

## CRYPTOSPORIDIUM TÜRLERİNİN TANIMLANMASINDA YENİ BİR YAKLAŞIM: RİBOTİPLENDİRME

**Rabia SARIKAYA**

Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi  
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

**Geliş Tarihi:** 09.09.2003

**Yayına Kabul Tarihi:** 31.05.2004

### ÖZET

*Cryptosporidium* ilk kez 1907'de tanımlanmış ancak 1976 yılına kadar insanlarda hastalığa neden olduğu fark edilememiştir. Protozoonlardan olan *Cryptosporidium parvum* insanlarda ve hayvanlarda *Cryptosporidiosis* denilen sindirim sistemi hastalıklarına neden olmaktadır. Enfeksiyon sırasında Protozoon sindirim sisteminde yerleşir ve hayatını intraselüler parazit olarak devam ettirir. Bağırsaklarda oosit formunda bulunur, dışkı ile yayılır ve hastalık yeni bireylere dışkı ile bulaşır. *Cryptosporidium*'un *C. muris*, *C. baileyi* ve *C. meleagridis*'i de gibi pek çok farklı türü kaydedilmiştir. Ancak, yalnızca bir türün insanlarda önemli hastalıklara neden olduğuna inanılmaktadır ki bu tür *Cryptosporidium parvum*'dur. Bağışıklık sistemi zayıf ya da AIDS hastalarında, *Cryptosporidium*'un birçok enfeksiyona neden olduğu bulunmuştur. Bu parazit ishalin süresini uzatmakta ve yaşamı tehdit etmektedir. *Cryptosporidium*'un farklı türlerinin varlığı, tanımlamada önemli problemlere yol açmaktadır. Çevredeki örneklerde bulunan oositler gözlemlendiğinde farklı türlere ait oositler arasındaki farkı anlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle filogenetik analizde moleküler metotlar kullanılmalıdır. Bu derlemenin amacı *Cryptosporidium* türleri ve onların tanımlama metotları ile ilgili önemli bilgiler vermektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cryptosporidium*, Fırsatçı parazit, Protozoa, Diagnostik teknikler.

## A NEW APPROACH OF IDENTIFICATION OF CRYPTOSPORIDIUM STRAINS: RIBOTYPING

### ABSTRACT

*Cryptosporidium*, first described in 1907, was not recognized as a cause of human illness until 1976. The protozoan *Cryptosporidium parvum* is the causative agent for the gastrointestinal disease, cryptosporidiosis, in man and animals. Upon the infection, this protozoan reside principally in the gastrointestinal tract and goes through its life stages as an intracellular parasite. In the intestines, it forms oocysts which are shed in feces and which are the source of infection for new susceptible persons. Different species of *Cryptosporidium* have been recorded, including *C. muris*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*. However, only species that is believed to be an important cause of disease in man is *Cryptosporidium parvum*. In patients who are immunosuppressed or who suffer from AIDS, *Cryptosporidium* is now recognized as one of a large group of infections which can contribute to a protracted and life-threatening diarrhoeal illness. The existence of different species of *Cryptosporidium* present problems in identification when oocysts are observed in environmental samples since it is not yet possible to differentiate between oocysts of different species. For this reason, molecular methods must use for phylogenetic analysis. Purpose of this review to give important information about *Cryptosporidium* strains and their's identification methods.

**Key Words:** *Cryptosporidium*, Opportunistic parasite, Protozoan, Diagnostic methods.

## 1. GİRİŞ

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* parazit protozoonların neden olduğu zoonoz özellikli bir enfeksiyon olup, son yıllarda, insan ve ekonomik değeri olan birçok evcil hayvanlardaki enteritislerin önemli bir nedeni olarak kabul edilmiştir (Casemore, ve arkadaşları, 1985:16; Current, 1985:5; Fayer ve Ungar, 1986:26). *Cryptosporidium* türleri Apicomplexa şubesine, Telosporia sınıfına, Coccidiomorpha alt sınıfına, Eimeriorina altordosuna ve Cryptosporidiidae familyasına ait parazit protozoonlardır (Navin ve Juranek, 1984:15; O'donoghue, 1985:6; Tzipori, 1983:13). Tyzzer doğal olarak enfekte olmuş laboratuvar farelerinde *Cryptosporidium* cinsini ilk bulan, tanımlayan ve bu cinsin *C.muris* ve *C.parvum* türlerini tespit eden araştırmacıdır (Tyzzer, 1907:2; Tyzzer, 1910:23; Tyzzer, 1912:19). Coccidia grubu protozoonlardan olan bu parazitlerin genel olarak insan dahil, birçok memeli, kanatlı, sürüngen ve balık türlerinin sindirim kanalı epitel hücrelerinde lokalize oldukları saptanmıştır (Fayer ve Ungar, 1986:26; O'donoghue, 1985:6; Tzipori, 1983:13). Bu parazit protozoonlar, her ne kadar bu yüzyılın başlarında tanımlanmış ve isimlendirilmişse de (Tyzzer, 1907:2; Tyzzer, 1910:23; Tyzzer, 1912:19), hastalığın identifikasyonu, klinik önemi, epidemiyolojisi, yayılışı ve kontrolü ile ilgili çoğu bilgiler ancak son yıllarda elde edilebilmiştir (Casemore, ve arkadaşları, 1985:16; Current, 1985:5; Fayer ve Ungar, 1986:26; Navin ve Juranek, 1984:15; O'donoghue, 1985:6; Tzipori, 1983:13). Bunun yanısıra *Cryptosporidium* türlerinin büyük kısmı henüz moleküler düzeyde incelenmemiştir.

Cryptosporidiosis, önceleri hayvanlarda nadiren görülen bir enfeksiyon olarak düşünülmüş, ancak son yıllarda, çeşitli evcil hayvan türlerinde, özellikle yeni doğanlarda ishale sebep olan bir enfeksiyon olarak dikkati çekmiştir (Angus, ve arkadaşları, 1982:2; Moson ve arkadaşları, 1981:3; Tzipori ve arkadaşları, 1982:2). Yapılan deneysel çalışmalar da, *Cryptosporidium*'ların enteropatojen etkenler arasında olduğunu teyit etmiştir. Bu çalışmalar, aynı zamanda, bu parazit protozoonların türe özgü olmadığını göstermiş ve çeşitli hayvan türleriyle, bunlarla ilişkisi olan insanlarda, çapraz enfeksiyonların her zaman olası olduğunu ortaya koymuştur (Current ve arkadaşları, 1983:6; Reese ve arkadaşları, 1982:4; Sherwood ve arkadaşları, 1982:5; Tzipori ve arkadaşları, 1980:3; Tzipori ve arkadaşları, 1981:5).

