luk formalin eklenerek laboratuvara gönderilmelidir. Transport sırasında koruyucu içermeyen örnekler <30 dakika oda ısısında bekleyebilirken, şehirlerarası transportlarda örneğin üçlü paketleme ile soğuk zincirde en geç 24 saatte gönderilmesi gerekmektedir. Koruyucu içermeyen örnekler buzdolabında 24 saat muhafaza edilebilir. İmmünotanısai testlerde kullanılacak örnekler 4°C'de saklanabilir. Daha uzun süreli saklamalarda ise örnekler -20°C'de muhafaza edilmelidir⁶⁷.

2.10.1. Kriptosporidiyoz Olgularında Klinik Tanı

Kriptosporidiyoz, intestinal, respiratuar, hepatobilier ve pankreatik olmak üzere 4 farklı klinik tablo ile karşımıza çıkabilmektedir⁷⁰.

2.10.1.1. İntestinal Kriptosporidiyoz

Dört farklı klinik tablo görülebilmektedir. Bunlar:

Aseptomatik Taşıyıcılar: Salgınlardaki bulaştan sorumlu olan bu klinik tablodaki olgularda hiçbir klinik belirti gözlenmemektedir. Aseptomatik taşıyıcılık oranı, HIV pozitif olgularda normal toplumlardan daha yüksektir⁷¹.

Akut Sınırlı Enfeksiyon: Bağışıklık sistemi sağlam kişilerde daha yaygın görülen klinik bir tablodur. Kuluçka dönemi ortalama 6 gün (2-30 gün) olarak bilinmektedir. En sık görülen belirti, bol ve sulu, mukuslu, nadiren kanın da bulunabildiği ishaldir ve hızlı kilo kaybı ve dehidratasyona da neden olabilmektedir. Karında kramp şeklinde ağrı, anoreksia, ılımlı ateş (<39°C), bulantı, kusma, başağrısı, halsizlik, orta dereceli malabsorbsiyon en çok gözlenen belirtilerdir. Klinik belirtiler birkaç gün ile birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebilmektedir. Ayrıca enfeksiyonun uzun dönem etkilerinde örneğin yetersiz beslenme, büyüme ve kavrama eksikliği tanımlanmıştır. CD₄ sayısı 200/mm³'den fazla olan HIV pozitif olgularda bu klinik şekil gözlenebilmektedir^{70,72}.

Kronik Enfeksiyon: Malnütrisyonlu çocuklarda ve HIV(+) olguları başta olmak üzere, bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda görülen klinik bir tablodur. Dirençli ishal, kilo kaybı ve malnütrisyon görülmektedir⁷⁰.

Fulminant Enfeksiyon: HIV’li hastalarda ve kemoterapi tedavisi ile bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde görülmektedir. Kolera benzeri klinik tablo oluşturmakta ve çok yüksek mortalite ile karakterize olmaktadır. Tedavide öncelikle sıvı elektrolit dengesinin sağlanması önerilmektedir⁷⁰.

2.10.1.2. Respiratuar Kriptosporidiyoz

Özellikle çocuklarda görülen bir enfeksiyondur ve genellikle olguların çoğunda ishal görülmektedir. Ayrıca bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülen bu klinik tablo, solunum sistemini tutarak laringotrakeit, sinüzit, nonspesifik belirtiler, şiddetli, dirençli öksürük, krup, wheezing, ses kısıklığı, ateş, trakeal sekresyon ve solunum güçlüğü ile karakterizedir. Bu bireylerde öldürücü solunum sistemi tabloları görülebilmektedir^{70,72}.

2.10.1.3. Hepatobiliyer Kriptosporidiyoz

Genellikle HIV’li ve kronik kriptosporidiyozlu hastalarda gelişen safra kesesi ve safra yolları epitelinin tutulumu, taşsız kolesistit veya sklerozon kolenjit tablosuyla ortaya çıkmaktadır. En sık gözlenen belirtiler ateş, sağ üst kadranda ağrı ve duyarlılık, bulantı, kusma, nadiren ishal ve sarılıktır⁷⁰.

2.10.1.4. Pankreatik Kriptosporidiyoz

Pankreatik kanalların kolonizasyonu ile gelişen ve genellikle HIV’li hastalar başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde pankreas yollarını tutarak karın ağrısı, asit amilaz yüksekliği ve pankreasta büyümeye neden olabilmektedir⁷⁰.

2.10.2. Kriptosporidiyoz Olgularında Laboratuvar Tanı

Cryptosporidium dışkı, balgam, duodenum sıvısı, safra ve bağırsak biyopsi örneklerinde çeşitli yöntemlerden faydalanılarak araştırılmaktadır. Bunlar, doğrudan preparat inceleme, boyama yöntemleri, konsantrasyon yöntemleri, serolojik tanı yöntemleri, kültür, flow sitometri, ve moleküler tanı yöntemleridir. Materyaller ya taze

olarak ya da %10 formol, poluviynil alkol veya sodyum asetat-asetik asitformol (SAF) içinde tespit edildikten sonra incelenmektedir. Tespit sonrası inceleme, laboratuvar enfeksiyonu riskini azaltması nedeni ile genellikle tercih edilmektedir^{73,74}.

2.10.2.1. Doğrudan Preparat İnceleme

Lam-lamel arasında hazırlanmış doğrudan dışkı preparatlarında ookistler mikroskop ile aranabilmektedir; ancak ayırt etmek oldukça zordur⁷⁵.

2.10.2.2. Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi

Cryptosporidium ookistleri çok küçük olduğu için dışkı yoğunluğunda onları bulmak oldukça zordur, tecrübe gerektirir. Bu işi kolaylaştırmak ve sorunun üstesinden gelebilmek için farklı boyama yöntemleri önerilmektedir. Ookistlerin membranında lipid miktarının çok olması onların aside dirençli boyalarla boyanmasına olanak sağlamaktadır. Modifiye asit-fast boyama yöntemi, düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, özel mikroskoba gerek duyulmaması ve aynı preparatta *Isospora* ve *Cyclospora* gibi diğer patojenlerin araştırılmasına olanak vermesi nedeni ile en sık kullanılan yöntemdir. Sıcak ve soğuk yöntemlerle uygulanabilmektedir. Boyalı preparatlarda ookistler, mavi veya yeşil zeminde parlak kırmızı, pembe renkte görünürken mayalar mavi veya yeşil renkte görünmektedirler. Alternatif olarak safran-metilen mavisi boyama tekniği ile ookistler turuncu renkte boyanmakta ve modifiye asit-fast boyama yerine kullanılabilmektedir^{11,76,77}.

2.10.2.3. Konsantrasyon Yöntemleri

Dışkı yolu ile yayılan *Cryptosporidium* ookistleri, dış ortamda uzun süre canlı kalabilmekte ve içme suyu kaynaklarının kontaminasyonuna neden olmaktadır. Dışkı konsantrasyon yöntemleri, dışkıda az sayıda parazit olduğunda uygulanan yöntemlerdir ve yüzdürme ve çöktürme olmak üzere iki türlü yapılmaktadır. Yüzdürme yöntemleri, Sheather'in şeker solüsyonu, çinko sülfat ve doyurulmuş tuzlu su ile yapılmaktadır. Çöktürme yöntemleri ise formol ether ve formalin-ethyl acetate teknikleridir⁷³. Ayrıca çöktürme yöntemlerinden biri olan Feconomics yöntemi, çok yeni olup oldukça pratiktir ve çok daha kısa sürede parazitin kist, ookist, yumurta ve larva formlarının

saptanmasında kullanılır. Bu yöntem ile diğer yoğunlaştırma yöntemlerinden farklı olarak bazı parazitlerin trofozoit şekillerinin de saptandığı görülmüştür⁷⁸.

2.10.2.4. Serolojik Tanı Yöntemleri

Mikroskopik tanı yöntemlerinin duyarlılık ve güvenilirliği örneği inceleyen kişinin bilgi ve tecrübesine bağlıdır. Bu problemin çözülmesi için enzimlerin kullanıldığı serolojik tanı yöntemleri olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), DFA (Direkt Floresan Antikor), IFA (Immunofloresan antikor) ve hızlı tanı testleri uygulanmaktadır⁴⁶.

2.10.2.4.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Antijen antikor reaksiyonlarını göstermek için enzimlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Dışkıda *Cryptosporidium* antijenlerini saptamaya yönelik monoklonal antikorlarla kaplı plakların kullanıldığı ELISA kitleri üretici firmaların talimatları ile taze, dondurulmuş veya fıkse edilmiş prezerve dışkı örneklerinde uygulanabilmesi açısından tercih edilebilmektedir. Testin sonucunda, ookist varlığında oluşan enzim-antikor- antijen kompleksine bağlı renk oluşumu tespit edilmektedir⁷⁹.

2.10.2.4.2. DFA (Direkt Floresan Antikor)

Dışkı örneklerindeki organizmaların yüzeyindeki antijenlerin immünolojik olarak saptanmasında kullanılan monoklonal antikor temeline dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemde, şüpheli materyaldeki antijenler lam üzerine yayılarak tespit edilmektedir ve antijenin üzerine özel işaretli antikorlar konulmaktadır. Şüpheli antijenlerin işaretli özel antikorların oluşmasına neden olmuş olan antijenler olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu yöntemde, konsantre veya konsantre olmayan dışkı örneklerinde fluorescein isothiocyanate (FITC) bağlı ‘monoklonal antikorlar’ kullanılarak ookistler tanımlanmaktadır⁴⁶.

2.10.2.4.3. IFA (İndirekt Floresan Antikor)

Bu yöntemde tanıda en sık kullanılan floresan boyalar, auramine, auramine-rhodamine ve acridine orange boyalardır. IFA yöntemi, *Cryptosporidium* ookisti aranmasında oldukça sık başvuru alan ve asit-fat boyama yönteminden daha duyarlı ve

özgöl bir tekniktir. Immüofloresan mikroskobisinde ookistler karanlık zeminde parlak elma yeşili renginde görülürler. Ticari IFA kitleri kullanılan monoklonal antikorların hemen hemen tüm *Cryptosporidium* türlerine ait ookistler ile reaksiyon vermesi nedeni ile tür düzeyinde tanımlama yapamamaktadır^{33,80}.

2.10.2.4.4. Hızlı Immunokromatografik Yöntem

Bu yöntem ile kombine antijen taraması yapılabilmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajı, kısa test süresine sahip olması ve aynı reaksiyonda birden fazla parazit için sonuç vermesidir⁴⁶.

2.10.2.5. Kültür

Cryptosporidium'un konak hücre ortamındaki gelişimi ilk olarak 2004 yılında tanımlanmıştır. Bu da *Cryptosporidium* araştırmalarında birçok görüşü kolaylaştırabilecek önemli bir adım olmuştur. Mevcut konak hücre kültürlerinde parazitin tüm evrim dönemlerini görmek mümkündür; ancak çok küçük boyutlarda olduğu için yapısının tanımlanması zordur. Kültürler, 37°C'de ve %5'lik karbondioksitli ortamda inkübasyona bırakılmaktadır ve 48 veya 72 saat sonra alınmaktadır. Çeşitli floresan boyama yöntemleri işlemlerinde 37°C'de 6 gün inkübe edilmektedir. *Cryptosporidium*'un gelişim safhalarının tamamı tavuk embriyosunda izlenmiştir ve kültürde üretildiği bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar paraziti RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) temelli besiyerinde üretmişler fakat kültür hücrelerindeki *Cryptosporidium*'un gelişimi sırasında mikrobiyal kontaminantların yüksek sayıda olduğu görülmüştür. Bundan dolayı bu tekniğin laboratuvarlarda uygulanabilirliği tartışmalıdır^{81,82}.

2.10.2.6. Flow Sitometri Yöntemi

Akım sitometrisi, süspansiyon halinde olan materyalin içindeki monoklonal antikorlarla boyanmış ookistlerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilirken canlılıklarının belirlendiği, sayımlarının yapıldığı ve tedavinin değerlendirilebildiği önemli bir yöntemdir⁸³.

2.10.2.7. Moleküler Tanı Yöntemleri

Tanıda moleküler yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sık kullanılmakta olup, parazit genetik materyalinin çok küçük miktarı kullanılarak, araştırılacak gen bölgesinin çoğaltılmasını sağlayarak büyük çaplı epidemiyolojik çalışmaların yapılmasını kolaylaştırmıştır. PZR yöntemi dışkıdan başka doku ve safra örneklerinde de çalışılabilmektedir ve tanıda duyarlılığın artmasıyla birlikte parazitin türlerinin ve genotiplerinin belirlenmesine önemli katkıda bulunmaktadır. PZR yönteminde hedef gen bölgeleri olarak ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge (18S SSU rRNA) geni, ookist hücre duvar proteini (COWP), trombospondin ilişkili adezin proteinleri 1 ve 2 ve 60 kDa glikoprotein yer almaktadır^{11,84}. Bu bölgelerden en fazla kullanılanı 18S SSU rRNA dizisi olup birçok *Cryptosporidium* türü için kapsamlı bir dizi verisine sahip olmasının yanında beş kopya halinde bulunması da çok fazla yarar sağlamaktadır⁸⁵.

Kriptosporidiyoz tanısı için çeşitli PZR teknikleri uygulanmıştır. Bunlar; moleküler biyolojide kullanılan nükleik asit tabanlı tekniklerden DNA (Deoksiribonükleik asit)'yi tespit etmede standart polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), multipleks PZR, nested PZR, in situ PZR, arbitrary-primed PZR (AP-PZR), reverse line blotting (RLB), real time PZR (qPZR), polimeraz zincir reaksiyonu- restriction fragment length polymorphism (PZR-RFLP), Loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP) ve southern blotting gibi teknikler kullanılmaktadır. RNA (Ribonükleik asit) 'yi tespit etmede ise reverse transkriptaz PZR (RT-PZR) ve northern blotting gibi teknikler kullanılmaktadır^{11,86}. Kriptosporidiyoz tanısında bizim kullandığımız PZR yöntemleri şunlardır:

2.10.2.7.1. Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir. Bir PZR döngüsü, DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elangasyon) olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. PZR reaksiyonu, araştırılacak örnekteki DNA'nın çift zincirli yapısı

yüksek ısı (94-97°C 15-60 sn) yardımıyla birbirinden ayrılırlar (denatürasyon). Daha sonra düşük ısılarda (50-65°C 30-60 sn) sentetik oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanırlar (annealing/hibridizasyon). Isı 72°C'ye arttırılarak DNA polimeraz enziminin DNA zincirini uzatması sağlanmaktadır (elagasyon/uzama). Sentezlenen DNA ürününün saptanması, kopyaları çıkarılan primerler arasında kalan belli baz çifti büyüklüğündeki bölgenin jel üzerinde veya amplifikasyon yapılan bölgeye uygun tamamlayıcı prob ile hibridizasyon sonrası belirlenmesi ile gerçekleşmektedir^{87,88}.

