

Erzincan İli Farklı Su Kaynaklarından *Cryptosporidium spp*' nin Moleküler Yöntemlerle Tespit Edilmesi

Nalan YILDIRIM DOĞAN^{1*} , Seçil YALÇIN¹, Neriman MOR²

¹ Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

² Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Kars, Türkiye

Geliş / Received: 17/10/2017, Kabul / Accepted: 08/05/2018

Öz

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

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

Determination of *Cryptosporidium spp* by Molecular Methods in Different Water Resources of Erzincan Province

Abstract

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

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

1. Giriş

Su, en küçük organizmadan, en büyük canlıya kadar, bütün biyolojik yaşamın ve canlılık aktivitelerinin devamlılığını sağlar. Fakat günümüzde kullanılabilir su kaynakları

süratle kirlenmekte ve çeşitli sebeplere bağlı olarak yetersiz kalmaktadır (Taş vd., 2010). Su kaynaklarındaki kirliliğin artması ile dünyada ki nüfusun yaklaşık olarak %20'si güvenilir olmayan içme suyu kullanmakta ve buna bağlı olarak içme ve kullanma suları ile

çeşitli hastalıkların insanlara bulaşma olasılığı da artmaktadır (Irmak 2008). Su ile bulaşan hastalıkların en önemli grubunu hastalık etkeninin suya karışması neticesinde oluşan hastalıklar oluşturmaktadır. Bu hastalıklar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hala önemli sağlık sorunu olma özelliklerini sürdürmektedirler (Kaypmaz vd., 2001). Su kaynaklı patojenler arasında yer alan *Cryptosporidium*' un insan sağlığı açısından büyük endemik salgınlara, hayvancılıkta ise büyük ekonomik kayıplara neden olduğu ortaya konulmuştur (Current ve Bick 1989, Spano ve Crisanti 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarla *Cryptosporidium* ookistlerinin kirlilik oluşturabilecek yoğunlukta çevrede bulunuyor olması, ookistlerinin büyüklüklerinin içme suyu arıtma tesislerinin filtrelerinden geçecek kadar küçük (4-6 µm) olması nedeni ile şehir şebeke suyuna kolaylıkla karışması, klor gibi su dezenfeksiyonunda kullanılan dezenfektan maddelere dirençli olması, nemli ve soğuk ortamlarda canlılık ve enfektivitesini uzun süre koruyabilmesi ve enfeksiyon dozunun düşük olması gibi özelliklerinden dolayı suyla geçen en önemli patojenlerden biri haline gelmiştir. Bu nedenle halk sağlığı açısından da önemli bir yere sahip olmuştur. (Eckert,2005; Ardıç 2007). *Cryptosporidium* türleri ilk defa Clarke tarafından 1885 yılında fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri şeklinde tarif edilmiştir (Fayer ve Ungar, 1986; Current ve Garcia, 1991; Ok vd., 1995). 1905 yılında ise Ernest Edward Tyzzer tarafından farelerin gastrik mukoza hücrelerinde gösterilmiş ve diğer *Coccidia* cinslerinden farklı olarak ookistlerinin içinde sporokistlerinin olmaması nedeniyle eski Yunancada hidden sporocysts (saklı kist) anlamına gelen *Cryptosporidium* olarak isimlendirmiştir (Casemore vd., 1985; Hashwey vd., 1997). Oluşturduğu hastalığa ise Criptosporidiosis adı verilmiştir(Fayer ve Ungar, 1986; Yücel, 1989). Cryptosporidiosis, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan, kanatlıları, balıkları, sürüngenleri ve memelileri kapsayan 200'ü aşkın hayvan türünde görülen zoonoz bir