Daha çok son zamanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları hakkındaki bilgiler, çeşitli araştırmacılarca bir araya getirilmiştir. Bunun sonucunda enfeksiyonlar hakkındaki veriler çarpıcı şekilde artmış, ancak hastalığa karşı etkili kemoterapotiklerin henüz saptanamaması, yeryüzünde yaygın olan enfeksiyonlara ilginin sürmesine neden olmuştur. *Cryptosporidium* türlerinin enfeksiyonları daha sıklıkla konakta neonatal durumda yalnız olarak ya da başka bir enfeksiyonla birlikte (rota virüs, corana virüs ve *E. coli*) bulunur.

Buna ek olarak immunosuppressor ilaçlar kullanılan hastalarda, congenital hypogammaglobulinemia hastalarında, AIDS ve Lenfatik leukemia'da, leukosis görülen kedilerde, Marek hastalığıyla enfekte olan ve

bağışıklık sistemi bozuk Arap taylarında *Cryptosporidium* türleri fırsatçı parazit özelliği gösterirler. Özellikle *Cryptosporidium parvum* türü AIDS hastalarında ölüme neden olan ikincil etmen olarak tanımlanmıştır. Bu Protozoon aynı zamanda hindi, bıldırcın, sülün, kanarya, papağan, kaz, muhabbet kuşu ve ördeklerin bursa fabricus, tükrük bezlerinde özofagus bezlerinde ince ve kalın bağırsaklarında, kör bağırsaklarında ve kloaklarında yerleşmektedir. Diğer taraftan nasal turbinates, nasofarinks, larynx, trake, bronş ve solunum organlarının hava keselerinden de izole edilebilmektedir. *Cryptosporidium* türleri bursa fabricus tabakaları içinde solunum ve sindirim sisteminde yerleşmeyi tercih eder. Buralarda klinik ve patolojik değişimlere sebebiyet vermektedir. Böylece kuşlarda Marek hastalığı ortaya çıkar. *Cryptosporidium* türlerinin bulunduğu bursa fabricus epitelinin çoğunda hiperplazi, bir kısmında ise hiperplazi ile birlikte hipertrofi, vakuoler dejenerasyon ve bu epitel hücre katında heterofil hücre infiltrasyonunun bulunduğu belirlenmiştir (Özkul ve arkadaşları, 1991:9).

*Cryptosporidium* türlerinin tavuklarda, hindilerde ve bıldırcınlarda bağırsak sisteminde bulunduğu yakın zamanlarda tespit edilmiştir (Özkul ve Aydın, 1994:4).

*C. muris*'in Türkiye ve İngiltere'de ev farelerinde, Japonya'da ev sıçanlarında, Almanya'da dağ geyiklerinde, Amerika ve Çek Cumhuriyeti'nde sığırlarda ve Amerika'da develerde bulunduğu rapor edilmiştir (Aydın ve Özkul, 1996:6). *Cryptosporidiosis* hastalığı ile ilgili olarak Türkiye'de cross-transmission çalışmaları yapılmakta ve patolojik bulgular elde edilmektedir (Aydın, 1991:18).

Bu parazitlerin özellikle son zamanlarda dünya çapında yaygınlaşan diarrehoal hastalıkların sebebi olduğunun farkına varılmıştır. İngiltere' de her yıl 4000-6000 kişide bu hastalık Halk Sağlığı Laboratuvarı Servisi'nce rapor edilmiştir. Amerika ve İngiltere'de görülen ve 400.000'den fazla kişiyi etkileyen enfeksiyonun içme suyundan oral yolla bulaştığı tespit edilmiştir. Enfeksiyonun bulaşma nedeni tam olarak açıklanamamasına rağmen, hayvanlardan bulaştığı gibi yiyecek, içecek, su tüketimi ve insandan insana bulaşabilir (Fayer ve arkadaşları, 1997:41).

*Cryptosporidium parvum* ishal hastalıklarının başlıca sebebidir. Bu türün oositleri ağır çevresel koşullara ve dezenfektanlara karşı çok dayanıklı olduklarından paraziti kontrol altına almak oldukça güçtür. Bu nedenle oositleri etkisiz hale getirmek için farklı yöntemlere ihtiyaç vardır. Yu ve Park (2003:4) gamma ışınlarının *Cryptosporidium* türlerine etkisini araştırmışlardır. Enfekte edilmiş farelerdeki oositlerin tamamen elimine edilmesi için en az 50.000 Gy gamma ışınma ihtiyacı olduğunu tespit etmişlerdir.

Kirby ve arkadaşları (2003:17), tarımda atık su kullanımının çeşitli sağlık problemlerine neden olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle *Cryptosporidium* gibi parazit yumurtalarının bu şekilde insanlara bulaştığını rapor etmişlerdir.