2.10.2.7.2. Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR (qPZR)

PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve moniterize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Yöntemin biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, tek nokta mutasyonlarını, patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP (single nükleotid polymorphism) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda kullanım alanları bulunmaktadır^{89,90}.

Real time PZR yöntemini daha önceden geliştirilmiş olan standart PZR yönteminden ayıran iki önemli özellik vardır. Birincisi, real-time PZR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin kullanılmasıdır. İkincisi ise, PZR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtacak bir probun veya problemlerin bulunması gereğidir. Bu nedenle özellikle uygun prob seçimi, real-time PZR işleminin verimliliğini etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Prob, cihaz içerisinde gerçekleştirilmiş olan çoğaltma işlemini gözle görünür hale getirmekle görevlidir. Prob kullanılmadan da PZR işlemi gerçekleşir; ancak sonucun real-time PZR cihazının bilgisayarında görüntülenmesi mümkün değildir. Problemler, florofofor denem ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında floresan ışığa yayılabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotidlerdir. Prob dizileri, PZR tüpü içerisinde çoğaltma işlemi gerçekleşirken, çoğaltılmış olan hedef DNA zincirlerine bağlanarak floresan ışığa oluşmasına neden olurlar. Bu işlemin gerçekleşebilmesi için problemler hedef DNA'nın belirli bir dizisine komplementer olacak şekilde dizayn edilmelidirler. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green 1 veya etidyum bromid boyaları, DNA parçasının

çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli problar kullanılır. Bu tekniklerin başında TaqMan prob, molecular beacon (moleküler boncuk) ve fluorescence resonance energy transfer (FRET) gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılanlar gelmektedir^{90,91}.

SYBR Green: Çift zincirli DNA'ya özgül olmadan bağlanan özel boyalardır ve prob görevi görürler. Bu boyaların çift zincirli DNA arasına girerek bağlanması sonucunda 20-100 katlık bir floresan ışıma artışı olur ve bu ışıma real time PZR cihazı tarafından algılanmaktadır. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR green miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenmektedir. Yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan veren bir boyadır. Ancak floresan artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü ortamda hedef DNA bulunmadığı durumlarda SYBR green, primerlerin kendi aralarında gerçekleşebilecek bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda bu yapılara katılarak floresan oluşumuna neden olabilmektedir. Böyle durumlarda elde edilen floresan ışımanın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için 'melting curve' (erime eğrisi) analizi yapılır^{89,92,92,93}.

Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi: Her çift sarmal DNA, kendine özgü 'melting temperature, T_m' (çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR döngüleri sırasında annealing aşamasında primerlerle beraber prob da bağlanır. Bu aşamada prob yan yana geldikleri ve enerji transferi gerçekleştiğinden dolayı floresans miktarı artar. PZR döngüleri bittikten sonra erime eğrisi analizi yapılarak sonuçlar belirlenir. Erime eğrisi analizinde, PZR döngülerinden sonra sıcaklık 0,2°C aralıklarla arttırılır. Hibridizasyon problemleri erime sıcaklıklarına (T_m) geldiklerinde bağlı oldukları DNA dizisinden koparlar. Birbirleri üzerindeki enerji transferi ortadan kalktığı için floresans ışıma miktarı azalır. Eğer DNA dizisinde herhangi bir mutasyon varsa prob ve DNA bire bir örtüşmediği için probun erime sıcaklığı daha düşük olacaktır. Mutasyon olmayan dizi ile prob bire bir örtüşerek

bağlandığı için probun erimesi ve DNA dizisinden ayrılması daha zor olacaktır ve erime sıcaklığı daha yüksek olacaktır^{93,94,95}.

Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) Problemleri: Özgül problemlerden biri 3' ucundan floresan boya ile işaretli donör boya, diğeri 5' ucundan alıcı boya ile işaretlidir. Bu tür problemlere dual hibridizasyon problemleri adı verilir ve uzunlukları 30 nükleotide kadar olabilir. FRET problemleri verici florofordan, alıcı florofora enerji transferine dayalıdır⁹⁶. FRET için temel prensipler:

- Verici ve alıcı moleküller yakın olmalıdır.
- Alıcı absorpsiyon spektrumunu, vericinin yayılım spektrumunu ile örtüşmelidir.
- Verici ve alıcı dipol geçişleri hemen hemen paralel olmalıdır.

Lineer hibridizasyon problemleri kullanılarak real-time PZR ile amplifikasyonun saptanması, direkt hibridizasyon esasına dayanır. Bağlanma sonrasında ikinci probun 5' ucundan sentez olmaması için bu uca bir fosfat bağlanmıştır. Problemler hedef bölge üzerinde birbirine yakın yere (1-5 nükleotid uzaklıkta) bağlanmaktadır ve işaretli uçlar yanyana gelmiş olmaktadır. İki boyanın yanyana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan floresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine (PZR ile oluşan ürün miktarına) bağlı olarak artmaktadır. Her PZR döngüsünün düşük sıcaklık basamaklarında prob hedef DNA'ya bağlanarak ışımaya sağlamakta ve yüksek sıcaklık basamaklarında hedeften ayrılmaktadır. Her döngüde problemlerin bağlanabileceği hedef DNA miktarı arttığı için sinyal miktarı da artmaktadır^{93,94,96}.

TaqMan Problemleri (5' ekzonükleaz aktivitesi): Bu sistemde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli TaqMan problemleri kullanılmaktadır ('dual labelled probe'). Probun 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunur. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır. Prob ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom bölgenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya

geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlamaktadır. Böylece raportör florokrom serbest hale geçerek sinyal oluşturmaktadır. Her döngüde üretilen ürün arttıkça floresan miktarında artış gözlenmektedir. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken nokta, ısımanın probun DNA'ya bağlanmasıyla oluşmadığı, probun kırılarak ayrılmasını sağlayan 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile oluştuğudur. Bu nedenle bu tür problemlere hidroliz problemleri adı verilir⁹⁴.

Gerek hibridizasyon problemleri kullanıldığında, gerekse hidroliz problemleri kullanıldığında, her PZR döngüsünde oluşan floresan ısıma miktarı artmaktadır. Ancak floresan sinyali oluşumu, hibridizasyon problemlerinde hedef DNA'ya bağlanma sonucunda oluşurken hidroliz problemlerinde hedef DNA'dan ayrılma sonucunda oluşmaktadır. Hibridizasyon problemleri özellikle mutasyonların saptanmasına yönelik erime eğrisi analizi için uygunken, hidroliz problemleri erime eğrisi analizinde kullanılamazlar⁹⁴.

Moleküler Beacon (Boncuk) (İkaz ışığı, bıkın): TaqMan problemlerinden geliştirilmiştir. Bu nedenle kimyasal yapısı, 5' ve 3' uçlarında raportör ve baskılayıcı florokrom bulunması nedeniyle 5'nükleaz aktivitesinde kullanılan problemlere benzemektedir. Ancak saptama aşaması, probun kırılmasıyla ısımanın oluşması esasına dayanmaz. Bu yapılar 5' ve 3' uçları bir fırketenin iki ucunu oluşturacak şekilde, bükülmüş bir yapıda dizayn edilmişlerdir. Raportör ve baskılayıcı moleküllerin komşuluğunda birbirine komplementer diziler vardır. Moleküler boncuk yapısının komplementer olduğu hedef DNA'ya tam olarak bağlanabilmesi için bu yapının doğrusal olarak açılması ve bu şekilde bağlanması gerekmektedir. Bu açılarak bağlanma sonucunda iki florokrom birbirinden uzaklaşır ve baskılayıcı etki ortadan kalktığı için prob floresan sinyali vermeye başlamaktadır⁹⁷.

2.11. Tedavi

Kriptosporidiyoz tedavisinde en önemli şey komponent destekleyici tedavidir. Oral dehidratasyon tedavisi önerilebilir; fakat ciddi hastalıkta parenteral tedaviye ihtiyaç duyulur. Parenteral sıvı sodyum, potasyum, bikarbonat ve glikoz içermelidir. Kriptosporidiyoz laktaz enzimi içeren olgun epitel hücrelerinin villus kaybı ile

karakterizedir. Bu nedenle laktozsuz diyet önerilmelidir. *Cryptosporidium*'a karşı henüz etkili bir tedavi bulunmadığı için hastalardaki enfeksiyon süregenleşerek yaşamı tehdit edebilmektedir^{98,99}.

2.11.1. İmmun Sistemi Sağlam Kişilerde Tedavi

İmmun sistemi sağlam kişilerde enfeksiyon genellikle ağır seyretmez ve 1-2 hafta içerisinde kendiliğinden geçer. Dehidratasyon tablosu durumunda sıvı ve elektrolit kaybını karşılamak tedavi için yeterli olabilmektedir. Ayrıca **Nitazoxanide** ve Spiramycin gibi ilaçlar da ishalin geçmesine yardımcı olabilen ilaçlardır^{98,100}.

2.11.2. İmmun Sistemi Baskılanmışlarda Tedavi

- İmmun sistemi baskılanmış hastalarda daha fazla oranda sıvı, elektrolit, kalori, yağ, karbonhidrat ve amino asit replasmin yanı sıra ilaç tedavisine de başlanmalıdır.
- İmmünsuprese ilaç uygulanan hastalarda (kanser, transplantasyon tedavileri) bu tedavilere ara verilmelidir.
- Özellikle AIDS'li hastalarda CD₄ hücre sayısı 200/mm³'ün altına düştüğünde Kriptosporidiyoz yaşamı tehdit edebilmektedir. Bu gibi durumlarda Kriptosporidiyoz için tedavi uygulanmadan önce antiretroviral tedavilerle CD₄ sayısının yükseltilmesi gereklidir.

İmmünsupresif hasta grubunda temelde kullanılabilecek ilaçlar olarak immün sistemi düzenleyiciler (İnterlökin 2, bovin transfer faktör, hiperimmün kolostrum), antimikrobikler (paramomisin, spiramisin, **nitazoksanid**, roksitromisin, letrazuril, azitromycin, lasalocid, maduramycin, aprinocid) ve antidiyareikler (morfin sülfat, somostain analogları, difenoksilat) tedavi amaçlı kullanılabilir^{98,101}.

Hücre kültürlerinde üretilen *Cryptosporidium*'un erken gelişme safhaları potansiyel ilaç denemeleri, parazit gelişmesi ve farklılaşması ile parazitin biyokimyasının incelenmesi için yapılan araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır⁸¹. *Cryptosporidium*'un uzun süre devam ettirebildiği veya parazitin yaşam döngüsünde yer alan tüm gelişme safhalarının etkili bir şekilde çoğaltılabildiği hücreli ve hücreli in

vitro kültürlerin kullanılması ile kriptosporidiyoz tedavisi çalışmalarının hızlanacağı düşünülmektedir¹⁶.

2.12. Korunma

İnsan ve hayvan dışkılarındaki ookistlerin çevreye yayılması önlenmelidir. Ookistlerin oda sıcaklığında 2-6 ay kadar canlı kaldıkları ve ookistlerin dondurulup tekrar 65°C'ye yükseltip bu sıcaklıkta 30 dakika bekletilmesi *Cryptosporidium*'un enfeksiyon özelliğini kaybettiği bildirilmiştir. Her ne kadar -20°C'nin altındaki sularda 30 dakikada ookistlerin öldüğü bildirilmişse de, son bilgiler ookistlerin donmaya zannedildiğinden daha dirençli olduğudur¹⁰².

Cryptosporidium ookistlerinin yaygın olarak kullanılan %3'lük hipoklorid, iyod bileşikleri, kresilik asit, benzalkonyum klorid dahil dezenfektanların çoğuna dirençli oldukları görülmüştür. Su kaynaklı bir patojen olan *Cryptosporidium* ookistleri hem tatlı hem de tuzlu suda aylarca enfektif olarak kalabilirler. İçme suyunun rutin klorlanma veya ozonlanmasının *Cryptosporidium* ookistleri üzerinde öldürücü etkisi çok azdır veya hiç bulunmamaktadır. 2.5µm çapındaki filtrelerle yapılan arıtma işlemlerinde bu filtrelerden çok kolay geçebildikleri saptanmış olup, su kaynaklı salgınların önlenmesi için suyun arıtmasında 1 µm çapından küçük filtreler kullanılması önerilmektedir⁵².

Kullanılan etlerin doğru pişirilmesine mutlaka dikkat edilmelidir. Çalışmalarda sığır, dana, kuzu, domuzlardan hazırlanan kıymaların 71°C'de, tavukdan hazırlananların 74°C'de, balık ve diğer deniz ürünleri ile kuşbaşı etlerin 63°C'de 15 dakika ısıtılması önerilmektedir. Çiğ yiyeceklerin, meyve ve sebzelerin iyice yıkanmasına dikkat edilmelidir¹⁰³.