hastalıktır (Ergüven vd.,1998, Gödemerdan vd., 1999 ; Altıntaş, 2002; Miller vd., 2003). Enfeksiyon 10 ookist alımıyla başlayabilmekte ve inkübasyon süresi 5 ila 28 gün arasında değişmektedir. İleum ve jejunum tutulumu sonucunda şiddetli ishalin yanında, baş ve kas ağrıları, hafif ateş, halsizlik, kuvvet ve iştah kayıplarının da hastalığın semptomları arasında olduğu bildirilmiştir (Cheng vd., 2009; Dorny vd., 2009). Hastalığın tedavi olmadan da klinik belirtilerinin birkaç gün ve birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebileceği bildirilmiş olmasına rağmen, immün yetmezliklerde klinik tablo değişebilmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007; Dorny vd., 2009). Ülkemizde de hem immün sistemi sağlam, hem de immün sistemi baskılanmış kişiler de çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalara dayanarak *Cryptosporidium*' un önemli bir gastroenterit nedeni olduğu belirlenmiştir (Yıldız vd., 2001; Delibaş vd, 2001; Aksoy vd, 2003;). Bu zamana kadar dünyada kirli içme suyunun tüketimi, kirli sularda yüzme ve diğer eylemlere bağlı olduğu bilinen su kaynaklı çok sayıda cryptosporidiosis salgını kaydedilmiştir (Prescott, 2002; Eckert, 2005). Amerika Birleşik Devletleri' ndeki (USA) su kaynaklı salgınlara bakıldığında kayıtlara geçen en önemli salgının 1993' te Milwaukee' de yaşandığı bilinmektedir. Milwaukee salgını kayıtlara geçen en büyük su kaynaklı salgın olup, salgın sırasında kanalizasyon örneklerinde %90 oranında, nehir suyu örneklerinde %75 oranında ve içme suyu örneklerinde %28 oranında *Cryptosporidium* ookistlerin varlığı gösterilmiştir. Şehirde yaşayan AIDS' li kişilerin %50' sinin *Cryptosporidium* ile enfekte olduğu ve 68 kişinin 6 ay gibi bir sürede yaşamlarını yitirdiği bildirilmektedir (Mac Kenzie vd., 1994; Eisenberg vd.,2005). Yine 1984 yılında Texas'ta 5.900 kişinin yaşadığı bir yerleşim merkezinin iki ayrı noktasında cryptosporidiosis salgını görülmüştür. Bu iki merkeze içme suyunun aynı artezyen kuyusundan sağlandığı, suyun filtrelenmeden dolaşıma verildiği, ancak şebekeye

verilmeden hemen öncesinde klorlama yapıldığı saptanmıştır. Salgından sonra boya testleri yardımı ile kanalizasyon atıklarının içme suyuna karıştığı kesin olarak tespit edilmiş ve karışımın düzenli olmayan aralıklarla gerçekleştiği anlaşılmıştır. Fakat kanalizasyon atıklarının içme suyuna karıştığı nokta belirlenememiştir (Butler ve Mayfield, 1996).1987 yılında ise Batı Georgia'da tahminen 13.000 kişinin etkilendiği salgında içme suyu kriterlerinin zamanın federal ve eyalet standartlarına uygun olduğu saptanmış fakat 489 kişinin gaitasına bakıldığında %61' i *Cryptosporidium* pozitif olarak bulunmuştur. Alternatif içme suyu kullanan 322 kişiden %20' sinde *Cryptosporidium* pozitif olarak belirlenmiştir (Butler ve Mayfield, 1996; Dietz vd., 2000). Clitheroe' de (Lancashire, İngiltere) 2000 yılı Mart ayında ortaya çıkan cryptosporidiosis salgınına bakıldığında, 58 kişinin bu salgından etkilenmiş olduğu ve bu salgına epidemiyolojik çalışmalarla, hayvan dışkıyla temas halinde olduğu belirlenen musluk suyunun sebep olduğu tespit edilmiştir (Howe, 2002). Yurt dışından bildirilen sudan kaynaklanan *Cryptosporidium* salgınlarının yanında, ülkemizde de bu tür salgınların olabileceği fakat bu konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Usluca ve Aksoy, 2006). Çalışmamız bu ihtiyaca yönelik olarak Erzincan ili içme ve kullanma suyu örneklerinde *Cryptosporidium spp*' nin varlığını PCR ve LAMP moleküler yöntemleri ile göstererek, elde edilen veriler ile toplum sağlığının korunması, iyileştirilmesi ve yaşam kalitesinin artırılmasına katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

2. Materyal ve Method

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

2.1. Filtrasyon

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

2.2. Örneklerin saflaştırılması (sükroz sradient yöntemi)

0.1 M PBS (fosfat tamponu) (pH: 7,2) ve sükroz çözeltisi (500 g sükroz, 6,5 g fenol, 320 ml saf su) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler kullanılarak sükroz/PBS oranı 1/2 olan A solüsyonu ve sükroz/PBS oranı 1/4 olan B solüsyonu hazırlanmıştır. A ve B çözeltilerine en fazla 4'er damla % 1' lik tween 80 damlatılmıştır. 50 ml' lik steril falkon tüpünün içine önce 15 ml A solüsyonu konulup üzerine de 15 ml solüsyon B eklenerek gözle görülebilir bir faz elde edilmiştir ve bu fazın üstüne 10 ml su örneği dikkatli bir şekilde konulup ikinci bir tabakanın oluşması beklenilmiştir. 1200 x g'de 30 dk 4 °C de santrifüj edildikten sonra en üstte yaklaşık 10 ml' lik ilk görünen üst tabaka atılmıştır. Atılan tabakanın altında mevcut olan yaklaşık 5-10 ml' lik ikinci tabaka temiz bir falkon tüpüne alınmıştır. Üzeri saf su ile 50 ml' ye tamamlanıp 2100 x g' de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra yaklaşık 2 ml' lik pellet tüpün dibinde kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Tekrar üzeri saf su ile 50 ml' ye tamamlanmıştır ve 2100 x g' de 10 dk santrifüj edilmiştir. Yaklaşık 2 ml' lik pellet tüpün dibinde kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Bu pellet DNA ekstraksiyonunda uzun süreli kullanım için buzdolabında -20 °C' de saklanmıştır.