İnsan dahil birçok hayvan grubunda parazit olarak yerleşebilen ve en ufak bir bağışıklık sistemi aksamasında çabucak faaliyete geçerek konağın immün sistemini tamamen zayıflatan ve hatta öldüren *Cryptosporidium* türlerinin filogenetik analizi yapılmalı ve türlerin

tanımlanmasında başarılı yöntemler geliştirilmeye çalışılmalıdır. Bunun sonucunda bu fırsatçı parazite müdahale yolları aranabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sınıflandırılması

Alem : Protista

Altalem : Protozoa

Şube: Sporozoa (Apicomplexa)

Sınıf : Telosporia

Altsınıf : Coccidiomorpha

Takım : Eucoccidiorida

Alttakım : Eimeriorina

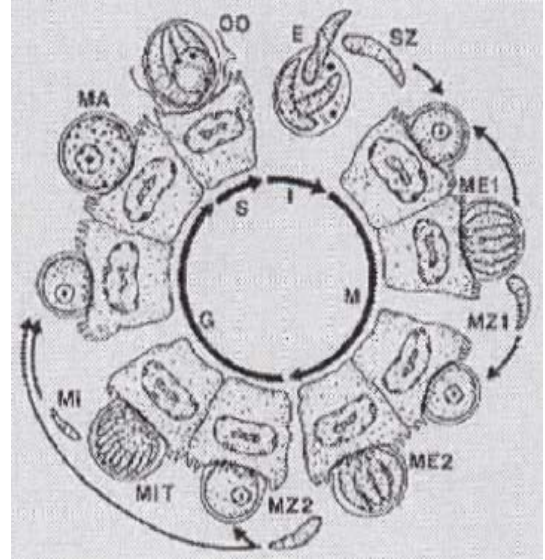
Familiya : Cryptosporidiidae

Cins : Cryptosporidium

### 2.2. Hayat Döngüsü

*Cryptosporidium* karışık bir hayat döngüsüne sahiptir. Bu döngü bazı kitaplara göre 1-8 gün sürerken, bazı kitaplara göre (ki kabul gören budur) 12-14 saattir. Diğer alt takım elemanlarının tersine *Cryptosporidium* tek bir konağın vücudunda yerleşir ve konağın bağırsaklarında tekrarlayan döngüler sonucu enfeksiyon oluşur.

Enfekte olmuş hayvanın dışkıları içinde dökülen oositler (bu olaya **Excystation** denir) çok fazla miktardadır. Örneğin enfekte olmuş bir buzağıda yaklaşık bir haftalık periyotta 50 milyar oosit üretilebilir.



**Şekil 1.** Cryptosporidium Türlerinde Hayat Döngüsü Şeması

(E) Excystation; (G) Gametogoni; (I) Bulaşıcı Evre; (M) Merogoni; (ME1) Tip I Meront; (ME2) Tip II Meront; (MA) Macrogamet; (MI) Microgamet; (MIT) Microgametosit; (MZ1) Tip I Merozoit; (MZ2) Tip II Merozoit; (OO) Oosit; (S) Sporogoni; (SZ) Sporozoit

Dışkıyla dökülen oositlerin yenmesiyle hayat döngüsü başlar. Oositler çevresel koşullara çok dirençlidir. Her oosit dört adet sporozoit içerir. Enfekte olmuş hayvanın oniki parmak bağırsağı içinde safra tuzlarının ve tripsin gibi sindirim enzimlerinin etkisiyle oositler parçalanır ve 4 sporozoit serbest hale geçer. Sporozoitler muz şeklindedir ve baş kısımları bağlayıcı protein içerir. Bazı kaynaklarda bu birleştirici proteine feeder organelle denilmektedir ve dezmozoma benzetilmektedir. Sporozoitler birleştirici protein sayesinde ince bağırsağı astarlayan epitel hücrelerinin yüzeyine tutunurlar.

Sporozoit daha sonra epitel hücrelerinin içine girer ve hücre membranı içinde hücre sitoplazmasına girmeksizin (intrasellular ama extrasitoplazmik) yuvarlak bir trophozoit oluşur. Daha sonra multiple fission (çoğa bölünme = merogony = schizogony) oluşur. Bu olay sonucu meront denilen yapı meydana gelir. Meront içinde 8 merozoit vardır. Bu merontlar Tip I Meront olarak adlandırılır. Tip I merontlar çatlayarak açılır ve tip I merozoitler serbest kalır. Serbest merozoitler yeni hücreye girdiklerinde merogonie geçirerek ek meront formları oluştururlar. Tip I merontlar sürekli olarak bu döngüye devam etme yeteneğindedirler ve her zaman mevcuttur.

Bazı tip I merontlar ise ikinci bir meront tipinin oluşumuna yol açarlar. Bunlara Tip II Meront denir. Bir adet Tip II meront ise eşeysiz üreme ile 4 merozoit oluşturur. Tip II merozoitler serbest kaldıklarında eşeyli durumda görünürler. Bazı tip II merozoitler hücreye girer, hücreyi genişletir ve Macrogamet (dişi) formunu oluşturur. Diğer bazı tip II merozoitler ise hücre içerisinde multiple fission geçirerek 16 adet flagellatsız Microgamet içeren Microgametocytes'i oluşturur. Microgametler içerisinde buldukları microgametositi çatlatır ve dışarı çıkarlar. Daha sonra her biri bir macrogamet içerisine girerek Zigot'u oluştururlar. Bu evre Gametogonie evresidir. Zigotun etrafında dirençli bir oosit duvarı vardır. Zigot hayat döngüsündeki tek diploid evredir. Zigot mayoz bölünme geçirerek 4 adet sporozoit oluşturur. Bu evreye Sporogonie denir. Dört adet sporozoit içeren her oosit dışıyla çevreye bırakılır.

Bağırsakta üretilen oositlerin yaklaşık %20'si oosit duvarı oluşturmada başarısız

olurlar ve yalnızca ince bir membranla çevrelenerek sporozoitleri oluştururlar. Bu çeşitler ince duvarlı oositler olarak adlandırılır. Bunlar konağın bağırsağı içinde kist olarak kalırlar ve yeni hücreleri enfekte ederler. Böylece çevredeki kalın duvarlı oositlerin yenmesine gerek kalmaksızın enfeksiyon devamlılık kazanır. Bu duruma Autoenfeksiyon denir. Bağırsakta üretilen oositlerin yaklaşık %80'i ise çevresel faktörlere dirençli, kalın çeperli bir yapıdadır. Bunlar konaktan ayrılarak enfeksiyonu diğer konağa bulaştırmakta görevlidirler. Bu oositlere ise kalın duvarlı oositler denir. Bunlar hayatta kalabilmek için 4 ay süreyle uykuda kalabilirler. Temiz su içinde 1 yıla yakın dormans halde kalırlar. *Cryptosporidium* türleri içme suyu sistemlerinde gerçek bir direnç gösterirler. Arıtmada kullanılan klor gibi dezenfektanlara çok fazla dirençlidirler. Oositleri 2-3 mg/l'lik klor konsantrasyonu etkilemektedir. Ancak 100 mg/l'lik kloru suya kısa periyotlarla ekleyerek diğer bütün mikroorganizmalarla birlikte çeşitleri öldürmek mümkündür. Oositleri filtrasyon yoluyla da uzaklaştırmak çok zordur. Çünkü oositlerin çapı 4-6 µ'dur. Eğer oositler dondurulursa bulaşmanın devam ettiği görülür. Ancak 72.4 °C de 1 dakika yada 62.4 °C de 2 dakika kaynatılırsa bulaşma kaybolur.