Hijyen koşullarının düzeltilmesi, en çok insandan insana bulaşmayı, aynı zamanda hayvandan insana bulaşmayı azaltmaktadır; çünkü ev içi bulaşma ikincil olguların %50'sinden sorumludur. Veterinerlerin, sağlık ve laboratuvar personellerinin kontamine olmuş materyallerle temastan kaçınmaları gerekmektedir. Yemek hazırlamadan önce, tuvaletten sonra, çocuğun tuvalet temizliğini yaptıktan sonra, ishali kişilerin bakımını yapmadan önce ve yaptıktan sonra, ishali hayvanlara dokunduktan sonra eller sabunlu suyla en az 20 saniye yıkanmalıdır. İshali kişiler herhangi bir eğlence suyuna girmemelidirler. Kontamine olmuş suların yutulmasından

kaçınılmalıdır. Yüzme havuzları güvenlik için sürekli kontrol edilmelidir. Uluslararası seyahat sırasında yiyecek ve içeceklerin güvenilirliğine dikkat edilmelidir. Immun sistemi baskılanmış kişilerin enfeksiyona yakalanma riskini azaltmak için içme sularını kaynatmaları önerilir. Riskli cinsel ilişkiden kaçınılmalı veya önlem alınmalıdır^{70,104,105}.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

1. İshalli dışkı örnekleri
2. Cihazlar:
 - Gerçek zamanlı PCR cihazı (Real-Time cihazı) (Rotor Gene 3000)
 - Thermal cyclers (Termal döngü) cihazı
 - Jel elektroforez tankı
 - UV görüntüleme sistemi
 - Soğuk santrifüj cihazı
 - Çalkalayıcı
 - Isı bloğu
 - Bilgisayar yazılımı
 - ELISA okuyucu
 - ELISA yıkayıcı
3. Kimyasal maddeler:
 - Sülfürik Asit
 - Metil Alkol
 - Etanol
 - Yıkama solüsyonu 1 (İnhibisyon önleyici solüsyon)
 - Yıkama solüsyonu 2
 - Proteinaz K
4. Boyalar:
 - Karbol fuksin
 - Metilen mavisi
 - Lugol
5. DNA izolasyon kiti
6. ELİSA test kiti
7. Diğerleri
 - Primerler

- Problar
- DNA tutan filtre tüpler
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5-2 ml'lik)
- RNA'sız su
- Cam kapiller (20 µl)
- ELİSA plağı
- Plastik kapaklı dışkı kapları
- Fizyolojik tuzlu su
- Kürdan, lam, lamel

3.2. Örneklerin Toplanması

Nisan 2011-Şubat 2014 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesi'ne bağlı kliniklerden (Süt çocuğı, Büyük çocuk, Hematoloji, Gastroenteroloji ve Enfeksiyon) Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına nedeni bilinmeyen akut veya kronik ishal şikayeti ile başvuran hastaların ishal örnekleri çalışma kapsamına alındı.

3.3. Yöntemler

Bu çalışma, toplam 320 ishalleri kişiden alınan dışkı örnekleri üzerinde yapıldı. . Bu dışkı örnekleri, öncelikle nativ-lugol ve yoğunlaştırma yöntemleri ile bağırsak parazitleri açısından incelendi ve modifiye asit-fast boyama yapmak için preparatlar hazırlandı ve boyama yapıldı. Daha sonra kalan dışkı örnekleri ELISA, standart PZR ve Real-time PZR çalışılması için ependorf tüplerine alındı, tüplerin üzerine dışkı sahiplerinin isimleri ve getirildiğı tarih yazıldı, -20°C'de saklanması için derin dondurucuya kaldırıldı.

Çalışmadaki grupların kadın-erkek oranları ve yaş ortalamaları Çizelge-3'de verilmiştir. Çalışmada, 1. grup 0-12 yaş grubu kızlar ve erkeklerden, 2. grup 13 ve üstü yaş grubu kız/kadın ve erkeklerden oluşturuldu.

Çizelge 3. Çalışma gruplarındaki kadın ve erkek sayıları

	Kadın	Erkek	Genel Toplam
0-12 yaş	80	96	176
13 yaş ve üstü	62	82	144

3.3.1. Serum Fizyolojik Ve Nativ-Lugol ile Doğrudan Preparat Hazırlanması Ve İncelenmesi

Taze baki preparatı, yaklaşık 2 mg dışkı ile bir damla serum fizyoloji ve ayrı yerde 1 damla lugolün temiz bir lam veya lamlar üzerinde homojen olarak karıştırılması ile hazırlandı. Preparatlar, x10 ve x40'lık objektiflerle mikroskopta incelendi. Serum fizyolojik olan preparatta, sıvı veya yumuşak dışkı örneklerinde parazitlerin hareketli trofozoit şekilleri ve helmint larvaları yönünden incelendi; ayrıca kist, yumurta ve erişkin şekillerinin olup olmadığına bakıldı. Lugollü preparatta ise parazitlerin hareketli şekilleri görülmediği için parazitin kist, yumurta, larva ya da erişkin şekilleri yönünden incelendi¹⁰⁶.

3.3.2. Formol Etil Asetat Çöktürme Yöntemi

Doğrudan yayma preparatlar incelendiğinde gözden kaçabilen seyrek miktardaki helmint yumurta ve larvaları ile protozoon kist ve ookistleri dışkının yoğunlaştırılmasıyla daha kolay saptanabilmektedir. Bunun için:

- 1-1.5 g (veya 5-6 ml) dışkı 10 ml %10'luk formol ile iyice karıştırıldı.
- Süspansiyon 2 katlı gazlı bezden 15 ml'lik temiz bir deney tüpüne süzüldü.
- Üzerine yeteri kadar serum fizyolojik solüsyonu eklendi.
- Solüsyon 400-500xg'de 1-2 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı bulanıksa bu kısım atıldı ve çökelti serum fizyolojik ile sulandırılarak tekrar santrifüj edildi. Bu işlem üst sıvı berraklaşana kadar tekrarlandı.
- Çökeltiye toplam hacim 10 ml olana kadar %10'luk formol eklendi.
- Süspansiyona 3 ml etil asetat eklendi ve 30 saniye iyice çalkalandı.
- Süspansiyon 400-500xg'de 2-3 dakika santrifüj edildi. Tüpte 4 tabaka görüldü.
a) En üstte etil asetat tabakası b) Tüpün duvarlarına yapışan bir dışkı artığı tabakası c) Formol tabakası d) Çökelti

- Dışkı artığını ortadan kaldırmak için üst sıvı bir çubuk yardımıyla karıştırıldı ve üstteki 3 tabaka döküldü. Kenarlarda kalan sıvının az bir miktarı tekrar çökelti üzerine aktı.
- Cam pipet kullanarak bu sıvı çökelti ile karıştırıldı.
- İnceleme için temiz bir lam üzerinde bir damla çökelti ile bir damla lugol karıştırıldı ve üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobunda x10 ve x40'luk objektiflerde incelendi¹⁰⁶.

3.3.3. Feconomics®(Salubris Inc, Boston, USA) Yöntemi

Yeni geliştirilen ve kullanılan yoğunlaştırma yöntemlerinden biridir. Dışkıda parazit yoğunluğunun düşük olduğu durumlarda parazitin trofozoit, kist, ookist, yumurta ve larva formlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Diğer yoğunlaştırma yöntemlerinden farklı olarak, kontaminasyon riskinin daha az olması, uygulamanın pratik olması, hızlı sonuç alınabilmesi ve bazı parazitlerin trofozoit şekillerinin de görülebilmesidir. Bu yöntem şu şekilde uygulandı:

Kullanılacak maddeler:

- İçerisinde 10-15 ml kadar SAF (Sodyum asetat-asetik asit formol) bulunan ağzı kapaklı plastik bardak
- İçerisinde 1-3 mm'lik emici boncuklar bulunan küçük naylaon torbalar
- Ağzı açık baget
- Lugol
- Lam ve lamel

Yöntem:

1. 3 cm³ dışkı örneği, içerisinde SAF olan kaba alındı, kabın kapağı kapatılarak karışması için 10-15 saniye elde sallandı.
2. Kapak tekrar açılarak emici boncukların bulunduğu poşet kabın içerisine boşaltıldı.
3. Kapak kapatıldı ve tekrar 10-15 sn elde sallandı.
4. Boncuklar patlamaya başladı ve patlamanın sesi kesildiği an kapak açıldı ve kap eğilerek sıvı olan kısımdan bir baget yardımıyla 1-2 damla alındı.

5. Temiz bir lam alındı ve üzerine 1 damla lügol damlatıldı. Bagetten 1 damla sıvı lügolün üzerine damlatıldı ve bunun üzerine lamel kapatılarak önce X10 sonra da X40'lık objektiflerle mikroskopta incelendi⁷⁸.

3.3.4. Modifiye Asit- Fast Boyama Yöntemi

Kullanılacak maddeler:

1- Kinyoun Karbol fuksin eriyiği:

- | | |
|----------------------|--------|
| • Bazik fuksin | 4 gr |
| • Fenol (kristalize) | 8 gr |
| • Alkol (%95) | 20 ml |
| • Damıtık su | 100 ml |

2- Asit Alkol eriyiği:

- | | |
|-----------------|-------|
| • Sülfürik asit | 1 ml |
| • Etil alkol | 99 ml |

3-Metilen Mavisi:

- | | |
|----------------------------------|--------|
| • Metilen mavisi | 0.3 gr |
| • Potasyum hidroksit (%0.01'lik) | 100 ml |
| • Alkol (%95) | 30 ml |

Kinyoun karbol fuksin yapılışı:

- 4 gr bazik fuksin 20 ml %95'lik etanol içerisinde eritildi (Solüsyon A).
- 8 gr fenol kristali 100 ml damıtık suda eritildi (Solüsyon B).
- A ve B solüsyonları karıştırıldı ve en az 2 gün bekletildi.
- Karışım kullanım öncesi filtre edildi.

%1 asit alkol yapılışı:

- 99 ml etanole 1 ml konsantre sülfürik asit ilave edildi.

Metilen mavisi yapılışı:

- 0.3 gr metilen mavisi 30 ml %95'lik etanol içinde çözdürüldü.
- Bu karışıma %0.02'lik potasyum hidroksitten 100 ml eklendi.

Boyama Yöntemi

1. Yayma yapılan ve havada kurutulan dışkı preparatları metil alkol ile 3 dakika tespit edildi. Sonra preparatların üzerini kaplayacak şekilde Kinyoun'un Karbol fuksin eriyiği konuldu. Isıtılmaksızın 8-10 dakika boyandı.
 2. 3-5 saniye çeşme suyu ile yıkandı.
 3. % 1'lik sülfürik asit ile dekolore edildi. Çeşme suyu ile yıkandı.
 4. Metilen mavisi ile 1 dakika boyandı.
 5. Çeşme suyu ile yıkandı ve kurutuldu.
 6. Mikroskopta X40, X100 büyütme objektiflerinde incelendi.
- Mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı renkte *Cryptosporidium* ookistlerinin olup olmadığına bakıldı⁶.

3.3.5. ELISA Testi

Örneklerin değerlendirilmesinde *Cryptosporidium* spp. antijenlerini belirlemeye yönelik DRG Diagnostics, *Cryptosporidium* Antijen (Dışkı) (EIA-3467 DRG Instruments GmbH, Almanya) kiti kullanıldı. ELISA çalışması, üretici firmanın önerdiği biçimde aynen uygulandı.

Kullanılacak maddeler:

- ELİSA plağı (96'lık)
- Enzim Konjugat
- Pozitif kontrol
- Negatif kontrol
- Kromojen
- Yıkama solüsyonu (20x)
- Dilüsyon solüsyonu
- Stop solüsyonu
- Plak çalkalama cihazı
- ELİSA okuma cihazı

Örneğin Hazırlanması: Çalışma zamanına kadar -20°C’de saklanan (koruyucu içermeyen) dışkı örnekleri oda ısısına getirildi. 0.1 g veya 0.1 ml dışkı örneği 0.3 ml dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması: Bir şişe (25 ml) konsantre yıkama solüsyonu, 425 ml damıtık su ile karıştırıldı.(96 testlik için)

Yöntem

- 1- İstenilen sayıda kuyucuk hazırlandı (pozitif ve negatif kuyucuklar için fazladan iki kuyucuk) ve plağa yerleştirildi.
- 2- 1. kuyucuğa 2 damla (yaklaşık 100 µl) negatif kontrol, 2. kuyucuğa 2 damla pozitif kontrol eklendi.
- 3- Kontrol kuyucukları dışındaki her test kuyucuğuna 50’şer µl dilüsyon solüsyonu eklendi.
- 4- Dilüsyon solüsyonlu her test kuyucuğuna 50’şer µl sulandırılmış dışkı örnekleri eklendi.
- 5- Oda sıcaklığında (15-25°C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra yıkama işlemi yapıldı (Yıkama işlemi 5 kez yapıldı).
- 6- Her kuyucuğa 2’şer damla Enzim konjugat eklendi.
- 7- Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı, sonra yıkama yapıldı (Yıkama işlemi 5 kez yapıldı).
- 8- Her kuyucuğa 2’şer damla Kromojen eklendi.
- 9- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 10- Her kuyucuğa 2’şer damla Stop (durdurma) solüsyonu eklendi.
- 11- 5 dakika içerisinde 450 nm’de ELISA okuyucusunda okuma yapıldı.

Absorbans değeri: $0.08 \leq$ pozitif sonuç

$0.08 >$ negatif sonuç olarak kabul edildi.

3.3.6. DNA İzolasyon Yöntemi

Kullanılacak maddeler:

- DNA İzolasyon Kiti (QIAamp DNA stool mini kit) (QIAGEN, Hilden, Almanya)
- ASL buffer (Hücre parçalama solüsyonu)
- İnhibitex tablet
- Proteinaz K
- AL buffer
- 2 ml'lik spin colum
- AW1 buffer (Yıkama solüsyonu 1)
- AW2 buffer (Yıkama solüsyonu 2)
- AE buffer
- 1.5 ve 2 ml'lik ependorf tüpleri
- Etanol
- 70°C'lik sıcak su banyosu
- Soğuk santrifüj cihazı
- Vorteksleyici

Yöntem

1. 180-200 mg veya 200 µl dışkı örneği 2 ml'lik ependorfa alındı.
2. Dışkının üzerine 1.4 ml (1400 µl) ASL buffer eklendi ve 1 dakika kadar vortekslendi.
3. Karışım 70°C'de (su banyosunda) 30 dakika bekletildi.
4. Su banyosundan çıkartılan örnek 15 saniye vortekslendi ve yüksek rpm'de (14.000xg) 1 dakika santrifüj edildi.
5. Üstteki sıvıdan 1.2 ml (1200 µl) alındı ve 2 ml'lik yeni bir ependorfa alındı.
6. Üzerine 1 tane inhibitex tablet eklendi ve 15 saniye kadar vortekslendi.
7. Yüksek rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
8. Üstteki sıvının tamamı 1.5 ml'lik ependorfa alındı ve yüksek rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
9. 1.5 ml'lik yeni bir ependorfa 15 µl proteinaz K eklendi.