2.3. DNA izolasyonu

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

2.4. PCR tekniği

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

Tablo 1. PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri.

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

Tablo 2. PCR ısı protokolü.

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

2.5. LAMP tekniği

LAMP reaksiyonu için Optigene İzothermal Amplification Mix (Kat.No. ISO-001) kullanılmıştır. 15 µl 1 X LAMP reaksiyon tamponu 5 µl primer karışımı [FIB, BIP (20 pmol), F3, B3 (5 pmol), LB, LF (10 pmol)],

5 µl örnek eklenerek reaksiyon karışımı 25 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı vortekslenip PCR cihazında 63°C'de 1 saat, 85°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Her bir test için pozitif ve negatif kontroller

kullanılmıştır. Oluşan ürünler ethidium bromidle boyanmış %1' lik agaroz jele yüklenmiştir. Jel elektroforezde 100 V'da 60 dk yürütüldükten sonra UV altında bantlar görüntülenmiştir. *C. parvum* için kullanılan

LAMP primerleri SAM-1 genine ait olup gen dizilimi Tablo 3' de belirtilmiştir.

Tablo 2. LAMP reaksiyonu için kullanılan primer dizileri (Kaya, 2011).

Primer tipi	Sekans (5'-3')	Uzunluk	Hedef
F3	ATTTGATRGACAAAGAACTAG	22	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C. hominis</i> ve <i>C. meleagridis</i>
B3	CGATTGACTTTGCAACAAG	19	
FIP(F1c-F2)	TTGCGCCCTGTTAATCCAGCAT- TAATTAATCCATCTGGCAGRTT	45	
BIP(B1-B2c)	TTGTAGATACATACGGAGGATGGG TCTACTTTAGTTGCATCTTTCC	46	
LF	CTGCTGGCCCMCCAATTG	18	
LB	CATGGRGGTGGTGCATTTAG	20	

3. Bulgular

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

içme ve kullanma suyu örneği toplanmıştır. Çalışmada *Cryptosporidium* türleri, LAMP ve PCR yöntemleriyle tanımlanmış ve bu iki yöntemin sonuçları kıyaslanmıştır. Aylara göre PCR ve LAMP analizi sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 4, 5, 6, 7, 8, 9' da verilmiştir. Ayrıca PCR tekniği jel görüntüleri Şekil 1'de, LAMP tekniği jel görüntüleri de Şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 4. Mart ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları.

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

Tablo 5. Nisan ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları.

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

Tablo 6. Mayıs ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları.

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

Tablo7. Haziran ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları.

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

Tablo 8. Temmuz ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları.

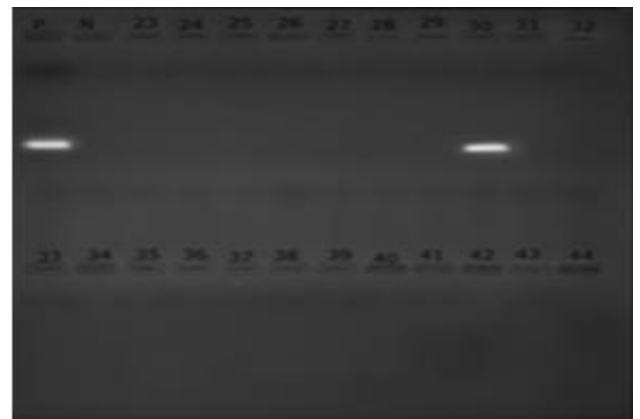
Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP	Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP
99 Sarıkaya Köyü	-	-	110 Yukarıyeniköy Köyü	-	-
100 Kuzuören Köyü	-	-	111 Kozluca Köyü	-	-
101 Dallıca Köyü	-	-	112 Çatlı Köyü	-	-
102 Karacaören Köyü- Tercan	+	+	113 Üçören Köyü	-	-
103 Göktaş Köyü	-	-	114 Kozören Köyü	-	-
104 Çatak Köyü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

Tablo 9. Ağustos ayında toplanan numunelerin PCR ve LAMP analizleri karşılaştırmalı sonuçları.