### 2.3. *Cryptosporidium* Türlerinin İlk Kez Tanımlanması

*Cryptosporidium* cinsi parazitler ilk olarak 19. yüzyılın başlarında Amerikalı parazitolog RE. Tyzzer tarafından tanımlanmıştır. Tyzzer 1907 yılında laboratuvar farelerinin mide bez epitel hücrelerine yerleşen cinsin örnek türü olan, *Cryptosporidium muris*'i tanımlamıştır. Aynı araştırmacı 1912 yılında farelerin ince

bağırsaklarında ikinci bir türü tanımlamış ve *Cryptosporidium parvum* olarak isimlendirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda ise başka *Cryptosporidium* türleri de tanımlanmıştır.

#### 2.4. *Cryptosporidium* Türlerinin Bulunduğu Konaklar

Genel olarak insan dahil olmak üzere birçok memelide, kuşlarda, balıklarda, sürüngenlerde bulunurlar. En yaygın olan iki türünün belli konakları ise şunlardır:

*C. parvum*: Ev hayvanlarında, çiftlik hayvanlarında ve insanlarda,

*C. muris*: Kemirgenlerde, nadiren kedi ve köpeklerde bulunur.

#### 2.5. Coğrafik Dağılışı

Tüm dünyada yayılış göstermektedir.

#### 2.6. Morfolojisi

Üç farklı şekilde görülürler:

- Oositler (kalın duvarlı veya ince duvarlı)
- Schizontlar (4 veya 8 merazoit içerirler, muz şekindedirler)
- Gamontlar

#### 2.7. *Cryptosporidium* İnsanda Enfeksiyon Oluşturur Mu?

*Cryptosporidium* türlerinin 1976 yılına kadar insanda enfeksiyon oluşturduğu bilinmemekteydi. Çünkü bu parazit opportunistic yani fırsatçı bir parazittir. Bağışıklık sistemi kuvvetli olanlarda ilk anda

enfeksiyon oluşturmaz, basit bir ishal meydana getirir. Bağışıklık sistemi zayıfladığı anda devreye girer ve geçirilen enfeksiyon yanında ikincil enfeksiyonlar oluşturur. Özellikle AIDS hastalarında, böbrek dializ tedavisi olanlarda, steroid tedavisi olanlarda, kanser hastalarında vb. bağışıklık sistemi zayıfladığından parazitin oluşturduğu enfeksiyon ölümcül olabilir. Örneğin AIDS hastalarında *C. parvum*'un ikincil ölüm sebebi olduğu tespit edilmiştir.

#### 2.8. Oluşturduğu Enfeksiyonlar

**Enfeksiyonun Adı:** *Cryptosporidium* türleri Cryptosporidiosis denen bağırsak hastalığına neden olurlar. Bu hastalığın yanında başka enfeksiyonlar da oluşturabilirler.

**Enfeksiyon Bölgesi:** Parazitler sindirim sisteminde bulunurlar. Tercih ettikleri bölge ileum'dur. İleum kalabalıklaşmaya başladıktan sonra duodenum, kalın bağırsak, kör bağırsak da enfekte olur. Bağışıklık sistemi zayıf hastalarda midede, safra ve pankreatik kanallarda ve hatta solunum sisteminde de görülür.

**Belirtileri:** En genel belirtisi sulu ishaldir. Bunun yanında abdominal kramplar, mide bulantısı, kusma, ateş, baş ağrısı, iştah kaybı ve kilo kaybı görülebilir.

**Teşhisi:** Dışkı ve çevre numunelerinde *Cryptosporidium* oositlerinin identifikasyonu için Giemsa boyası, Modifiye Ziehl-Nielson Tekniği, Modifiye Kinyoun Acid Fast Teknik, Immunofluorescence (IFA) Tekniği kullanılmaktadır. İnsandaki Cryptosporidiosis teşhisi için ise Enzyme Immunoassays (EIAs) kullanılmaktadır. *Cryptosporidium* türlerini

oositlerin mikroskopik incelenmesi yoluyla ayırt etmek çok zordur. Çünkü oositler farklı türe bile ait olsalar fenotipik olarak aynıdır. Bu nedenle gerek türlerin tam teşhisi, gerekse oluşturdukları enfeksiyonla mücadelede moleküler teknikler kullanılması zorunludur.

**Kimler Cryptosporidiosis Hastalığına Yakalanır, Hastalık Ne Kadar Sürer?** Muhtemelen bütün insanlar bu hastalığa açıktır. Bağışıklık sistemi normal, sağlıklı kişilerde belirtiler 2 hafta yada daha az sürer. Bağışıklık sistemi zayıf kişilerde hastalık daha uzun süreli ve şiddetli geçer. Adeta kronikleşir.

**Hastalığın Bulaşma Şekli Nasıldır?** Enfekte olmuş insan veya hayvanların dışkılarında bulunan dış faktörlere karşı dirençli oositler çevreyi (su, toprak, bitkisel besinler vb.) kontamine eder. Çevredeki oositlerin oral yolla alınmasıyla hastalık bulaşır. Hastalık kontamine olmuş içme sularından, enfekte olmuş ishal kişilerden, tuvalet sonrası kişisel hijyen şartlarına uymayan kişilerden, kontamine olmuş sebze ve meyvelerden vb. bulaşabilir.

**Enfeksiyonu Bir Kez Geçiren Bağışıklık Kazanır Mı?** Enfeksiyonu izleyen birkaç bağışıklık olayı ortaya çıkmıştır. Ancak bu kesin değildir. Önceden enfekte olmuş kişiler bağışık olabilir fakat geniş dozda parazite maruz kaldığında enfeksiyon yenilenir.