10. Üzerine 8. basamaktaki sıvıdan 200 µl eklendi.
11. Karışıma 200 µl AL buffer eklendi ve vortekslendi.
12. 70°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi ve sonra santrifüj edildi.
13. 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve vortekslendi.
14. Bu karışım 2 ml'lik spin colum (filtreli) toplama tüpüne boşaltıldı ve yüksek rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. Alttaki tüp değiştirildi ve 500 µl AW1 buffer eklendi, yüksek rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
16. Alttaki tüp değiştirildi ve 500 µl AW2 eklendi, yüksek rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
17. Filtreli spin colum 1.5 ml'lik ependorfa yerleştirildi ve 200 µl AE buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekledikten sonra yüksek rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonuçta DNA elde edildi ve uygun primerler ve thermal cycler programı kullanılarak standart PZR yöntemi ile *Cryptosporidium*'a ait bant (820-864bp) olup olmadığına bakıldı. Daha sonra bant tespit edilen örnekler ve bant görülmeyen diğer örnekler real time PZR çalışana kadar -20°C'de saklandı.

3.3.7. Standart PZR Yöntemi

Cryptosporidium spp. 18S rRNA geni hedeflenmiş ve *Cryptosporidium*'a ait 1326 baz çiftinin 834 bp'lik DNA parçası 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'(Forward primer) ve 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'(Reverse primer) primerleri (Çizelge 4) kullanılarak amplifikasyon yapıldı.

Kullanılacak maddeler:

- Master mix (Promega, USA)
- GoTaq 5X reaksiyon tamponu
- Distile su
- 0.2 ml'lik PZR tüpü
- 5 µl kalıp DNA
- 5 µl pozitif kontrol
- Primerler
- Thermal cycler cihazı

Çizelge 4. *Cryptosporidium* cinsine ait spesifik primer dizilimi

CX2F	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
CX2R	5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'

Yöntem

PZR amplifikasyon reaksiyonu, herbir örnek için DNA izolasyon sonrası elde edilen 5 µl kalıp DNA, 12.5 µl Promega master mix, 1.5 µl forward primer, 1.5 µl reverse primer ve 4.5 µl RNAaz içermeyen distile su olarak hazırlandı. PZR amplifikasyon reaksiyonu termal cyler cihazında, 94°C'de 5 dk başlangıç denatürasyon sonrası, 1 dk 94°C, 1 dk 57°C ve 1 dk 72°C'lik 45 döngü ve son uzama basamağında 10 dk 72°C uygulanarak yürütüldü (Çizelge 5). Daha sonra PZR ürünlerini görüntülemek için agaroz jel elektroforezi yapıldı.

Çizelge 5. CX2F ve CX2R Primerleri için kullanılan PZR programı

Ön Denatürasyon	94°C	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	94	1 dakika	
Primer bağlanması	57	1 dakika	45 döngü
Zincir uzaması	72	1 dakika	
Son döngüde zincir uzaması	72°C	10 dakika	1 döngü

3.3.7.1 Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünlerinin görüntülenmesi agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Agaroz jelin konsantrasyonu PZR sırasında oluşan ürünün büyüklüğüne bağlı olarak ayarlandı. SSU rRNA geni içinde 820-864 bp'lik DNA parçasının görüntülenebilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Elde edilen ürünler ve DNA merdiveni 90-110 voltajda yürütüldü.

Kullanılacak maddeler

- 0.5M EDTA
- 50x stok TAE tamponu
- 1x TAE tamponu
- Agaroz
- Distile su
- Cam beher
- Yükleme tamponu
- Güç kaynağı
- DNA merdiveni
- Etidyum bromür
- Jel yürütme sistemi ve tarağı
- Transilluminatör cihazı
- PZR ürünleri
- Mikrodalga fırın

Yöntem

- 20 ml 50x TAE stok tampon üzerine 980 ml distile su eklenerek 1x TAE tamponu hazırlandı.
- 2 gr agaroz ve 100 ml 1x TAE temiz bir cam beher içerisinde karıştırıldı.
- Karışım mikrodalga fırında agaroz jel çözününceye kadar ısıtıldı.
- Karışım oda sıcaklığına alınıp 50°C ısıya gelene kadar soğumaya bırakıldı.
- Jel tankına yavaşça dökülen karışıma jel yürütme sistemine ait tarak yerleştirilerek donuncaya kadar bekletildi.
- Jelin üzerini 1xTAE tamponu 1 cm kadar eklenerek tarak, jele zarar vermeyecek şekilde yavaşça çıkartıldı.
- PZR reaksiyonundan elde edilen ürünler (10 µl PZR ürünü + 10 µl yükleme tamponu) ve DNA merdiveni (3 mg/ µl) deliklere taşırılmadan jele yüklendi.
- Jel havuzu güç kaynağına bağlanarak 110 V 'de 20 dakika yürütüldü.

- Jel elektroforezi sonrası %2'lik agaroz jel etidyum bromür ile 5 dk boyanmaya bırakıldı ve sonrasında distile suda 10 dk bekletildi.
- Jel transilluminator aracılığı ile bantların olup olmadığına bakıldı ve jelin fotoğrafı çekildi.

3.3.8.Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR Yöntemi



Şekil 5. Gerçek zamanlı (Real time) PZR test cihazı (Rotor Gene 3000 Corbett Research cihazı)

Real time PZR yöntemi için 36 kuyucuğu bulunan (36 örnek çalışılabilir) özel tüplerle çalışılan Rotor Gene 3000 Corbett Research cihazı kullanıldı (Şekil 10).

Çalışma, *Cryptosporidium*'a özgü primerler ve proplar (hibridizasyon probları) kullanılarak SSU rRNA gen (820-864 baz çifti) bölgesinin amplifikasyonu elde etmek ve PZR sonrası erime eğrilerinden faydalanılarak *Cryptosporidium* türlerini tanımlamak için yapıldı. Sonuç, real time PZR'de analiz edildi. Bu amaçla HRM PZR Master Mix (HotStar Taq Plus DNA Polimeraz, EvaGreen boyası, optimize edilmiş Q-solüsyonu, dNTP'ler ve MgCl₂ içermektedir) kiti ve RNA'sız su kullanıldı.

Kullanılacak maddeler:

- HRM master mix
- RNAaz içermeyen distile su
- Pozitif kontrol

- Primerler:

CX2F: 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

CX2R: 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'

- Problar (2 adet hibridizasyon prob vardır):

Prob 1: 5'-CCGTCTAAAGCTGATAGGTCAGAACTTGAATG-flourescein 3'

Prob 2: 5'-LCred705-GTCACATTAATTGTGATCCGTAAAG-3'

Bu primer ve problar belirli miktarlarda karıştırılarak çalışmaya hazır hale getirildi.(Çizelge 6)

Çizelge 6. Real time PZR testinde kullanılan stok primer ve problardan hazırlanan primer-prob karışımı

Primer, Prob ve su	Miktar (µl)
Forward primer	18 µl
Reverse primer	18 µl
Prob 1	4 µl
Prob 2	4 µl
Distile su	56 µl
Toplam	100 µl

Kontrollerin hazırlanması

Real time PZR için iki çeşit kontrol kullanıldı. Bunlar negatif kontrol ve *Cryptosporidium* spp. DNA konsantrasyonu 10^1 - 10^5 reaksiyon olan pozitif kontrollerdir. Bu pozitif kontroller kit içerisinde bulunabildiği gibi manuel olarak da hazırlanabilmektedir.

Negatif kontrol 5 µl DNA yerine distile su konularak oluşturuldu. Pozitif kontrol olarak kit içinde bulunan ve reaksiyon başına 10^5 *Cryptosporidium* spp. DNA'sı içeren bir tane liyolifize standart kontrol kullanıldı. Bu standart kontrolden 10 µl alınarak 90 µl distile su ile karıştırıldı ve 10^4 dilüsyonunda pozitif kontrol elde edildi. Yine aynı şekilde hazırlanan bu pozitif kontrolden 10 µl alınıp 90 µl distile su ile karıştırıldığında 10^3 dilüsyonunda pozitif kontrol elde edildi. Bu işlem 10^1 olana kadar devam edildi ve böylece beş tane pozitif kontrol elde edilmiş oldu.

Yöntem

Reaksiyon karışımı 25 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 12.5 µl 1x HRM PZR Master Mix, 1.5 µl primer/prob, 6 µl RNA'sız su ve 5 µl DNA olacak şekilde mix hazırlandı (Çizelge 7). Gerçek zamanlı PZR için protokol; initial denaturasyon 95°C'de 5 dakika; 45 siklus, denaturasyon: 95°C'de 15 saniye, annealing-extensiyon 60°C'de 60 saniye olacak şekilde programlandı. Reaksiyon sırasında işler durumda olan bilgisayar yazılımında uygun kanal olan FAM kanalı seçildi, erime eğrisi sırasında gerçekleştirilen tek döngüde 40°C'den 85°C'ye 0.5°C/sn hızla sıcaklık artışı sağlandı (Çizelge 8). Çalışmada, çalışmanın güvenilirliğini sağlamak için mutlaka pozitif ve negatif kontroller çalışıldı.

Çizelge 7. Real time PZR testinde her bir örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
HRM master mix	12,5 µl	1x
Primer/Prob	1,5 µl	1x
Distile su	6 µl	
Kalıp DNA	5µl	
Toplam	25 µl	

Çizelge 8. Real time PZR testinde her bir örnek için uygulanan protokol

Analiz modu	Döngü sayısı	Basamak	Hedef sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma modu
			Preinkübasyon			
-	1		95°C	5 dk	20	-
			Çoğaltma (Amplifikasyon)			
		Denatürasyon	95°C	15 sn	20	-
Miktar belirleme	45	Annealing	60	60 sn	20	Tek
		Extensiyon	60	60 sn	20	Tek
			Erime Eğrisi			
	1	Denatürasyon	95°C	20 sn	20	-
Erime Eğrisi (Melting curve)	1	Annealing	40°C	20 sn	20	-
	1	Extensiyon	85°C	0 sn	0.5	Sürekli
			Soğutma			
-	1		40°C	30 sn	20	-

İlk olarak miktar belirlemeye yönelik çoğaltma sonuçlarının ve standart eğrinin değerlendirilmesi yapıldı. Reaksiyon sırasında işler durumda olan bilgisayar yazılımında uygun saptama kanalları seçildi. Bu işlemlerin sonucunda pozitif ve negatif kontroller seçildi, sonrasında otomatik olarak standart eğri oluşturuldu. Hastalara ait *Cryptosporidium* spp. DNA konsantrasyon miktarları standart eğrinin eğimi kullanılarak hesaplandı. Bu aşamada hastaya ait örnekte *Cryptosporidium* spp. DNA'sı saptandıysa pozitif kontrollere benzer floresan veren bir amplifikasyon eğrisi elde edildi. Bu eğrinin eşik floresan değerinin geçtiği döngü sayısı standart eğri tablosuna yerleştirildiğinde karşılık gelen logaritmik konsantrasyon değeri, örneğin içerdiği *Cryptosporidium* spp. DNA miktarını verdi. Daha sonra erime eğrisi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi yapıldı. Bunun için reaksiyon sırasında işler durumda olan bilgisayar yazılımında uygun saptama kanalları seçildi, erime eğrisi sırasında gerçekleştirilen tek döngüde 40°C'den 85°C'ye 0,5°C/sn hızla sıcaklık artışı sağlandı. Yapılan işlemlerin sonucunda süre bitiminde öncelikle pozitif ve negatif kontrollerin çalışıp çalışmadığına bakıldı. Daha sonra amplifikasyonu yapılan örneklerin melt eğrilerine bakılarak vermiş oldukları pikler arasında ayırım olup olmadığına bakıldı. Farklı melt eğrilerine sahip örneklerden birer tane seçilerek bunların hangi *Cryptosporidium* türüne ait olup olmadığını anlamak için bu örnekler sekansa (DNA dizi analizi) gönderildi.

4. BULGULAR

4.1. Doğrudan Preparat, Formol Etil Asetat ve Feconomics Çöktürme Yöntemlerinin Sonuçları

Bu çalışmada toplanan dışkı örneklerine sırasıyla serum fizyolojik ve nativ-lugol ile doğrudan preparat hazırlama ve mikroskopta inceleme, Formol etil asetat ve Feconomics çöktürme yöntemleri uygulandıktan sonra çökeltiden preparat hazırlanılarak ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda protozoanlardan *Giardia lamblia* (38), *Blastocystis hominis* (30), *Entamoeba coli* (12), *Entamoeba histolytica/dispar* (1), *Iodamoeba butschlii* (1), *Isospora* spp.(1) ve helmintlerden *Taenia* spp. (4), *Ascaris lumbricoides* (2), *Enterobius vermicularis* (2), *Trichuris trichiura* (1), *Strongyloides stercoralis* (1), *Fasciola hepatica* (1) ve *Hymenolepis nana* (1) saptandı (Çizelge 9). *Cryptosporidium*'ların doğrudan preparat incelemesi ve çöktürme yöntemleriyle tanısı çok zordur. Çünkü dışkıda görülen diğer bakteri, maya veya mantarlardan ayırt edilemeyebilir. Bundan dolayı tanı için laboratuvarlarda mutlaka boyama, serolojik yöntemler veya moleküler yöntemlerden herhangi birisinden veya birilerinden faydalanılır.