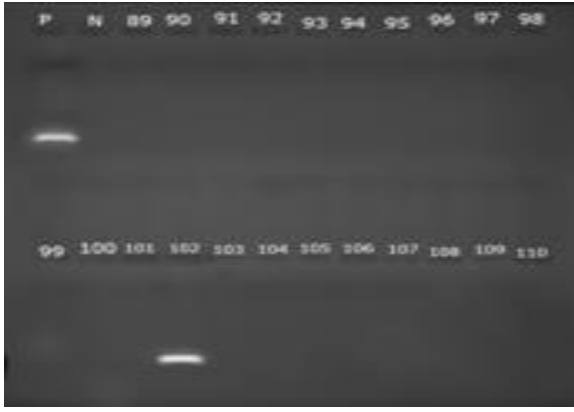
Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP	Numune Alınan Noktalar	PCR	LAMP
121 Sütlüce Köyü	-	-	131 Altköy Köyü	-	-
122 Yalngöz Köyü	-	-	132 Sütınar Köyü	-	-
123 Küçükgümüşlü K.	-	-	133 Tandırlı Köyü	-	-
124 Yılmaz Köyü	-	-	134 Topalhasan Köyü	-	-
125 Biçer Köyü	-	-	135 Gönye Köyü	-	-
126 Alapınar Köyü	-	-	136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



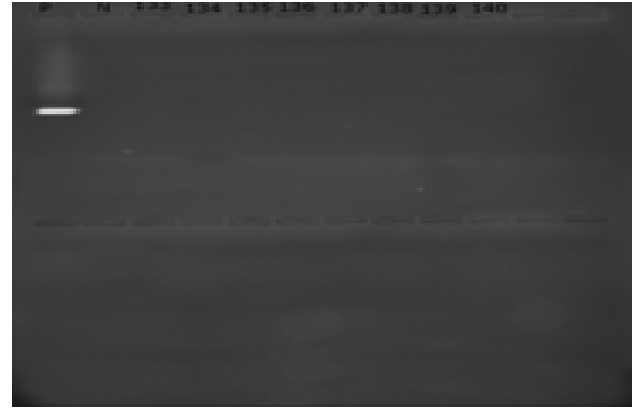
(A)



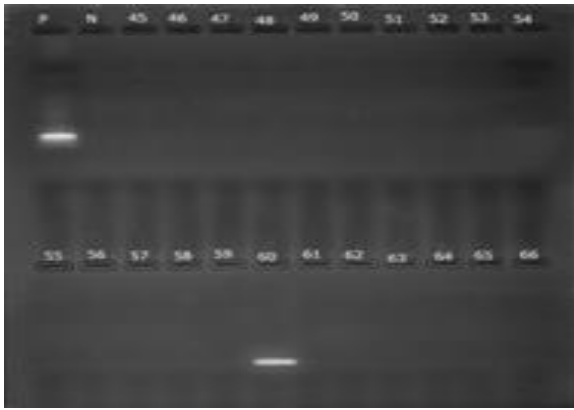
(B)



(C)



(G)



(D)

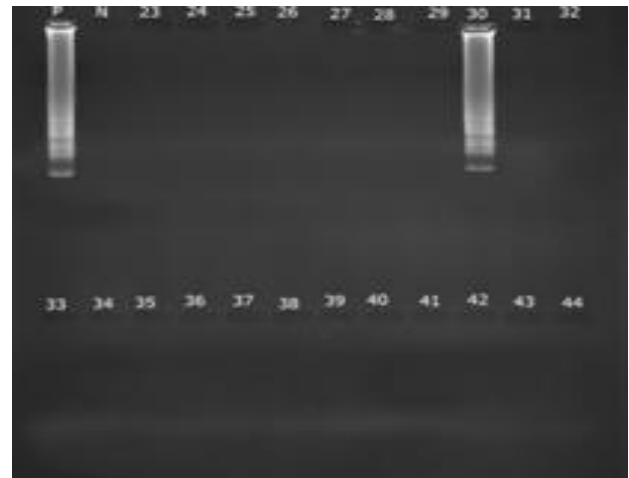
Şekil 1. PCR Tekniği Jel Görüntüleri A:1-22 P pozitif, N negatif, B:23-44, C:45-66,D:67-88, E:89-110, F:111-132, G:133-140.