**Tedavisi:** Cryptosporidiosis için özel bir tedavi yoktur. Buna rağmen bazı hastalarda paramomycin veya azitromycin gibi bazı antibiyotiklerden cevap alınabilir. Eğer ishal hastalarında dehidrasyon oluşursa oral sıvılara veya intravenöz sıvılara gereksinim duyulabilir. İshal önleyici ilaçlar bağırsak hareketini azaltarak geçici bir süre iyileşme

sağlayabilir. Cryptosporidiosis hastaları sağlık uzmanlarına nasıl bir beslenme diyeti uygulayacaklarını ve ishal belirtilerini nasıl en aza indirebileceklerini danışmalıdırlar.

### **Cryptosporidiosis'e Yakalanmaktan ve Hastalığı Başkalarına Bulaştırmaktan Nasıl Kaçınabilirsiniz?**

1. Tuvaletten sonra, çocuk bezi değiştirdikten sonra veya dışkı materyali ile her ne şekilde olursa olsun eliniz kirlendiğinde ellerinizi iyice yıkayınız.
2. Ağız ve ellerinizin dışkıyla temasını sağlayacak oral ve anal temastan kaçınınız.
3. Sığır gibi çiftlik hayvanlarına dokunmaktan kaçınınız. Bu hayvanlarla çalışmak zorundaysanız eldiven kullanınız veya işiniz bitince ellerinizi iyice yıkayınız.
4. Çiğ süt içmeyiniz. İçeceğiniz sütü en az 1 dakika kaynatınız.
5. Temiz olmayan, evsel atıkların atıldığı nehir ve göllerde yüzmeyiniz.
6. Sebze ve meyveleri yemeden önce iyice yıkayınız.
7. Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri, Meyve şarabı vb. yiyecek ve içecekleri tüketmeyiniz.
8. Kamp yerlerinde veya tanımadığınız yerleri seyahatiniz sırasında işlenmemiş yada yarım yamalak filtre edilmiş yüzey sularını içmeyiniz. Yerel otoritelerin su ile ilgili tavsiyelerine uyunuz.
9. Damıtılmamış veya pastörize edilmemiş şişe sularını kullanmayınız. Şişe sularının sağlık kuruluşlarınca onaylanmış olanlarını tercih ediniz.
10. Çeşme suyunu en az 1 dakika kaynattıktan sonra içiniz. Çeşme suyunu arıtmak için yüksek coagulant veya polymer filtre kullanınız. Filtrenin tıkanmaması için belli

periyotlarla bakımını yaptırınız.

11. Çeşme suyunda dezenfektan olarak klor yerine ondan daha etkili ozon gibi dezenfektanlar kullanınız.

### 3. *Cryptosporidium* TÜRLERİNİN TANIMLANMASINDA YENİ BİR YAKLAŞIM: RİBOTİPLENDİRME

Kok grubu parazitlerden olan *Cryptosporidium* 'ların dünya çapında diare hastalıklarının sebebi olduğu anlaşılmıştır. Enfeksiyon Amerika ve İngiltere'de genel olarak içme suyu ile oral yoldan bulaşmaktadır. Bu parazit insanda ishalden başka önemli enfeksiyonlara da yol açmaktadır. Bu nedenle parazitin türlerinin tanımlanması çok önemlidir. Yakın zamana kadar kullanılan rutin diagnostik tekniklerle dışkıdan elde edilen oositler ışık mikroskopuyla tanımlanıyordu. Bu şekildeki tanımlamalar da tam doğru sonuçlar vermiyordu. Bu nedenle *Cryptosporidium* 'ların tanımlanmasında moleküler metodlar kullanılmaya başlandı. Bu metodlardan biri de ribotiplendirme yada diğer bir adıyla moleküler tiplendirmedir.

#### 3.1. Moleküler Tiplendirme

Sistematik veya hastalıkları teşhis amaçlı olarak elde edilen izolatların tiplendirilmesinde, yakın zamana kadar, genellikle fenotipik özellikler esas rol oynamıştır. Ancak, fenotipik karakterlerin stabil olmaması ve çeşitli nedenlerle değişebilmesi, değerlendirmelerin yanlış sonuçlara ulaşmasına neden olmaktadır. Oysa son yıllarda geliştirilen moleküler metodlar arasında yer alan lipopolisakkarit, yağ asitleri, protein ve nükleik asit analizleri çok daha geçerli sonuçlar sağlamaktadır. Moleküler

teknikler arasında en önemli olanları, genotipik yöntemlerin kullanıldığı ve mikroorganizmaların genomlarını esas alan, DNA bazlı nükleik asit analizleridir. Bunlar daha Sistematik veya hastalıkları teşhis amaçlı olarak elde edilen izolatların tiplendirilmesinde, yakın zamana kadar, genellikle fenotipik özellikler esas rol oynamıştır. Ancak, fenotipik karakterlerin stabil olmaması ve çeşitli nedenlerle değişebilmesi, değerlendirmelerin yanlış sonuçlara ulaşmasına neden olmaktadır. Bunlar daha stabil genetik karakterlere dayandığı için güvenilir sonuçlar vermektedir.

Moleküler tiplendirme metodları arasında:

1. Plasmid DNA analizi
2. Genomik DNA restriksiyon analizi
3. Prob hibridizasyon teknikleri
4. PFGE (Pulsed field gel elektroforesis)
5. Gen sekans analizleri
6. PCR'a dayalı tiplendirmeler (PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-REP, PCR-AFLP vb.)
7. Ribotiplendirme yer almaktadır. Bu çalışmada ribotiplendirme üzerinde durulacaktır.

#### 4. RİBOTİPLENDİRME (RİBOSOMAL DNA ANALİZ TEKNİĞİ)

Son 10-15 yıldır bakterileri tiplendirmede kullanılan yöntemler arasında, 16S ve 23S rRNA'ları kodlayan genleri (DNA sekansları) ortaya koymaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu teknik diğerlerinin noksan taraflarını kısmen de olsa gidermeyi amaçlamaktadır. Şöyleki;

- Fenotipik özellikleri belirlemeye dayalı



testler, bu karakterlerin çok değişken olmaları nedeniyle pek güvenilir sonuçlar vermez.