Çizelge 9. Doğrudan preparat, formol etil asetat çöktürme ve Feconomics® yöntemleri ile bulunan bağırsak parazitleri ve toplam sayıları

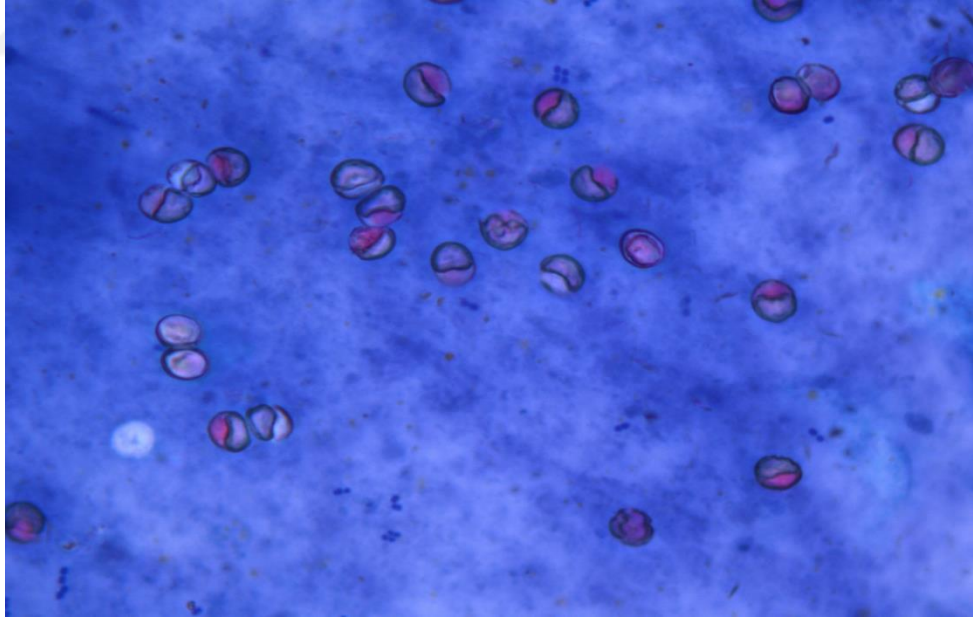
Protozoa	Mikroskobi sonucu
<i>Giardia lamblia</i>	38
<i>Blastocystis hominis</i>	30
<i>Entamoeba coli</i>	12
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1
<i>Isospora</i> spp.	1
Helminth	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2
<i>Trichuris trichiura</i>	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1
<i>Fasciola hepatica</i>	1
<i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Taenia</i> spp.	4
Toplam	95

4.2. Modifiye Asit Fast Boyama Yöntemi Sonucu

Modifiye asit fast boyama yöntemi ile boyanmış preparatların mikroskopta x100 büyütmede incelenmesi ile *Cryptosporidium* 'ların ookistlerinin mavi zemin üstünde, kırmızı-pembe renklerde ve bazen de boyanmayıp hayalet benzeri yuvarlak, hafif oval yapılar şeklinde görülmesiyle tanındılar. Ookistin seçilemeyen kısmı, etkenin yüzeyine göre daha koyu boyanırken, mantar sporları, bakteriler, fekal kalıntılar ve diğer asit fast özellik taşımayan yapılar koyu mavi renkte görüldüler. Çalışma grubundaki toplam 22 örnekte *Cryptosporidium* spp. ookistleri ve 1 tane de *Isospora* spp. sporokisti saptandı. (Şekil 6) . Pozitif saptanan bu 22 örneğin 17'si 0-12 yaş grubunda, 5 tanesi ise 13 ve üzeri yaş grubunda yer almaktadır (Çizelge 10).

Çizelge 10. Modifiye asit fast boyama sonucu

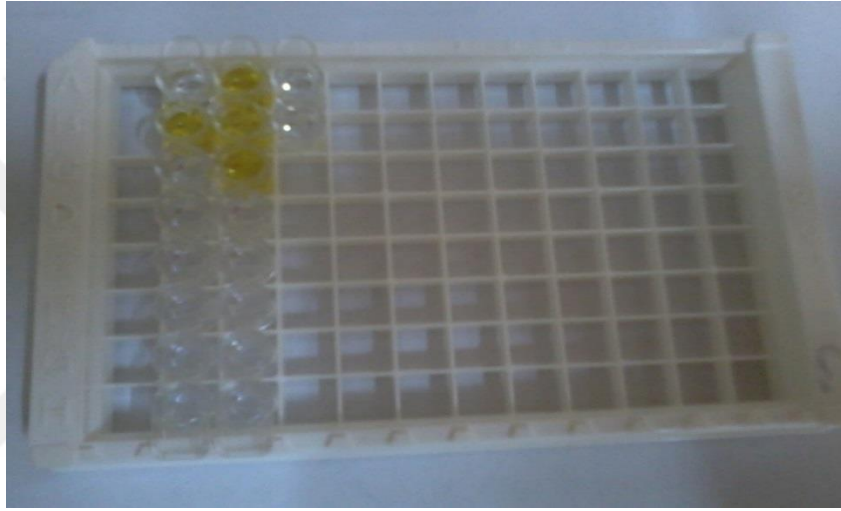
	Kadın/Kız	Erkek	Genel
0-12 yaş	80 (10)	96 (7)	176(17)
13 yaş ve üstü	62 (1)	82 (4)	144(5)



Şekil 6. *Cryptosporidium* spp.'nin ookistlerinin modifiye asit-fast boyamadaki görüntüsü (x100) Orjinal.

4.3. ELİSA Test Sonucu

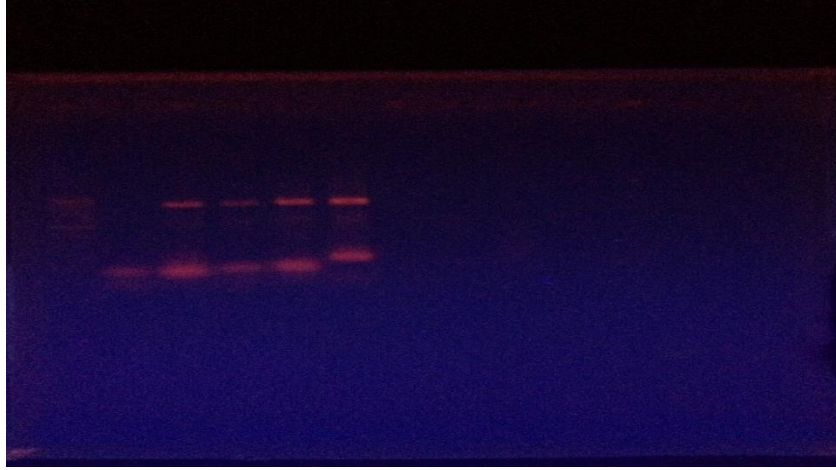
Cryptosporidium spp. antijenlerini belirlemeye yönelik yapılan ELİSA test çalışması sonucunda 26 örneğin absorbans değerinin $0.08 \leq$ olduğu ve pozitif sonuç verdiği belirlendi. Bu pozitif örneklerin bulunduğu kuyucukların da sarı renkte oldukları gözlemlendi. Negatif kontrolün bulunduğu kuyucuk ise şeffaf renkte, yani renksiz olarak görüldü. Resimde de görüldü gibi birinci kuyucuk negatif kontrol, ikinci kuyucuk ise pozitif kontrol sonuçlarıdır. Diğer üç kuyucuk ise *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin bulunduğu pozitif örneklerdendir (Şekil 7).



Şekil 7. ELISA test sonucu

4.4. Standart PZR Yöntemi Sonucu

Uygun primerler ve çalışma programı kullanılarak yapılan standart PZR yöntemi sonucunda çalışma grubundaki toplam 27 örnekte agaroz jelin UV ile incelenmesi sonucunda *Cryptosporidium* spp.'ye spesifik 834 bp'lik bantlar elde edilerek *Cryptosporidium* spp.'nin varlığı gösterildi (Şekil 8).

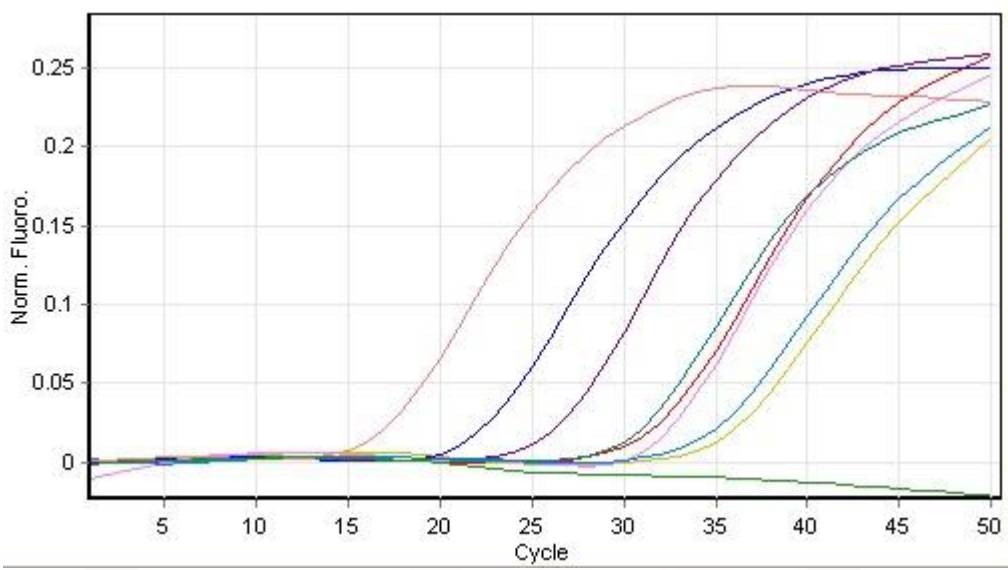


Şekil 8. Standart PZR yöntemi ile pozitif bulunan birkaç örneğin agaroz jel görüntüsü. (1.100 bp'lik marker (Bio Basic), 2.Negatif kontrol, 3.Pozitif kontrol, 4,5,6 pozitif örnekler)

4.5. Real-Time PZR Yöntemi Sonucu

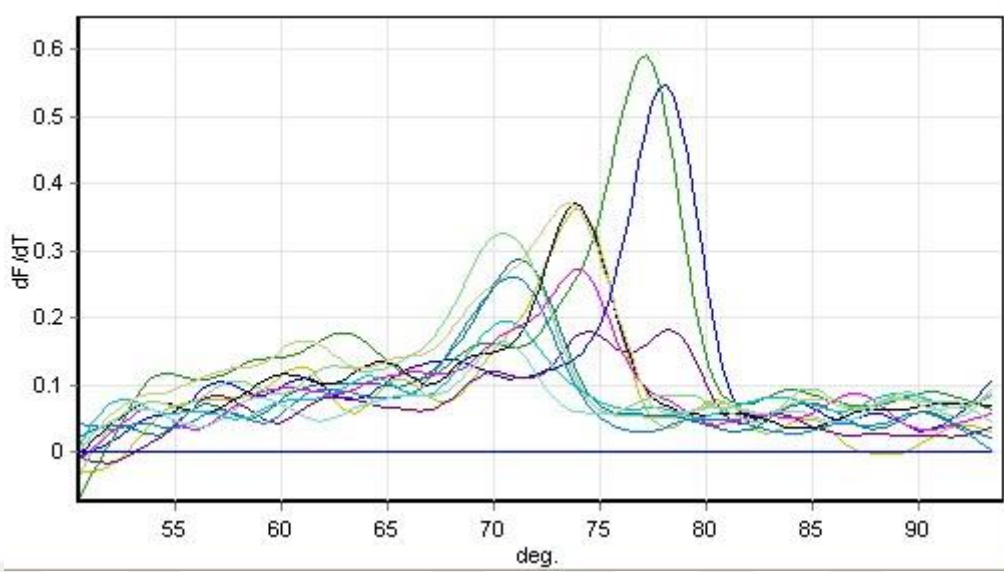
Cryptosporidium spp. için SSU rRNA gen bölgesini hedef alan spesifik primer ve probaların (hibridizasyon problemleri) kullanıldığı real time PZR çalışması sonucunda, hasta örneklerimizin sonuçlarını değerlendirdiğimizde 31 örneğin 15-40 Ct değerleri arasında yükselmeye başladıkları ve pozitif kontrollere benzer pikler yaptıkları görüldü. (Şekil 9) Ct değeri ile parazit yoğunluğu arasında ters bir orantı olduğu bilinmektedir. Real time PZR sonucu değerlendirilirken Ct değerlerine bakıldı ve Ct değeri düşük olan pozitif örneğin parazit konsantrasyonunun yüksek olduğu belirtildi. Ancak Ct değeri yüksek olan örnekte ise parazit yoğunluğunun düşük olduğu söylendi.

Modifiye asit fast boyama, ELİSA ve standart PZR yöntemleriyle tespit edilen pozitif örnekler, Real time PZR yöntemi ile de pozitif bulundu. Modifiye asit fast boyama yöntemi ile tespit edilemeyen 9 örnek real time PZR ile tespit edilebilmiştir. ELİSA ile tespit edilemeyen 5 örnek real time PZR ile tespit edilebilmiştir ve standart PZR ile tespit edilemeyen 4 örnek real time PZR ile tespit edilmiştir.

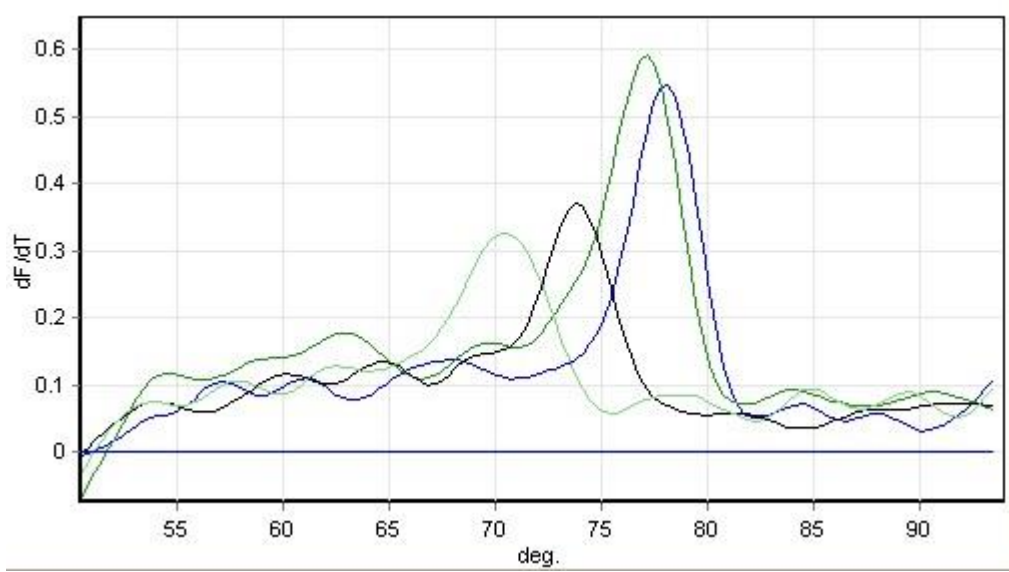


Şekil 9. *Cryptosporidium* spp. için pozitif saptanan örneklerin real time PZR’ de eş zamanlı analizleri sonucu belirlenen amplifikasyon grafikleri

Real time PZR’yi takiben uygulanan erime eğrisi analizi (melting curve analizi) sonuçlarını değerlendirdiğimizde ise pozitif ve negatif kontrollerin eğrilerine bakıldığında, pozitif kontrollerin özgün erime noktası (T_m: melting point) olan 78°C civarında pik yaptığı görüldü; fakat negatif kontrolde ise pik yapmayıp düz çizgiye benzer şekilde bir eğri oluştu. Bu, bize çalışmanın güvenilirliğini göstermiş oldu. 31 pozitif *Cryptosporidium* spp. örneğin melting curve analizini değerlendirdiğimizde ise 4 farklı derecelerde piklerin oluştuğu görüldü. (Şekil 10) Bunun sonucu olarak da 4 tane farklı türün bulunduğu belirtildi. Bunların T_m dereceleri sırasıyla 71.4°C, 74.1°C, 77.2°C ve 78.°C olarak kaydedildi. (Şekil 11) Bu örneklerden en yüksek pike sahip olan (parazit sayısı fazla olan) örneklerin hangi tür olduklarını öğrenmek için DNA sekansı (Sentromer) çalışılması için Ankara’ya gönderildi



Şekil 10. Melting curve analiz sonucu



Şekil 11. Melting curve analiz sonucu farklı pikler yapan ve tür tayini için sekansa gönderilen örnekler

DNA sekansı sonuçlarına göre 12 örneğin *Cryptosporidium hominis* (Tm: 78.°C), 7 örneğin *Cryptosporidium parvum* (Tm: 77.2°C), 7 örneğin *Cryptosporidium meleagridis* (Tm: 74.1°C) ve 5 örneğin de *Cryptosporidium andersoni* (Tm: 71.4°C) olduğu tanımlandı (Çizelge 11).