(A)



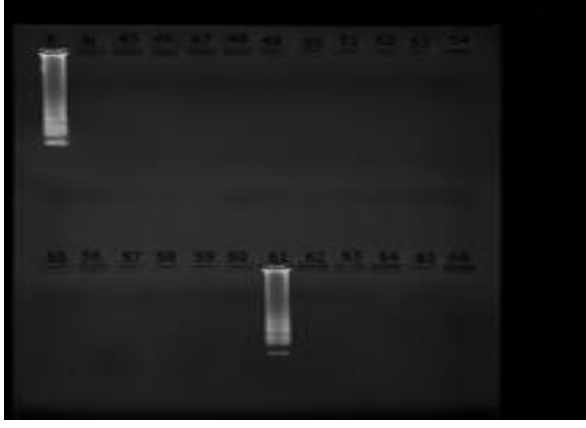
(E)



(B)



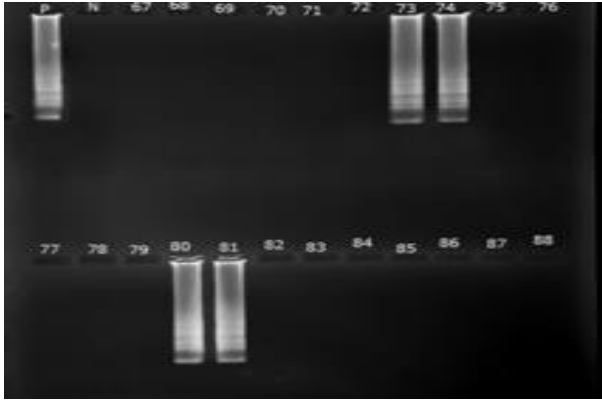
(F)



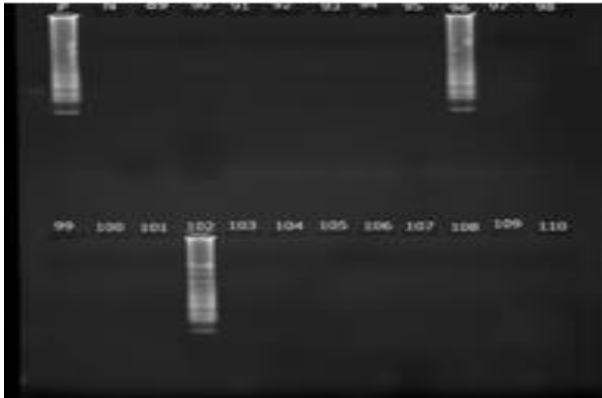
(C)



(G)



(D)



(E)



(F)

Şekil 2. LAMP Tekniği Jel görüntüleri A:1-22 P pozitif, N negatif, B:23-44, C:45-66, D:67-88, E:89-110, F:111-132, G:133-140.

4. Sonuç ve Tartışma

Çalışmamız sonucunda PCR tekniği ile il merkezine bağlı Yeşilçat köyü, İliç ilçesine bağlı Bağıştaş ve Ortatepe köyleri, Tercan ilçesine bağlı Esenevler, Küçükağa ve Karacaören köylerinden alınan sular *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunurken, LAMP tekniği ile il merkezine bağlı Yeşilçat köyü, İliç ilçesine bağlı Bağıştaş ve Ortatepe köyleri, Kemah ilçesine bağlı Atma ve Aktaş köyleri, Tercan ilçesine bağlı Sağlıca, Esenevler, Küçükağa ve Karacaören köylerinden alınan sular *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunmuştur. Erzincan ilinine bağlı ilçe ve köylerde en önemli geçim kaynağı tarım ve hayvancılıktır. Özellikle çalışma sonucunda *Cryptosporidium* açısından en yüksek orana sahip olan Tercan ilçesinde geçim kaynağı büyükbaş hayvancılıktır. İşlem görmemiş atık sularında, filtrelenerek işlenen atık sularında, kanalizasyonda, yer altı sularında, yeryüzü sularında ve işlem görmüş içme suyunda ookistlerin tespit edilmesi; suların dışkı ile kirlendiğini göstermektedir (Fayer, 2000; Köktürk, 2002; Saygı, 1998). Bu nedenle kırsal kesimlerden alınan su örneklerinin pozitif olması, enfekte hayvan dışkılarının çevreye bırakılması ve tarımda kullanılan atık suların çevresel sular aracılığı ile su kaynaklarına ulaşması sonucu dışkı ile meydana gelen kirliliği akla getirmektedir.