- RFLP analizleri de, oluşan bantların çok fazla olması nedeniyle band patternlerinin çok iyi ve kesin yorumlanamamasına neden olur.
- Hibridizasyon teknikleri de, kullanılan spesifik ve işaretli problemlerin sadece bir ajana veya onun belli ve çok küçük bir sekansına yönelik olması nedeniyle sınırlayıcı bir rol oynamaktadır.
- Oysa ribozomal RNA'ları (rRNA: 16S ve 23S rRNA) kodlayan genler, evolüsyon sırasında çok fazla korunduğundan daha stabil bir durum göstermektedir. Ayrıca, bunlar bütün bakterilerde de çok fazla miktarda bulunmaktadır. Bakterilerin total DNA süspansiyonları da, rRNA'lara karşı hazırlanmış işaretli ve spesifik problemlerle de reaksiyon verebilmektedir. Bakteri kromozomlarında rRNA genlerinin de birden fazla kopyası bulunmaktadır. Bu nedenle rRNA'lar için hazırlanan işaretli ve spesifik problemler hibridizasyonlarda, üzerinde bulunan rRNA genleriyle kolayca birleşebilmekte ve bunlar da otoradiografi ile (veya diğer tekniklerle) ortaya konabilmektedir. Bunların yanı sıra fazla olmayan (7-12) band desenlerini analiz etmek ve değerlendirmekte kolay olmaktadır. Ethidium bromide ile yapılan boyamalarda bantları kolayca görebilmek ve yorumlamak kolay olmaktadır.

Ribotiplendirmede farklı problemlerden yararlanılır. Şöyleki; rRNA'ların bizzat kendilerinin yanı sıra, içine rRNA geni klonlanmış plasmidlerin taşıdığı rekombinant

problemler, *E. coli*'ye ait 16S rRNA ve 23S rRNA'ların mRNA'larından reversal (ters) transkripsiyonla elde edilen cDNA'lardan hazırlanan cDNA problemleri, ayrıca eukaryotlarda ise 18S rRNA problemleri de kullanılabilir.

Ribotiplendirme bakterileri rRNA'daki farklılıklarına dayalı olarak tanımlamaya ve sınıflandırmaya dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem tür kategorisinin ötesinde bakterileri direkt cinsinden sınıflandırmada kullanılan kesin bir parmak izidir. Bu teknikte bakteri kolonisinden DNA ekstrakte edilir. Sonra farklı ölçülerdeki fragmanlar sınırlanır. Daha sonra DNA bir membrana transfer edilir ve rRNA geninin kalıbını ortaya çıkarmak için rRNA operonunun bir bölgesi ile problemler. Kalıp kayıtlarını, sayısallaştırılır ve bir veri tabanı içinde depolanır. Her iki pozisyondaki bakteriler arasında varyasyonlar vardır ve rRNA bantlarının yoğunluğu bakterilerin tanımlanmasında kullanılabilir. Ribotiplendirme, çeşitli mikroorganizma cinslerine ait türlerin taksonomik ve alt gruplarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Örneğin, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* vb.

Ribotiplendirme, tüketim ürünleri ve diğer bütün kaynaklardan izole edilen bakteriler arasındaki ilişkilerin anlaşılır şekilde kurulmasına izin verir. Bu açıdan kontamine olmuş yiyeceklerin tanımlanmasında ve yok edilmesinde önemlidir. Ayrıca bir grup hayvan içinde bir enfeksiyonun yayılması da ribotiplendirme ile izlenebilir ve enfeksiyonun bulaşma yolu tanımlanabilir. Dolayısıyla ribotiplendirme moleküler epidemiology açısından çok önemlidir. Ribotiplendirme kalıpları bir çok bakterinin identifikasyonunda kullanılır. Halen Gr+ ve Gr- bakterileri

tanımlamakta kullanılan 600'den fazla kalıp vardır.

Avrupa'da özellikle *Cryptosporidium parvum* üzerinde çeşitli moleküler çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda RAPD-PCR, RFLP ve Ribotiplendirme gibi farklı metotlar kullanılarak tür tayininde başarılı yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Patel ve arkadaşları, 1999:7; Morgan, 1999: 6; Kevin, 1998:4; Morgan, 1996: 6).

*Cryptosporidium* türleri olan *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. muris* ve *C. baileyi* için 18S rRNA gen sekans bilgisi mevcuttur. Bu sekansların daha önce yapılan multiple sekans analizleri düşük eukaryotik rRNA için universal primerlerle birlikte *Cryptosporidium* türleri için özgül primerler tanımlanmıştır. Hatta geliştirilen amplifikasyon şartları bu türlere özgül rRNA gen sekanslarına benzer olduğu için bu ikisini bir multiplex polimeraz zincir reaksiyonu formatında birleştirmek mümkün olabilir. *C.parvum* ve *C. wrairi* özgül hedef bölgede benzer rDNA sekanslarına sahiptir. Böylece bu metod kullanılarak ayırt edilemezler. Ancak bu iki tür *Cryptosporidium* dış duvar proteini (COWP) geninin PCR restriksiyon fragmanı uzunluğu polymorfizmi analizi (RFLP) ile ayırt edilebilir. COWP geni için aynı PCR/RFLP tekniği aynı zamanda *C.parvum*'un iki genotipini de ayırt edebilir (Patel ve arkadaşları, 1999:7). *Cryptosporidium* türlerini tanımlama için ribotiplendirmede dayanan temel, 18S rRNA gen sekanslarının multiplex PCR reaksiyonudur.

Bakır ve arkadaşları (2003:4), Ankara'daki içme suyu kaynaklarındaki parazitleri incelemişlerdir. Çalışmalarında 85 su örneğini

incelemişlerdir. Bunlardan 43 tanesi yerel su kaynağı, 34 tanesi kuyular, 6 tanesi Ankara Irmağı ve 2 tanesi bent suyu örneğidir. 85 istasyondan topladıkları su örneklerinde *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* ve *Entamoeba histolytica* gibi parazitler ve oositleri ışık mikroskobu ile ve Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Bakır ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucunda 34 kuyu suyundan 2 tanesinde *Giardia lamblia* ve 6 Ankara Nehri örneğinden 3 tanesinde; *Entamoeba histolytica* ve *Strongyloides stercoralis* larvası, *Trichuris trichura* yumurtaları ve *Cryptosporidium parvum* oositi tespit etmişlerdir.