Çizelge 11. Melting curve ve DNA sekans sonuçlarına göre *Cryptosporidium* türleri

Tm dereceleri	Sayı	<i>Cryptosporidium</i> türleri	Genbank Aksesion Numaraları
71.4°C	5	<i>Cryptosporidium andersoni</i>	KF271472
74.1°C	7	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AY166839
77.2°C	7	<i>Cryptosporidium parvum</i>	AF481962
78 °C	12	<i>Cryptosporidium hominis</i>	EU032326

4.6. Duyarlılık-Özgüllük Sonuçları

Çalışmamızda, real time PZR yöntemi altın standart yöntem olarak kabul edildi ve modifiye asit fast boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü hesaplanıp sonuçları karşılaştırıldı. Modifiye asit fast yönteminin, real time PZR yöntemine göre duyarlılığı %70.96, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

Çizelge 12. Real time PZR ve modifiye asit fast boyama yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması

	qPZR (+)	qPZR (-)	Toplam
MAF (+)	22	0	22
MAF(-)	9	289	298
Toplam	31	289	320

$$\text{Duyarlılık: } 22/(22+9) \times 100 = 70.96$$

$$\text{Özgüllük: } 289/(289+0) \times 100 = 100$$

Örneklerin ELİSA ve qPZR yöntemleri sonuçları karşılaştırıldı. ELİSA yönteminin qPZR yöntemine göre duyarlılığı %83.87, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

Çizelge 13. ELİSA ve real time PZR yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması

	qPZR (+)	qPZR (-)	Toplam
ELİSA (+)	26	0	26
ELİSA (-)	5	289	294
Toplam	31	289	320

$$\text{Duyarlılık: } 26/(26+5) \times 100 = 83.87$$

$$\text{Özgüllük: } 289/(289+0) \times 100 = 100$$

Örneklerin qPZR ve standart PZR sonuçları karşılaştırıldı. Standart PZR'nin qPZR'ye göre duyarlılığı %87.09, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

Çizelge 14. Real time PZR ve standart PZR yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması

	qPZR(+)	qPZR (-)	Toplam
PZR (+)	27	0	27
PZR (-)	4	289	293
Toplam	31	289	320

$$\text{Duyarlılık: } 27/(27+4) \times 100 = 87.09$$

$$\text{Özgüllük: } 289/(289+0) \times 100 = 100$$

Örneklerin qPZR sonucunda Ct (dR) değerleri de belirlenerek örneklerdeki parazitemi hakkında veriler elde edildi. Bununla beraber qPZR'da pozitif belirlenen ve Ct (dR) değerleri yüksek olan (≥ 40) dört örneğin standart PZR analizleri sonrası, agaroz jel üzerinde amplifikasyonu tespit edilemedi. Her iki tekniğin de kriptoporidiyozun teşhisinde %100 özgüllüğe sahip olduğu belirlenmesine karşın özellikle parazitemisi düşük olan rezervuarların ortaya konabilmesinde qPZR tekniğinin çok daha duyarlı bir yöntem olduğu görüldü.

.ORIGIN

```
1   GGAAGGGTTG   TATTTATTAG   ATAAAGAACC   AATATAATTG
GTGACTCATA ATAACTTTAC
61  GGATCACAAT   TAATGTGACA   TATCATTCAA   GTTTCTGACC
TATCAGCTTT AGACGGTAGG
121 GTATTGGCCT   ACCGTGGCAA   TGACGGGTAA   CGGGGAATTA
GGGTTCGATT CCGGAGAGGG
181 AGCCTGAGAA   ACGGCTACCA   CATCTAAGGA   AGGCAGCAGG
CGCGCAAATT ACCCAATCCT
241 AATACAGGGA   GGTAGTGACA   AGAAATAACA   ATACAGGACT
TTTTGGTTTT GTAATTGGAA
301 TGAGTTAAGT   ATAAACCCCT   TTACAAGTAT   CAATTGGAGG
GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC
361 CGCGGTAATT   CCAGCTCCAA   TAGCGTATAT   TAAAGTTGTT
GCAGTTAAAA AGCTCGTAGT
421 TGGATTTCTG   TTAATAATTT   ATATAAAATA   TTTTGATGAA
TATTTATATA ATATTAACAT
481 AATTCATATT   ACTATTTTTT   TTTTLAGTAT   ATGAAATTTT
ACTTTGAGAA AATTAGAGTG
541 CTAAAGCAG   GCATATGCCT   TGAATACTCC   AGCATGGAAT
AATATTAAAG ATTTTATCT
601 TTTTATTGG   TTCTAAGATA   AGAATAATGA   TTAATAGGGA
CAGTTGGGGG CATTTGTATT
661 TAACAGTCAG   AGGTGAAATT   CTTAGATTTG   TTAAAGACAA
ACTAATGCGA AAGCATTTGC
721 CAAGGATGTT   TTCATTAATC   AAGAACGAAA   GTTAGGGGAT
CGAAGACGAT CAGATACCGT
781 CGTAGTCTTA   ACCATAAACT   ATGCCAACTA   GAGATTGGAG
GTTGTTTCCTT ACTCCTT
```

LOCUS: AF481962 837 bp DNA linear INV 13-SEP-2002

DEFINITION **Cryptosporidium parvum** small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

ORIGIN

```
1   AAAAGGGGTT   GTATTATTAG   ATAAAGAACC   AATGAGCTTG
GTGATTCATA ATAAC TTTAC
61   GGATCGCATC   TCTGATGCGA   CATATCATTC   AAGTTTCTGA
CCTATCAGCT TTAGACGGTA
121  GGGTATTGGC   CTACCGTGGC   TATGACGGGT   AACGGGGAAT
TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG
181  GGAGCCTGAG   AAACGGCTAC   CACATCTAAG   GAAGGCAGCA
GGCGCGCAAA TTACCCAATC
241  CTGACACAGG   GAGGTAGTGA   CAAGAAATAA   CAATACAGGG
CCTAACGGTC TTGTAATTGG
301  AATGAGTGAA   GTATAAACCC   CTTTACGAGT   ATCAATTGGA
GGGCAAGTCT GGTGCCAGCA
361  GCCGCGGTAA   TTCCAGCTCC   AATAGCGTAT   ATTAAAGTTG
TTGCAGTTAA AAAGCTCGTA
421  GTTGGATTTC   TGTTGTATAA   TTTATAATAT   TACCAAGGTA
ATTATTATAT TATCAACATC
481  CTCCTATTA   TATTCTAAAT   ATATAGGAAA   TTTTACTTTG
AGAAAATTAG AGTGCTTAAA
541  GCAGGCAACT   GCCTTGAATA   CTCCAGCATG   GAATAATAAG
TAAGGACTTT TGTCTTTCTT
601  ATTGGTTCTA   GGACAAAAGT   AATGGTTAAT   AGGGACAGTT
GGGGGCATTC GTATTTAACA
661  GCCAGAGGTG   AAATTCTTAG   ATTTGTTAAA   GACGAACTAC
TGCGAAAGCA TTTGCCAAGG
721  ATGTTTTTCAT   TAATCAAGAA   CGAAAGTTAG   GGGATCGAAG
ACGATCAGAT ACCGTCGTAG
```

781 TCTTAACCAT AAACATATGCC GACTAGAGAT TGGAGGTTGT
 TCCTTACTCC TTCAGCACCA
 841 C

LOCUS: KF271472 841 bp DNA linear INV 17-JAN-2014

DEFINITION *Cryptosporidium andersoni* isolate PD-21 18S ribosomal RNA gene,
 partial sequence

ORIGIN

1 GGAAGGGTTG TATTTATTAG ATAAAGAACC AATATAATTG
 GTGACTCATA ATAAC TTAC
 61 GGATCACAAT TTATGTGACA TATCATTCAA GTTTCTGACC
 TATCAGCTTT AGACGGTAGG
 121 GTATTGGCCT ACCGTGGCAA TGACGGGTAA CGGGGAATTA
 GGGTTCGATT CCGGAGAGGG
 181 AGCCTGAGAA ACGGCTACCA CATCTAAGGA AGGCAGCAGG
 CGCGCAAATT ACCCAATCCT
 241 AATACAGGGA GGTAGTGACA AGAAATAACA ATACAGGACT
 TTTTGGTTTT GTAATTGGAA
 301 TGAGTTAAGT ATAAACCCCT TTACAAGTAT CAATTGGAGG
 GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC
 361 CGCGGTAATT CCAGCTCCAA TAGCGTATAT TAAAGTTGTT
 GCAGTTAAAA AGCTCGTAGT
 421 TGGATTTCTG TTAATAATTT ATATATAATA TTTGATTAAT
 ATTTATATAA TATTAACATA
 481 ATTCATATTA CTAAATTTAT TAGTATATGA AATTTTACTT
 TGAGAAAATT AGAGTGCTTA
 541 AAGCAGGCAT ATGCCTTGAA TACTCCAGCA TGGAATAATA
 TTAAAGATTT TTATCTTTCT
 601 TATTGGTTCT AAGATAAAAA TAATGATTAA TAGGGACAGT
 TGGGGGCATT TGTATTTAAC

661 AGTCAGAGGT GAAATTCTTA GATTGTGTAA AGACAAACTA
 ATGCGAAAGC ATTTGCCAAG
 721 GATGTTTTCA TTAATCAAGA ACGAAAGTTA GGGGATCGAA
 GACGATCAGA TACCGTCGTA
 781 GTCTTAACCA TAAACTATGC CAACTAGAGA TTGGAGGTTG
 TTCCTTACTC CTT

//

LOCUS: AY166839 833 bp DNA linear INV 25-MAR-2003

DEFINITION *Cryptosporidium meleagridis* isolate TU1867 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ORIGIN

1 GGAAGGGTTG TATTTATTAG ATAAAGAACC AATATAATTG
 GTGACTCATA ATAACCTTAC
 61 GGATCACAAT TAATGTGACA TATCATTCAA GTTTCTGACC
 TATCAGCTTT AGACGGTAGG
 121 GTATTGGCCT ACCGTGGCAA TGACGGGTAA CGGGGAATTA
 GGGTTCGATT CCGGAGAGGG
 181 AGCCTGAGAA ACGGCTACCA CATCTAAGGA AGGCAGCAGG
 CGGGCAAATT ACCCAATCCT
 241 AATACAGGGA GGTAGTGACA AGAAATAACA ATACAGGACT
 TTTTGGTTTT GTAATTGGAA
 301 TGAGTTAAGT ATAAACCCCT TTACAAGTAT CAATTGGAGG
 GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC
 361 CGCGGTAATT CCAGCTCCAA TAGCGTATAT TAAAGTTGTT
 GCAGTTAAAA AGCTCGTAGT
 421 TGGATTTCTG TTAATAATTT ATATAAAATA TTTTGATGAA
 TATTTATATA ATATTAACAT
 481 AATTCATATT ACTATTTTTT TTTTGTAGTAT ATGAAATTTT
 ACTTTGAGAA AATTAGAGTG
 541 CTTAAAGCAG GCATATGCCT TGAATACTCC AGCATGGAAT
 AATATTAAAG ATTTTTATCT

601 TTTTATTGG TTCTAAGATA AGAATAATGA TTAATAGGGA
CAGTTGGGGG CATTGTATT
661 TAACAGTCAG AGGTGAAATT CTTAGATTG TTAAGACAA
ACTAATGCGA AAGCATTTGC
721 CAAGGATGTT TTCATTAATC AAGAACGAAA GTTAGGGGAT
CGAAGACGAT CAGATACCGT
781 CGTAGTCTTA ACCATAAACT ATGCCAACTA GAGATTGGAG
GTTGTTCCTT ACTCCTT

LOCUS: EU032326 837 bp DNA linear INV 17-JAN-2009

DEFINITION *Cryptosporidium hominis* haplotype ND2 small subunit ribosomal RNA
gene, partial sequence.



5. TARTIŞMA

Kriptosporidiyoz, özellikle gelişmekte olan ülkeler için en önemli paraziter hastalıklarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Enfeksiyon dünyada birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Söz konusu hastalık, büyüme çağındaki çocuklar ve immunsuprese hastalar başta olmak üzere toplumun her kesiminde görülmektedir. Hastalıkta klinik belirtilerin şiddeti ve patolojik bulgular, parazitin sayısı, cinsi, konağın bağışıklık durumu, enfeksiyon süresi, beslenme durumu ve etkilenen organa göre farklılık göstermektedir; ayrıca enfeksiyonun mevsimsel özellik gösterebildiği, özellikle daha sıcak ve nemli aylarda sık görüldüğü ancak insidansın her ülkede farklı dönemlerde artabileceği bildirilmiştir¹.

Cryptosporidium enfeksiyonlarında klinik olarak bol sulu ishal belirgindir. Kriptosporidiyoz olguları akut sulu ishal belirtileri ile diğer enfeksiyöz gastroenteritiler ile karışabilmektedir^{107,108}. İnsanlarda 1993'te Milwaukee/Wisconsin salgını (yaklaşık 403.000 kişide) ile dikkatler bu parazit üzerine yoğunlaşmış ve son yıllarda dünyada *Cryptosporidium*'ların morfoloji, biyoloji ve bulaşmasından moleküler genetik yapılarına kadar çok sayıda araştırmalar yapılmıştır²⁸.