Çalışmamız bu anlamda Kolören ve Demirel' in (2013) Ordu ili Melet Irmağı'nın farklı noktalarından aldıkları su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin varlığını göstermek amacıyla LAMP metodu kullanarak Melet Irmağı'nın tüm noktalarını pozitif olarak tespit ettikleri ve bu duruma buzağılar tarafından Melet Irmağı'nın içme suyu olarak kullanılması ve buzağuların ırmak içine dışkılamalarının neden olabileceğini bildirdikleri çalışma ile benzerlik göstermektedir. Aylara göre değerlendirildiğinde ise Mart ayında alınan 24 numuneden 1' i, Nisan ayında toplanan 25 numuneden 1'i, Mayıs ayında alınan 26 numuneden 3'ü, Haziran ayında alınan 23 numuneden 3' ü, Temmuz ayında alınan 22 numuneden 1'i *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunurken ve Ağustos ayında alınan 20 numunede *Cryptosporidium* tespit edilmemiştir. Erzincan'ın 1926- 2016 yıllarında gerçekleşen aylara göre ortalama yağış dağılımı Tablo 10' da verilmiştir. En çok yağış alan aylar ilkbahar aylarıdır. Bu nedenle Hashwey vd. de (1997) belirttiği gibi, fazla yağın yağmur ve nemli havanın, içme suyu ve çevresel sularda daha fazla kontaminasyona sebep olduğu düşünülmektedir. Çalışmamız sonuç olarak Kaya'nın (2011) Ordu il merkezinde belirlenen 5 istasyondan belirli aralıklarla topladığı su örneklerini *Cryptosporidium* türlerine ait ookistler bakımından MAF, LAMP ve PCR teknikleri ile incelediği ve yüzey sularıyla temas halindeki üç istasyonda *Cryptosporidium* ookistlerini tespit edip en yüksek değerlerine ilkbahar mevsiminde rastladığı çalışma ile paralellik göstermektedir. Erzincan il merkezi, ilçe ve köylerden topladığımız 140 su örneğinin *Cryptosporidium* açısından 9' u (%6,4) LAMP ile pozitif bulunurken, PCR ile sadece 6 (%4,3) örnek pozitif sonuç vermiştir. Aradaki farkın Alhassan vd. (2007) belirttiği gibi su numunelerinde bulunan olası PCR inhibitörlerinin mevcudiyetinden ve PCR inhibitörlerinin LAMP üzerine etki etmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 10. Erzincan ili 1926 – 2016 yılları arasında gerçekleşen ortalama yağış değerleri.

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

Çalışmamız Karanis vd. nin (2007) yaptığı daha önce IFA ile *Cryptosporidium* varlığı pozitif olarak rapor edilen 7 nehir suyu örneğini LAMP ve PCR tekniği ile inceledikleri ve analizler sonucunda tüm su örneklerini LAMP tekniği ile pozitif bulurken PCR ile pozitif sonuç alamadıkları ve yine Alhassan vd. nin (2007) Bulgaristan'da yaptıkları çalışmada 7 ırmaktan alınan su örneklerinde *Cryptosporidium* türlerini tespit etmek amacı ile LAMP ve PCR tekniklerini karşılaştırılmalı olarak kullandıkları, sonucunda su örneklerinden 7' sini LAMP yöntemi ile *Cryptosporidium* açısından pozitif bulurlarken, PCR yöntemi ile hiçbir örnekte *Cryptosporidium* belirlemedikleri çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ülkemizde ise Kolören vd. (2011) tarafından Ordu bölgesinde yapılan çalışmada *Cryptosporidium* türlerinin varlığını tespit etmek amacıyla, farklı su kaynaklarından alınan toplam 70 su örneğini IFT, LAMP ve Nested PCR yöntemlerini kıyaslayarak kullanmışlardır. İncelenen bu 70 su örneğinden 18' i (%25,70) IFT yöntemiyle, 19' u (%27,10) LAMP yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Uygulamanın güvenilirliğini test etmek için rastgele seçilen 16 örnek 10 adet *Cryptosporidium* ookisti ile kontamine edilmiştir. Bu örneklerin hepsi LAMP tekniğinde pozitif bulunurken, Nested PCR

yöntemiyle sadece 7 örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Buna dayanarak, LAMP yönteminin Nested PCR ve IFT yöntemine göre daha hassas sonuçlar verebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda LAMP yöntemi ile Kolören vd. de (2010) belirttiği gibi *Cryptosporidium* gibi parazitlerin kısa zamanda tespit edilebildiği, tekniğin ekonomik, kolay uygulanabilir ve yüksek duyarlılığa sahip olması nedeni ile birçok alandaki tanı laboratuvarlarında kullanımının mümkün olduğu ve standart bir PCR çalışması için harcanan sürenin üçte biri kadar daha kısa bir sürede sonuç almanın mümkün olduğu söylenebilir.