Alves ve arkadaşları (2003:4), enfekte olmuş insan, sığır ve diğer geniş getiren hayvanlardan izole ettikleri *Cryptosporidium* türlerini PCR ve DNA Sekans Analizi yoluyla incelemişler ve *Cryptosporidium* türlerinin çok geniş bir alellik farklılık gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Peng ve arkadaşları (2003:6), enfeksiyona yakalandığı bilinen 248 inek, 17 insan ve 16 su örneğinden 1997-2000 yılları arasında aldıkları numuneleri moleküler yöntemler kullanarak incelemişlerdir. Bunun sonucunda 34 inek dışkı örneğinde 6 *Cryptosporidium parvum* alt genotipi bulmuşlardır. Ayrıca 4 insan dışkısında ineklerde bulunan *Cryptosporidium parvum* genotipi ve iki insan *Cryptosporidium parvum* genotipini tespit etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda moleküler metotların *Cryptosporidium* bulaşmasını takip etmede ve teşhiste önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Scorza ve arkadaşları (2003:4) kedi

dışısından izole ettikleri *Cryptosporidium* oositlerini tanımlarken PCR yöntemi ile IFA (Immunofluorescence Assay) yöntemini kullanmışlar ve PCR yönteminin IFA'dan daha hassas sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

Gatei ve arkadaşları (2003:5), *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanmasında 840 baz çiftine sahip olan 18S rRNA genini kullanmışlardır. Yapmış oldukları genotiplendirme sonucunda 4 tip *Cryptosporidium* tanımlamışlardır. İzolatların %75'ini *Cryptosporidium parvum* insan genotipinde, %21.7'sini *Cryptosporidium parvum* inek genotipinde, 1.6'sını *Cryptosporidium meleagridis* genotipinde, %1.6'sı *Cryptosporidium muris* genotipinde tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda 18S rRNA gen lokusu kullanılarak yapılan genotiplendirmenin filogenetik analizlerde kolaylık sağlayabileceği rapor edilmiştir.

Mevcut *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanması için geliştirilen birçok teknik vardır. Genellikle kullanılan teknikler arasında izoenzim analizleri, Western Blothing, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis (RAPD-PCR), Polymerase Chain Reaction Fragment length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis ve PCR ve DNA Sequencing yer almaktadır. Son çalışmalarda küçük ribizomal RNA alt ünitesini kodlayan bölge (SSU-rRNA) taksonomik sınıflandırmalarda kullanılmaya başlamıştır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda inek ve insanlardan izole edilen *Cryptosporidium parvum*'un iki genotipinin varolduğu bulunmuştur. Bu iki genotip SSU-rRNA kodlayan bölgeleri bakımından birbirlerinden farklıdır. *Cryptosporidium* genotip I yalnızca insanlara bulaşır ve insanda enfeksiyon oluşturur. Fakat Hayvansal olan

genotip II hem insanlara hem de inek, koyun, sığır, at vb. çiftlik hayvanlarına bulaşmaktadır. Ayrıca yine yakın zamanda yapılan çalışmalar sonucunda başka hayvanlarda (domuz, fare, kedi, ve koala) yeni *Cryptosporidium* genotipleri de SSU-rRNA'yı kodlayan bölgenin sekansı yoluyla tanımlanmıştır (Norman ve arkadaşları, 1990:5).

## 5. SONUÇ

Son zamanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları hakkındaki bilgiler, çeşitli araştırmacılar tarafından bir araya getirilmiştir. Bunun sonucunda enfeksiyonlar hakkındaki veriler çarpıcı şekilde artmış, ancak hastalığa karşı etkili kemoterapotiklerin henüz saptanamaması, yeryüzünde yaygın olan enfeksiyonlara ilginin sürmesine neden olmuştur. Bu çalışma sayesinde çok önemli hastalıklara sebep olan *Cryptosporidium* paraziti hakkında daha fazla bilgi edinilebilecek ve hastalıktan korunma yolları hakkında bilgi sahibi olunabilecektir. Sonuç olarak; insan dahil birçok hayvan grubunda parazit olarak yerleşebilen ve en ufak bir bağışıklık sistemi aksamasında çabucak faaliyete geçerek konağın immün sistemini tamamen zayıflatan ve hatta öldüren *Cryptosporidium* türlerinin filogenetik analizi yapılmalı ve türlerin tanımlanmasında başarılı moleküler yöntemler geliştirilmeye çalışılmalıdır. Bunun sonucunda bu fırsatçı parazite müdahale yolları aranabilir. Ribotiplendirme de *Cryptosporidium* türlerinin filogenetik analizinde kullanılabilecek uygun tekniklerden biridir.