Kriptosporidiyoz'un teşhisinde kullanılan pek çok etkili boyama tekniği söz konusu olsa da, ilgili tekniklerin rutin tanı laboratuvarlarında kullanımlarının yeterince pratik olmadığı bildirilmiştir. Bu noktada, kolay, pratik ve kısa sürede sonuç alınabilmesi ve belli bir deneyime sahip kişiler tarafından kolaylıkla tanının konulabilmesi açısından modifiye asit fast boyama tekniğinin avantaj sağlayabileceği vurgulanmış, ancak genel itibarıyla bütün mikroskopik tanı yöntemlerinde geçerli olan, dışkı ile belli sayının altında etken atan kimi hastaların ve taşıyıcı olguların tespitinde düşük duyarlılığa sahip olabileceği ve iyileşme döneminde non asit-fast yani hayalet ookistlerin sayısının artması nedeni ile yanlış sonuçların alınabileceği bildirilmiştir^{109,110,111}. ELİSA yöntemi ise birden fazla örneği aynı anda çalışma olanağı sağladığı için çok avantajlıdır. Ancak ELİSA kitlerin bazılarının duyarlılıkları, taşıyıcıları ve iyileşme dönemindeki olguları tespit edecek düzeyde değildir. İnsanda hastalık oluşturan parazitleri saptamaya yönelik hazırlanmış kitler, kullanılan antikorların özgüllüklerinin yüksek olması nedeniyle hayvanlarda bulunan *Cryptosporidium* türlerini saptayamamaktadır^{112,113}. Son dönemlerde yüksek duyarlılık

ve özgüllüğe sahip PZR gibi moleküler teknikler hastalığın tanısında kendisine önemli bir yer edinmiştir. Yapılan araştırmalarda klinik örneklerin farklı moleküler kitler ile incelenmesi sonucu testlerin duyarlılığının %50-100 arasında değiştiği ve özgüllüğünün %100 oranında olduğu gösterilmiştir¹¹⁴.

Önceleri insanlarda görülen *Cryptosporidium parvum* olgularının büyük bir kısmının zoonotik olduğu düşünülse de bazı moleküler çalışmalar sonucunda bu oranın çok daha düşük olduğu bulunmuştur. Amerika, İngiltere ve Yeni Zelanda’da yapılan çalışmalarda kırsal kesimlerde *Cryptosporidium parvum*, şehirlerde ise *Cryptosporidium hominis*’in daha sık görüldüğü bildirilmiştir^{39,115,116}. İnsanlardaki *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonlarının ne kadarının zoonotik olduğu bilinmemektedir. Çünkü parazitin kaynağı insan ya da sığırlar olabilmektedir¹¹⁷. Buzağılarda bulunan *Cryptosporidium parvum*’un zoonotik genotipleri insanlara genellikle su ile bulaştığı halde, antroponotik olan *Cryptosporidium hominis* daha çok gıda ile bulaşmaktadır. Salgınların oluşmasında buzağuların önemli rol oynadığı bilinmektedir. İnsanlarda kriptosporidiyoz olgularının çoğunluğu *Cryptosporidium hominis* ve *Cryptosporidium parvum*’dan ileri gelmektedir. Olguların %50’sini *Cryptosporidium hominis*, %45’ini *Cryptosporidium parvum*, %5’ini ise *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium ubiquitum* ve *Cryptosporidium suis* oluşturmaktadır^{28,118}. Bizim yaptığımız çalışmada ise %38.4 oranla *Cryptosporidium hominis* birinci sırada, % 22,4 oranla *Cryptosporidium parvum* ikinci sırada, yine aynı oranla (%22.4) *Cryptosporidium meleagridis* üçüncü sırada, %16 oranla ise *Cryptosporidium andersoni* dördüncü sırada yer almaktadır.

Real time PZR, 45 dakika gibi kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon (çoğalma) esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren boyalar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir^{119,120}. Çalışmamızda, standart PZR ile real-time PZR sonuçlarına baktığımızda pozitif örnek sayımız real-time PZR ile 31 iken diğerinde 27 bulunmuştur. Real-time PZR sonuçlarını değerlendirirken Ct değeri 40’ın üzerinde olanlar real-time PZR ile pik yaptıkları yani pozitif örnek olarak kabul edildikleri halde, standart PZR ile bu 31 örneğin 27’sinde 834 bp’lik bant elde edildiği görülmüştür. Yani standart PZR

yöntemi ile parazit konsantrasyonu düşük olan örneklerde *Cryptosporidium* spp.'yi kaçırmak mümkün olabilmektedir. Ayrıca real time PZR çalışma sonrası melting curve analizi uygulandığında pozitif bulunan *Cryptosporidium* spp. türlerinin tanısı konulabilmektedir. Böylece hastalığın bulaş kaynağı da tespit edilmiş olmaktadır.

Tanrıverdi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi hibridizasyon problemleri (FRET) kullanılarak real time PZR çalışılmış, sonrasında melting curve analizi uygulamışlar ve beş farklı türün olduğunu tespit etmişlerdir. Bunlar, *C. hominis* (64.2 °C), *C. parvum* (55.6°C), *C. meleagridis* (59.8°C), *C. canis* (54°), *C. felis* (50.02°) tir¹²⁰.

Bizim yaptığımız çalışmada ise real time PZR sonrası uygulanan melting curve analizi sonucu dört farklı türün olduğunu tespit ettik. Sonuç olarak 78°C pike sahip olan türün *C. hominis* (12 kişide), 77.2°C pike sahip olan türün *C. parvum* (7 kişide), 74.1°C pike sahip olan türün *C. meleagridis* (7 kişide) ve son olarak 71.4°C pike sahip olan türün *C. andersoni* (5 kişide) olduğu tespit edildi. Bu sonuçlara dayanarak sıcak ve nemli bir şehir olan Adana'daki Kriptosporidiyozun nedeninin daha çok insandan insana bulaşın kaynağı olan *C. hominis* olduğunu söyleyebiliriz.

Na ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, multipleks PZR ile real time PZR karşılaştırılmış ve real time PZR'nin duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada real time PZR sonrası melting curve analizi uygulanmış ve *Cryptosporidium hominis* (85.5°C) ve *Cryptosporidium parvum* (80.1°C) türleri tanımlanmıştır¹²¹. Pangasa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise real time PZR sonrası uygulanan melting curve analizi sonucunda *C. hominis*'in 72.47°C'de, *C. parvum*'un 72.17°C'de, *C. meleagridis*'in ise 73.33°C'de pik yaptıkları görülmüştür¹²².

Rolando ve arkadaşlarının Brezilya'da yaptığı bir çalışmada real-time PZR sonucuna göre o bölgede *Cryptosporidium parvum*'un daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir¹²³. Bizim çalışmamızda ise sonuçlara baktığımızda Adana'da *C.hominis* sayı olarak fazla iken bunu sırasıyla *C. parvum*, *C. meleagridis* ve *C.andersoni* takip etmektedir.

Cryptosporidium türlerinin dünyadaki dağılımı bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Avrupa ülkelerinde *C.parvum* ve *C.hominis*; Orta Doğu ülkelerinde *C.parvum* türleri yaygın olarak görülmekte, diğer bölgelerde ise *C.hominis*'e bağlı enfeksiyonlara daha sık rastlanmaktadır^{124,125}.

Vastert ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada akut ve kronik ishalli dışkılarda *Cryptosporidium parvum*'un mikroskopi (Kinyoun boyama ile doğrulanmış Auramin boyama) Crypto-strip test, ELİSA ve gerçek zamanlı PZR yöntemleri karşılaştırılmış ve PZR altın standart olarak kabul edildiğinde testlerin duyarlılıkları sırasıyla %37, %78, %71 bulunmuştur; özgüllükleri ise %98'in altına inmemiştir¹²⁶. Bizim yaptığımız çalışmada da real time PZR altın standart olarak kabul edildi. Boyama, ELİSA ve standart PZR testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %70.96, %83. 87, ve %87.09 olarak bulunmuştur; özgüllükleri ise %100 bulunmuştur.

Atalık K.'nin yaptığı çalışmada 91 örnekte modifiye ZN boyama ile pozitiflik saptanmazken, sandviç ELİSA (sad ELİSA) ve COWP gen bölgesi hedef alınarak yapılan gerçek zamanlı PZR yöntemleriyle *Cryptosporidium* pozitifliği sırasıyla bir (%1.1), bir (%1.1) olarak saptanmıştır¹²⁷. Bizim yaptığımız çalışmada ise boyama ile 22, ELİSA ile 26, standar PZR ile 27 ve SSU rRNA gen bölgesi hedef alınarak yapılan gerçek zamanlı PZR ile 31 *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptanmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Cryptosporidium spp. daha önceleri sadece bağışıklık sistemi baskı altında olan canlılarda (insan veya hayvanlarda) görülen bir parazit olduğu bilinmesine karşın, günümüze kadar yapılan çalışmalara baktığımızda bağışıklık sistemi sağlam olan canlılarda da sıklıkla karşılaşıldığı ve hatta ölüme bile neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmamızın sonucuna baktığımızda türler arasında konağı sadece insan olan *Cryptosporidium hominis*'in sayısının diğer türlerle kıyasladığımızda fazla olduğu görülmektedir. Çalışma, bu parazitin sadece zoonotik yolla bulaşan bir parazit olmadığını ve aynı zamanda insandan insana bulaşın da olduğunu göstermiştir.

Sağlıklı kantitasyon yapmak, kontaminasyonu en aza indirmek, hızla sonuca ulaşmak, özgüllüğü yükseltmek ve çok sayıda klinik örneği çalışabilmek için real-time PCR formatı geliştirilmiştir. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PZR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır.

Sonuç olarak, hastanelere nedeni bilinmeyen ishal şikayeti ile gelen kişilerin dışkı örnekleri, hayati önem taşıyan *Cryptosporidium* spp. açısından bütün laboratuvarlarda rutin olarak araştırılmalı ve bu parazit ile ilgili halka eğitim verilmelidir. Ayrıca parazitin kaynağının bilinmesi açısından tür düzeyinde araştırma yapan hızlı ve güvenilir bir yöntem olan real time PZR, paraziteminin ortaya konması ve buna bağlı tedavi etkinliğinin takibine olanak sağlaması gibi üstün özellikliklere sahiptir. Bunlardan dolayı bu yöntemin de hastanelerde rutin laboratuvarlarda yer alması gerektiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. **Özcel MA, Özbel Y, Ak M.** *Özcel'in Tubi Parazit Hastalıkları.* İzmir: Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın, No:22, **2007**: 363-376.
2. **Mosier DA, Oberst RD.** *Cryptosporidiosis: A global challenge.* *Ann NY Acad Sci*, **2000**; 916: 102-111.
3. **Smith HV, Caccio SM, Cook N, Nichols RA, Tait A.** Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol*, **2007**; 149(1-2):29-40.
4. **Egyed Z, Sréter T, Széll Z, Vargab I.** Characterization of Cryptosporidium spp.—recent developments and future needs. *Vet Parasitol*, **2003**; 13:103-114.
5. **Helmy YA, Krücken J, Nöckler K, Von G, Himmelstjerna S, Zessin KH.** Comparison between two commercially available serological tests and polymerase chain reaction in the diagnosis of *Cryptosporidium* in animals and diarrhoeic children. *Parasitology Research*, **2014**; 113: 211-216.
6. **Garcia LS.** Intestinal protozoa (coccidia and microsporidia) and algae. *Diagnostic Medical Parasitology*, 5th ed. USA, ASM Press; **2007**.
7. **Fayer, R.** General biology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, **2008** ; 1–42.
8. **Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS and Okonkwo FO.** Comparative Diagnostic Techniques for Cryptosporidium Infection. *Molecules*, **2014**; 19: 2674-2683.
9. **Biderouni FT, Salehi N.** Detection of Cryptosporidium infection by modified ziehl-neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospitals in Tehran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, **2014**; 7(2):125-130.
10. **Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Engl J Med*, **1994**; 331:161–7
11. **Smith H.** Diagnostics. In: Fayer R, Xiao L, editörs. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2nd ed. USA: CRC Press; **2007**: 174-207.
12. **Tzipori S, Ward H.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*, **2002**; 4:1047 – 1058.
13. **Fayer R:** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*, **2010**; 124 (1): 90-97.
14. **Current WL.** Human cryptosporidiosis. *N Engl J Med*, **2003**; 309(24): 1326- 1327.
15. **Current WL, Garcia LS.** Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, **2001**; 4(27): 325- 358.
16. **Tzipori S, Widmer G.** A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol*, **2008**; 24: 184-9.
17. **Navin TR, Juranek DD.** Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Rev Infect Dis*, **1984**; 6: 313-327.
18. **Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, Akiyoshi DE, Tzipori S.** Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea

- with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg*, **2005**; 73(5):921-5.
19. **Mehlhorn H, Piekarsk G.** Berlin.6.Auflage “Grundriß der Parasitenkunde”, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, **2002**; 516.
 20. **Nina JMS, McDonald V, Dyson DA, Catchpole J, Uni S, Iseki M, Chiodini PL, McAdam KPWJ.** Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. *Infect Immun*, **1992**; 60:1509-1513.
 21. **Ryan U.M, Feng Y, Fayer R, Xiao L.** Taxonomy and moleküler epidemiyology of Cryptosporidium and Giardia – A 50 year perspektive (**1971- 2021**). *Int J. Parasitol*, **2021**; 51(13-14):1099-1119.
 22. **Feng Y, Ryan UM, Xiao L.** Genetic diversity and population structure of Cryptosporidium. *Trends Parasitol*, **2018**; 34: 997-1011.
 23. **Caccio SM, Pozio E.** Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2006**; 4(3):429-43.
 24. **Xiao L, Fayer R.** Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol*, **2008**; 38(11):1239-55.
 25. **Gatai W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA.** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of Cryptosporidium parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**; 4:1458-62.
 26. **Fayer R, Morgan U, Upton SJ.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol*, **2000**; 30: 1305–1322.
 27. **Thompson RC, Chalmers RM.** *Cryptosporidium*: from molecules to disease. *Trends Parasitol*, **2002**; 18: 98-100.
 28. **Thompson RC, Hunter PR.** The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium. *Int J Parasitol*, **2005**; 35(11-12):1181-90.
 29. **Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RC, Olson M, Lal A, Eiao L** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **2002**; 49:433-440.
 30. **White AC Jr.** Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, other species). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, **2005**:3215–28.
 31. **Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, **2002**; 4: 1059–1066.
 32. **Guerrant RL.** Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect Dis*, **1997**; 3(1):51-7.
 33. **Carey CM, Lee H, Trevors JT.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, **2004**; 38:818-862.
 34. **Ortega YR** Protozoan parasites. In: Doyle MP, Beuchat LR (eds) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington DC: **2007**; 663-681.