5. Öneriler

Ülkemizde su kökenli *Cryptosporidium* varlığını saptamaya yönelik çalışmalar yok denecek kadar az bulunmaktadır. Bu çalışma Erzincan ili içme ve kullanma suyu örneklerinde *Cryptosporidium spp.*' nin varlığını moleküler yöntemler ile göstermek için yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma gelecekte planlanan epidemiyolojik çalışmalarla *Cryptosporidium spp.* genotiplendirilmesi, filogenetik ilişkinin belirlenmesi ve bulaş kaynaklarının saptanmasında yararlı olacaktır. Çalışmamız; elde edilen veriler ile toplum sağlığının korunması, iyileştirilmesi ve yaşam kalitesinin artırılmasına katkı sağlamaktadır. *Cryptosporidium* türlerinin dışkı kontaminasyonu ile su kaynaklarının kirlenmesi sonucu yayıldığı gözönüne alınırsa kurumlar bu konuda bilgilendirilmeli ve bu kurumların kanalizasyon atıklarını arıtma sistemleri kullanarak ya da içme suyu kaynaklarından uzak yerlere boşaltarak önlem almaları tavsiye edilmektedir. Sonuç olarak; sudan kaynaklanan cryptosporidiosis vaka ve salgınlarının önlenmesi ve dolayısıyla halk sağlığının korunmasında *Cryptosporidium* okistlerinin hangi su kaynaklarında bulunduğu ve bu su kaynakları için kontaminasyon nedenlerinin belirlenerek gerekli önlemlerin alınması ve mücadele yöntemlerinin belirlenmesi gerekmektedir.

6. Teşekkür

Çalışmamızı FEN-C-YLP-240215-0127 proje numarası ile destekleyen Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

7. Kaynaklar

- Aksoy Ü., Erbay A., Akısü Ç., Apa H., Özkoç S., Öztürk S., (2003) Intestinal parasites in children with neoplasms, The Turkish Journal of Pediatrics, 45:129-132 .
- Alhassan, A., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M.Y., Mbat, P.A. (2007) Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis, Veterinary Parasitology, 143: 155-60 .
- Altıntaş K., (2002) Tıbbi Parazitoloji , Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları, 170- 172.
- Ardıç N., (2007) İçme sularında parazit ve diğer patojenlere karşı dezenfeksiyon uygulamaları ve ara konaklarla mücadelede kullanılan kimyasallar, 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, İstanbul
- Butler B.J., Mayfield C.I., (1996) *Cryptosporidium spp.* - A Review of the Organism, the Disease, and Implications for Managing Water Resources, Waterloo Centre for Groundwater Research, Waterloo, Ontario, Canada.
- Casemore D.P., Sands R.L. and Curry A., (1985) *Cryptosporidium* species a new human pathogen. J. Clin. Pathol, 38: 1321-1326.
- Cheng, H.W., Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Broaders, M.A., Tamang, L., Connolly, M., (2009) Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts

- during secondary wastewater treatments, *Parasitol Res* 105: 689-96
- Current W.L., Bick P.H., (1989) Immunology of *Cryptosporidium spp*, *Pathology and Immunopathology Research*, 8: 141-160.
- Current W.L. and Garcia L.S., 1991 *Cryptosporidiosis*. *Clin. Microbiol. Review*, 4(3), 325-358.
- Delibaş, S., Kurugöl, Z., Pektaş, B., Vardar, F., Özen, S., Turgay, N., (2001) Case report: Diarrhea due to *Cryptosporidium* in a hypogamaglobulinemic child, *Acta Parasitologica Turcica* 25: 113-114.
- Dietz, V., Vugia, D., Nelson, R., (2000) Active, Multisite, Laboratory-based Surveillance For *Cryptosporidium parvum* *Am J Trop Med Hyg* 62: 368-372 .
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., (2009) Emerging food-borne parasites *Vet Parasitol* 163: 196-206
- Eckert, J., Protozoa. In: Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel RM (eds), (2005) *Medical Microbiology*, Thieme, New York, USA 476-542
- Eisenberg, J.N.S., Lei, X., Hubbard, A.H., (2005) The Role of Disease Transmission and Conferred Immunity in Outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* Outbreak in Milwaukee, Wisconsin, *Am J Epidemiol* 161: 62-72.
- Ergüven, S., Arıkan, S., Akyön, Y., Yurdakök, K., Günalp, A., 1998 Hipogama-globulinemili bir hastada *Cryptosporidium*, *Giardia* ve *Hymenolepis koenfeksiyonu*, *Ankara Mikrobiyoloji Bülteni Derg.* 32(1), 85-91.
- Fayer, R., Ungar, B.L., (1986) *Cryptosporidium spp.* and *Cryptosporidiosis*, *Microbiol. Rev.* 50(38), 458-486
- Fayer, R., (2000) Waterborne and foodborne protozoa: Foodborne Diseases Handbook, Eds: Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O, New York., 289-322
- Gödemerdan, A., Kalkan, A., Özkellekçi, A., Erensoy, A., Kılıç, S., Sırrı A., 1999 İshalli çocuklarda *Cryptosporidium spp.* görülme sıklığı, *Türkiye Parazitoloji Derg.* 23:2
- Hashwey, R., Smith, N.H., Cron, S., Graviss, E.A., Chappell, C.L. and White, A.C., 1997 *Cryptosporidiosis* in Houston, Texas a report of 95 cases, *Medicine*, 76(2), 118-139
- Howe, A.D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn K.S., Wright P., Hunter, P.R., 2002 *Cryptosporidium* Oocysts in a Water Supply Associated with a *Cryptosporidiosis*, *Outbreak. Emer. Infect. Dis.*, 8: 619-624.
- Irmak, H., 2008 Giriş Sularla ilişkili hastalıklar Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Ankara, 7.
- Karanis, P., Kourenti, K., Smith, H.V., 2007 Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt, *Journal of Water and Health*, 5: 1-38.
- Kaya, D., (2011) Ordu il merkezi ve ilçelerinden alınan su örneklerinde kirlilik indikatör bakterilerin ve parazitlerin moleküler yöntemlerle tespit edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Kaypmaz, A., Vehid, S., Köksal, S., Can, G., Toprak, N., Yurtsever, E., 2001 Çevre Sağlığı , Halk Sağlığı Ders Notları , Nobel Tıp , 570-592.
- Kolören, Z., Avşar, C., Şekeroğlu, A.Z., (2010) Protozoonların tanısında ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi

- (LAMP) Türkiye Parazitoloji Dergisi, 34: 207-11.
- Kolören Z., Demirel E., 2013 Investigation on *Cryptosporidium spp.* in water samples collected from River Melet in Ordu by loop mediated isothermal amplification LAMP, *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(2): 28-32.
- Kolören Z., Sotiriadou I., Karanis P., 2011 Investigations and comparative detection of *Cryptosporidium* species by microscopy, nested PCR and LAMP in water supplies of Ordu, Middle Black Sea, Turkey Trop Med Parasitol, Dec; 105(8): 607-615.
- Köktürk, O., 2002 Parazit hastalıkları grup baskısı. Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, Toraks Dergisi, Cilt 3, Ek 5.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., 1994 A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply, *N Engl J Med*, 331:161-167
- Miller, D.L., Ligett, A., Radi, Z.A., Branch, L.O., 2003 Gastrointestinal *Cryptosporidiosis* in a puppy, *Vet. Parasitol*, 115, 199-204.
- Ok, Ü.Z., Üner, A. ve Korkmaz, M., 1995 İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları, Türk Parazitoloji Derneği, Ege Üniv. Basımevi İzmir. 12: 98
- Ok, U.Z., Balcıoğlu, İ.C., 2007 *Cryptosporidiosis* Ed. Özcel, M.A., Özbel, Y., Ak, M., Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları, Meta Basım Matbaacılık, 388-91
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2000 Human Diseases Caused by Fungi and Protozoa: *Cryptosporidiosis*, In: *Microbiology*, The McGraw-Hill Companies, USA., 952-3
- Saygı, G. , 1998 Temel tıbbi parazitoloji, Esnaf Ofset Matbaacılık, 78-80
- Spano, F., Crisanti, A., 2000 *Cryptosporidium parvum*: The many secrets of a small genome, *International Journal for Parasitology*, 30: 553-565
- Taş, B., Candan, A.Y., Can, Ö., Topkara, S., 2010 Ulugöl (Ordu)'ün bazı fiziko-kimyasal özellikleri, *Journal of Fisheries Sciences.com*, 4 (3): 254-263
- Usluca, S., Aksoy, Ü., 2006 Su kaynaklı bir parazit: *Cryptosporidium*, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi , 20(1): 65-74
- Yıldız, M., Çöplü, N., Kılıç, S., Babür, C., Öncül, Ö., Esen, B., 2001 İshali olan solid tümörlü olgularda *Cryptosporidium spp.* araştırılması, *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 25: 1-8
- Yücel, A., 1989 Ülkemizde Yeterince İncelenmeyen Enterik Patojenler ed. Töreci, K., Anadolu Üniv. Basım evi, Eskişehir 102