**6. KAYNAKLAR**

- Alves, M., Xiao, L.H., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003, Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates From Humans, Cattle, and Zoo Ruminants In Portugal Journal of Clinical Microbiology. 41 (6): 2744-2747.
- Angus, K.W., Appleyard, W.T., Menzies, J.D., Campbell, L. and Sherwood, O., 1982, An Outbreak of Diarrhoea Associated with Cryptosporidiosis in Naturally Reared Lambs. Vet Rec., 110: 129-130.
- Aydın, Y., 1991, Laboratuvar Hayvanlarında Deneysel Cryptosporidiosis: Patolojik Bulgular ve Cross-Transmission Çalışmaları. A.Ü. Vet. Fak. Dergisi, 38(3) 465-482.
- Aydın, Y., Özkul, L. A., 1996, Infectivity of *Cryptosporidium muris* Directly Isolated From The Murine Stomach for Yariolis Laboratory Animals. Veterinary Parasitology, 66, 257-262.
- Bakır, B., Tanyuksel, M., Salyam, F., Tanriverdi, S., Araz, R. E., Hacim, A. K., Hasde, M., 2003, Investigation of Waterborne Parasites in Drinking Water Sources of Ankara, Turkey Journal of Microbiology . 41(2): 148-151.
- Casemore, D. P., Sands, R. L. And Cuny, A., 1985, *Cryptosporidium* Species A "New" Human Pathogen. J. Clin. Pathol., 38: 1321-1336.
- Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. Y., Bailey, W. S., Heyman, M. B. and Weinstein, M., 1983, Human Cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. N. Eng. J. Med., 308: 1252-1257.
- Current, W. L., 1985, Cryptosporidiosis. J. Am. Vet Med. Assoc., 187: 1334-1338
- Fayer, R. and Ungar, B. L. P., 1986, *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiol. Rev., 50: 458-483.
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P., 1997, The General Biology of *Cryptosporidium*. in: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton CRC Press, 1-41.
- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R.W., Cuevas, L.E., Parry, C.M., Cunliffe, N.A., Beeching, N.J., Hart, C.A., 2003, Molecular Analysis of the 18S Rna Gene of *Cryptosporidium* Parasites From Patients With or without Human Immunodeficiency Virus Infections Living in Kenya, Malawi, Brazil, The United Kingdom, And Vietnam. Journal of Clinical Microbiology. 41 (4): 1458-1462.
- Kevin, V. S., 1998, Randomly Amplified Polymorphic DNA PER Analysis of Bovine *Cryptosporidium Parvum* Strains Isolated from the Watershed of The Red River of The North. Appl. Environ. Microbiol. 6: 64, 2262-2265.
- Kirby, R. M., Bartram, J., Carr, R., 2003, Water in Food Production and

- Processing: Quantity and Quality Concerns. *Food Control*. 14(5): 283-299.
- Morgan, UM., 1996, The Development of Diagnostic PER Primers for Cryptosporidium Using RAPD-PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 77: 103-108.
- Morgan, UM., 1999, Phylogenetic Analysis of Cryptosporidium Isolates from Captive Reptiles Using 18S rDNA Sequence Data and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Parasitology*. 85: (3) 525-530.
- Moson, RW., Hartley, WJ. and Tilt, L., 1981, Intestinal Cryptosporidiosis in A Kid Goat. *Aust Vet J.*, 57 : 386-388.
- Navin, T.R. and Juranek, D. D., 1984, Cryptosporidiosis Clinical, Epidemiologic, and Parasitologic Review. *Rev. Infectdis.*, 6: 313-327.
- Norman, JP., Fernando, JB., Slemenda, SB., Silva, A., Moura, NS., Arrowood, M., Ditrich, O., and Addiss, D., 1990, New Cryptosporidium Genotypes in HIV-Infected Persons. *Emerging Infectious Diseases*. 5, 3, 1-6.
- Odonoghue, P.J., 1985, Cryptosporidium Infections in Man, Animals, Birds and Fish. *Aust Vet.J.*, 62: 253-258.
- Özkul, LA., Alçıgır, G., Karaer, Z., Kutsal, O., 1991, Bursal Cryptosporidiosis in Chickens in Marek's Disease. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi (Doğa)*, 16, 1-9.
- Özkul, LA., Aydın, Y., 1994, Small-İntestinal Cryptosporidiosis in a Young Pigeon. *Avian Pathology*, 23, 369-372.
- Patel, S., Pedraza-Diaz, S., and McLauchlin, J., 1999, The Identification of Cryptosporidium species And Cryptosporidium parvum Directly From Whole Faeces by Analysis of a Multiplex PER of the 18S Rrna Gene and by PCR/RFLP of the Cryptosporidium Outer Wall Protein (COWP) Gene. *International Journal for Parasitology* 29, 1241-1247.
- Peng, MM., Wilson, ML., Holland, RE., Meshnick, SR., Lal, AA., Xiao, L., 2003, Genetic Diversity of Cryptosporidium spp. in Cattle in Michigan: Implications For Understanding The Transmission Dynamics. *Parasitology Research*. 90(3): 175-180.
- Reese, N. C., Erinent, W.L, Ernst., J. and Bailey, W.S., 1982, Cryptosporidiosis of Man and Calf : A Case Report and Results of Experimental Infections In Mice And Rats. *Am J.Trop. Med. Hyg.*, 31: 226-229.
- Scorza, AV., Brewer, MM., and Lappin, MR., 2003, Polymerase Chain Reaction for The detection of Cryptosporidium Spp. In Cat Feces. *Journal of Parasitology*. 89 (2): 423-426.
- Sherwood, D., Angus, K.W., Snodgrass, D.R. and Tzipori, S., 1982, Experimental Cryptosporidiosis in Laboratory Mice. *Infect.Immun.*, 38: 471-475.

- Tyzzer, E.E., 1907, A Sporozoan Found in The Peptic Glands of The Common Mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 5: 12-13
- Tyzzer, E.E., 1910, An Extracellular Coccidium *Cryptosporidium muris* of The Gastric Glands of The Common Mouse. J.Med.Res., 23: 487 – 509
- Tyzzer, E.E., 1912, *Cryptosporidium Parvum* A Coccidium Raund in The Small Intestine of The Common Mouse. Arch. Protistenkd., 26 : 394-412.
- Tzipori, S., Anglis, K.W., Campbell, I. and Gray, E.W., 1980, *Cryptosporidium* Evidence for a Single-Species Genus. Infect. Immun., 30: 884-886.
- Tzipori, S., Angus, K.W., Gray, E.W., Campbell, I. and Allan, F., 1981, Diarrhea in Lambs Experimentally Infected With *Cryptosporidium* Isolated From Calves. Amj.Vet. Res., 42: 1400-1404.
- Tzipori, S., Larsen, J., Smith, M. and Lugfl, R., 1982, Diarrhoea in Kids Attributed to *Cryptosporidium* infection. Vet Rec., III: 35-36.
- Tzipori, S., 1983, *Cryptosporidiosis* In Animals and Humans. Microbiol. Rev., 47: 84-96.
- Yu, JR. and Park, WY., 2003, The Effect of Gamma-Irradiation on The Viability of *Cryptosporidium parvum*. Journal of Parasitology, 89(3): 639-642.