35. **Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE and Lundgren JD.** Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourin Med*, **1996**; 72(2):128–131.
36. **Sorvillo FJ¹, Lieb LE, Kerndt PR, Ash LR.** Epidemiology of cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. *Am J Trop Med Hyg*, **1994**; 51(3):326-31.
37. **Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ.** Chlorine Disinfection of Recreational Water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Disease*, **1999**; 5:579–584.
38. **Smith HV, Caccio SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RCA.** Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol*, **2006**; 22: 160–166.
39. **McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols GL.** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38: 3984–3990.
40. **Chieffi PP, Paschoalotti MA, Vergueiro CS, Chiattoni C.** Infection by *Cryptosporidium* sp. in immunocompromised haematological patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, **2005**; 47(5): 301-2.
41. **Krause I, Amir J, Cleper R, Dagan A, Behor J, Samra Z, Davidovits.** *Cryptosporidiosis* in children following solid organ transplantation. *Pediatr Infect Dis J*, **2012**; 31: 1135-8.
42. **Elgun G, Koltas İS.** Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitology Research*, **2010**; 108(2):395-7
43. **Caccio SM, Widmer G.** *Cryptosporidium: Parasite and Disease* Springer, Wien, Heidelberg, New York: Dordrecht, London, Cama. **2014**.
44. **Langer RC, Riggs MW.** *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, **1999**; 67(10):5282-91.
45. **Goldoft MJ, Todd D.** *Cryptosporidiosis*. *Epidemiology*, **2008**; 13(7): 1-4.
46. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Diagnostic Procedures for Stool Specimens <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm> **2014**.
47. **Hijawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA.** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cellfree culture. *Int J Parasitol*, **2004**; 34(7):769-77.
48. **Chappella CL, Okhuysen PC.** *Cryptosporidiosis*. *Curr Opin Infect Dis*, **2002**; 15:523-527,
49. **Monis PT, Thompson RCA.** *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution*, **2003**; 3: 233–244.
50. **Casemore DP, Wright SE, Copp RL.** *Cryptosporidiosis human and animal epidemiology*. In *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer R (Ed). CRC Pres- US: **1997**; 66-92.
51. **Nichols G, Lane C, Asgari N, Verlander NQ, Charlett A.** Rainfall and out breaks of drinking water related disease and in England and Wales. *J Water Health*, **2009**; 7(1):1-8.
52. **Griffiths JK.** Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol*, **1998**; 40:37–85.

53. **Kosek M, Alcanlara C, Lima AAM, Guerrani RL.** Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infect Dis*, **2001**; 1:262-269.
54. **Leav BA, Mackay M, Ward HD and Acheson D.** *Cryptosporidium* species: New insights and old challenges. *Clin. Infect. Dis*, **2003**; 36: 903-908.
55. **Garcia L.** Intestinal Protozoa: Coccidia and Microsporidia. In Garcia, L. Diagnostic medical parasitology, 4th ed. Washington, DC: American Society Microbiology, **2001**; 49–74.
56. **Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF.** Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect*, **1999**; 1(2):141-8.
57. **Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, Lewis DE, Shahab I, Lahoti S, White AC Jr.** Expression of IL-15 and IL-4 in IFN-gamma-independent control of experimental human *Cryptosporidium parvum* infection. *Cytokine*, **2001**; 15(1):39-46.
58. **Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF.** Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*, **2002**; 346(22):1723-31.
59. **Laurent F, Lacroix-Lamandé S.** Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*, **2017**; 47(12):711-721.
60. **Borad A, Ward H.** Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol*, **2010**; 5:507-519.
61. **McDonald V.** Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol*, **2000**; 22(12):597-604.
62. **Lean IS, Lacroix-Lamandé S, Laurent F, McDonald V.** Role of tumor necrosis factor alpha in development of immunity against *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, **2006**; 74(7):4379-82.
63. **Frost FJ, Tollestrup K, Craun GF, Fairley CK, Sinclair MI, Kunde TR.** Protective immunity associated with a strong serological response to a *Cryptosporidium*-specific antigen group, in HIV-infected individuals. *J Infect Dis*. **2005**;192(4):618-21.
64. **Ferreira MS, Borges AS.** Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2002**; 97(4):443-57.
65. **Sandhu SK, Priest JW, Lammie PJ, Hubbard A, Colford JM Jr, Eisenberg JN.** The natural history of antibody responses to *Cryptosporidium* parasites in men at high risk of HIV infection. *J Infect Dis*, **2006**; 194(10):1428-37.
66. **Gomez Morales MA, Mele R, Ludovisi A, Bruschi F, Tosini F, Riganò R, Pozio E.** *Cryptosporidium parvum*-specific CD4 Th1 cells from sensitized donors responding to both fractionated and recombinant antigenic proteins. *Infect Immun*, **2004**; 72(3):1306-10.
67. **T.C. Sağlık Bakanlığı.** Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuar Rehberi. **2004**.
68. **Bilgean H.** Sindirim sistemi enfeksiyonlarının mikrobiyolojik incelenmesi. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. Baskı, **2004**; 18:349-373.
69. **Ok ÜZ.** Dışkının incelemeleri. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Bildiri Özet Kitabı. 15 – 19 Haziran **2010** ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi Ankara. (edt: Us D.)
70. **Wilson WR.** *Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi*, Nobel Tıp Kitabevi, **2004**; 824-827.

71. **Ramírez NE, Ward LA, Sreevatsan S.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect*, **2004**; 6:773–85.
72. **Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S.** The evolution of respiratory Cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin Microbiol Rev*, **2014**; 27(3):575-86.
73. **Current WL, Garcia LS.** Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, **1991**; (4): 225-228.
74. **Döşkaya M, Dayangaç N, Kuman HA.** *Cryptosporidium parvum*. *T Parazitol Derg*, **2003**; 27(1):64-70.
75. **Fall A, Thompson RC, Hobbs RP, Morgan-Ryan U.** Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J Parasitol*, **2003**; 89(2):399-402.
76. **Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, Smyth S, Millar BC, Rooney PJ, Matsuda M, Kenny F, Xu J, Dooley JS.** Cryptosporidiosis in developing countries. *J Infect Dev Ctries*, **2007**; 1(3):242-56.
77. **Özcan K.** Tıbbi Parazitoloji Ders ve Laboratuar Notları, Adana, **1998**: 77-79.
78. **Koltas IS, Akyar I, Elgun G, Kocagoz T.** Feconomics®; a new and more convenient method, the routine diagnosis of intestinal parasitic infections. *Parasitol Res*, **2014**; 113(7):2503-8.
79. **Us D.** Serolojik Tanı Yöntemleri Uygulama ve değerlendirme. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Basımevi; **2006**: 33-41.
80. **Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R.** Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg*, **1996**; 54(3):274-9.
81. **Arrowood MJ.** In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15(3): 390–400.
82. **Zhang L, Sheoran AS, Widmer G** *Cryptosporidium parvum* DNA replication in cell-free culture *J Parasitol*, **2009**; 95(5): 1239–1242.
83. **Barbosa JM, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Hanscheid T, Shapiro H, Pina-Vaz C.** A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. , **2008**; 73(1):44-7.
84. **Sunnotel W, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JSG, Xiao L,, Millar B, Rooney PJ, Snelling WJ.** *Cryptosporidium*. *Lett Appl Microbiol*, **2006**; 43:7-16.
85. **Jiang J, Xiao L.** An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J Eukaryot Microbiol*, **2003**; 50:542-7.
86. **Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H.** Moleküler Parazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları. **2009**: Yayın No:22.
87. **McPherson MJ, Moller GS.** The Basics. New York: Cromwell Press, **2000**:1-45.
88. **Prichard R, Tait A.** The Role Of Molecular Biology İn Veterinary Parasitology. *Vet Parasitol*, **2001**; 98:169-194.
89. **Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N.** The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, **2006**; 27(2-3):95-125.
90. **Logan J, Edwards K.** An overview of PCR platforms. In: Logan J, Edwards K, Saunders N, eds. Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Caister Academic Press; **2009**:8.

91. **Klein D.** Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*, **2002**; 8(6):257-60.
92. **Monis PT, Giglio S, Saint CP.** Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem*, **2005**; 340(1):24-34.
93. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, **2006**; 19(1):165-256.
94. **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, **2002**; 30(6):1292–1305.
95. **Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, **2001**:15-35.
96. **Haugland RP** The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed. Molecular Probes, Eugene, **1996**.
97. **Li Y, Zhou X, Ye D.** “Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe.”, *Biochem Biophys Res Commun*, **2008**; 5;373(4):457-61.
98. **Akısü Ç, Korkmaz M.** Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed Özcel MA. Tıbbi Parazitoloji Derneği. İzmir: Ege Üniversitesi, Yayın No:20, **2005**: 40-41.
99. **Tünger Ö, Tünger A.** Enfeksiyön Hastalıkları Kitabı. HYB Basım Yayın, **2007**: 545-546.
100. **Chen W, Harp JA, Harmsen AG.** Cryptosporidium parvum infection in gene-targeted B cell-deficient mice. *J Parasitol*, **2003**; 89(2):391-3.
101. **JF.** Cryptosporidium and Giardia: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol*, **2010**; 124(1):45-53.
102. **Bannister BA, Begg NT, Gillespie SH.** *Infectious Disease*, Second Edition, Blackwell Science Ltd. **2007**.
103. **Ministry of Health by ESR.** Cryptosporidium parvum. Prepared for the Ltd. 2 Issued. May **2001**.
104. **Murray PR, Rosenthal KS, and Pfaller MA.** Medical Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Inc., **2005**: 855–856.
105. **Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Jawetz M.** *Adelberg’s Medical Microbiology* (23rd ed.). New York: Lange Medical Books/McGraw Hill. **2004**: 684–5.
106. **Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu AA, Limoncu E.** Dışkı İnceleme Yöntemleri. Özcel MA, Altındaş N.eds. Parazit Hastalıklarında Tanı. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi. 1997: 1-61.
107. **Chalmers RM, Davies AP.** Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, **2010**; 124(1):138-146.
108. **Kelly P.** Treatment and prevention of cryptosporidiosis: what options are there for a country like Zambia? *Parasitology*, **2011**; 138:12.
109. **Entrala E, Rueda-Rubio MC, Janssen D, Mascaró C.** Influence of hydrogen peroxide on acid-fast staining of Cryptosporidium parvum oocysts. *Int J Parasitol*, **1995**; 25: 1473-1477.

110. **Korkmaz M ve Ok Ü.** Parazitolojide laboratuvar. Yayın no: 23. İzmir: *TürkParazitolDern*, **2011**.
111. **Khurana S, Sharma P, Sharma A, Malla N.** Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Trop Parasitol*, **2012**; 2(1): 20-3.
112. **Anonymous.** Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. **1999**.
113. **Anonymous.** Water Quality-Isolation and Identification of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water. 12. International Organisation for Standardisation, Geneva. **2004-05**.
114. **Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO.** Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *Moleküles*, **2014**; 19-2674-2683.
115. **Learmonth JJ, Ionas G, Ebbett KA, Errol S, Kwan ES.** Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. *Appl Environ Microbiol*, **2004**; 70(7):3973-8.
116. **Feltus DC, Giddings CW, Brianna L, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM.** Evidence Supporting Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of clinical microbiology*, **2006**; 44:12.
117. **Mallon M, MacLeod A, Wastling J, Smith H, Reilly B, Tait A.** Population structures and the role of genetic Exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J Mol Evol*, **2003**; 56:407-417.
118. **O' Handley RM, Olson ME.** Giardiasis and Cryptosporidiosis in ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*, **2006**; 22: 623-643.
119. **Soliman RH and Othman AA.** Evaluation of DNA Melting Curve Analysis Real-Time PCR for Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* Species. *Parasitologists United Journal (PUJ)*, **2009**; 2(1):47 – 54.
120. **Tanriverdi S, Tanyeli A, Başlamışlı F, Köksal F, Kiliç Y, Feng X, Batzer G, Tzipori S, Widmer G.** Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40(9):3237-44.
121. **Na L, Neuman NF, Norma R, Alderisio KA, Sturbaum GD, Villegas EN, Rachel Chalmers R, Monis P, Feng Y, Xiao L.** Development and evaluation of three real-time PCR assays for genotyping and source tracking *Cryptosporidium* spp. in water. *Appl Environ Microbiol*, **2015**; 8:5845–5854.
122. **Pangasa A, Jex AR, Bronwyn E. Campbell BE, Bott NJ, Whipp M, Hogg G, Stevens MA, Gasser RB.** High resolution melting-curve (HRM) analysis for the diagnosis of cryptosporidiosis in humans. *Molecular and Cellular Probes*, **2009**; 23:10-15.
123. **Rolando RF, Silva S, Peralta RH, Silva AJ, Cunha Fde S, Bello AR, Peralta JM.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2012**; 107(4): 476-9.
124. **Xiao L.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*, **2010**; 124(1): 80-9.
125. **Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L.** *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol*, **2009**; 47(1): 153-7.

126. **Vastert D, Brinkman M, Wilke H, Mulder B.** Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* with mikroskopy, strip test, ELİSA ve real-time PCR. Poster: *Ned Tijdschr Med Microbiol.* **2006**; 14: Supplement:10.06.
127. **Atalık K.** HIV Pozitif bireylerin dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* sp.'nin çeşitli yöntemlerle araştırılması. İstanbul Üniversitesi. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. **2015**.



ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve lise (Yabancı Dil Ağırlıklı) öğretimini Tokat'ın Turhal ilçesinde tamamladı. Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi'nin 2001 yılında yaptığı üniversite giriş sınavı sonucunda Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde öğrenim görmeye hak kazandı. Bu bölümden 2005 yılında mezun oldu ve aynı yıl içerisinde Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2009 yılında aynı bölümde doktora eğitimine başladı ve hala aynı bölümde öğrenimine devam etmektedir.

