

Mersin İlinde Farklı Su Kaynaklarında *Cryptosporidium* spp. Varlığının Araştırılması

Investigation of the Presence of *Cryptosporidium* spp. in Different Water Sources in Mersin Province, Turkey

Gönül ASLAN¹, Gül BAYRAM², Feza OTAĞ¹, Şahin DİREKEL¹, Ayşegül TAYLAN ÖZKAN³, Kemal ÇEBER⁴, Gürol EMEKDAŞ¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Laboratuvar Hizmetleri Bölümü, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Laboratory Services, Mersin, Turkey.

³ Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Parazitoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Refik Saydam National Public Health Agency, Parasitology Laboratory, Ankara, Turkey.

⁴ Niğde Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Niğde.

⁴ Niğde State Hospital, Department of Microbiology, Niğde, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 15.06.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.11.2011

ÖZET

Cryptosporidium, insan ve hayvanlarda enterit etkeni olan hücre içi bir protozoondur. Oral-fekal yolla bulaşan parazitin en önemli kaynağı kontamine su ve besinlerdir. Gelişmekte olan ülkelerde kriptosporidiyoz prevalansının gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek olduğu ve bu durumun içme sularının sanitasyon ve dezenfeksiyonunda uygulanan kuralların yetersiz olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir. *Cryptosporidium* türleri arasında en sık saptanan enfeksiyon etkeni *Cryptosporidium parvum* olup, enfeksiyon sağlıklı kişilerde yüksek morbidite, immün sistemi baskılanmış hastalarda ise yüksek mortalite ile seyredebilir. Kriptosporidiyozun laboratuvar tanısında genellikle aside dirençli boyama tekniği kullanılmaktadır. Günümüzde geliştirilen moleküler yöntemler sayesinde, epidemiyolojik verilerin elde edilmesine yönelik olarak su kaynaklarında ve asemptomatik taşıyıcılarda *Cryptosporidium* saptanması ve tür düzeyinde tanımlanması mümkün olmuştur. Bu çalışmada, Mersin ilindeki farklı su kaynaklarında *Cryptosporidium* oookistlerinin varlığının belirlenmesi ve bunların tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Mart 2007-Mayıs 2009 tarihleri arasında gerçekleştirilen çalışmada, Mersin şehir merkezi (n= 25) ile Tarsus (n= 32), Mezitli (n= 33) ve Karaduvar (n= 45) ilçelerinden alınan toplam 135 farklı su kaynağına ait örnekler (70 musluk suyu, 50 kuyu suyu, 15 atık su) değerlendirilmiştir. Su örnekleri 10'ar litrelik hacimlerde alınarak por çapı 0.45 µm olan selüloz asetat membran filtresi bulunan vakum pompalı filtrasyon cihazında süzölmüştür. Süzöntü-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 337 4300/2182, **E-posta (E-mail):** drgaslan@gmail.com

den *Cryptosporidium* oookistleri, modifiye Kinyoun'nun aside dirençli (soğuk) boyama yöntemi (MKSA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanmış ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemiyle tiplendirilmiştir. Çalışmamızda MKSA yöntemiyle üç, PCR ile yedi örnekte *Cryptosporidium* varlığı saptanmış ve tüm suşlar *C.parvum* olarak tanımlanmıştır. MKSA ile *Cryptosporidium* oookistlerinin saptandığı üç örneğin hepsi PCR ile de pozitif sonuç vermiş, buna karşın dört örnek MKSA ile negatif bulunmuştur. Buna göre bölgemizdeki su kaynaklarında *C.parvum* prevalansı %5.2 (7/135) olarak tespit edilmiştir. Pozitifliğin saptandığı yedi örnekten biri şehir merkezinden alınan atık su örneği, altısı (iki musluk suyu, iki kuyu suyu, iki atık su) ise Karaduvar'dan alınan örnekler olup, bu sonuç dikkat çekici bulunmuştur. Karaduvar bölgesinde parazit oranının yüksek (6/45; %13.3) olması, bölgedeki alt yapının yetersiz olmasından ve kuyu sularının içme ve kullanma suyu olarak kullanılmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Gelecekte planlanacak epidemiyolojik çalışmalarla *Cryptosporidium* spp. genotiplendirmesi ve filogenetik ilişkisinin belirlenmesi bulaş kaynaklarının saptanmasında yararlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: *Cryptosporidium parvum*; polimeraz zincir reaksiyonu; modifiye Kinyoun boyama yöntemi; su kaynağı; Mersin.

ABSTRACT

Cryptosporidium is an intracellular protozoon that causes enteritis in human and animals. Contaminated water and food are the major sources for the transmission of oocysts via oral-fecal route. It is reported that the prevalence of cryptosporidiosis is higher in developing countries than developed countries because of inefficient sanitation and disinfection facilities for drinking water. The most frequently detected species is *Cryptosporidium parvum* leading to high morbidity in healthy subjects and also fatal infections in immunocompromised patients. The acid-fast staining method is widely used in the diagnosis of cryptosporidiosis. Nowadays, *Cryptosporidium* could easily be detected in water supplies and asymptomatic carriers by molecular techniques to obtain epidemiological data. In this study it was aimed to detect and identify *Cryptosporidium* oocysts in different water sources in Mersin province, Turkey. A total of 135 water samples (70 taps, 50 wells and 15 sewage) collected from city center (n= 25) and from Tarsus (n= 32), Mezitli (n= 33) and Karaduvar (n= 45) counties between March 2007 and May 2009 were included in the study. Water samples in 10 liter volumes, were filtered by 0.45 µm pore-sized membrane filter vacuum/pressure pumping technique. *Cryptosporidium* oocysts in filtrates were detected by modified cold Kinyoun acid-fast stain (MCK) technique and also identified and typed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. MCK yielded three and PCR yielded seven positive results. All the strains were identified as *C.parvum* by PCR-RFLP method. All of the three MCK-positive samples were also found positive with PCR, however four PCR positive samples were MCK-negative. Thus, the prevalence of *C.parvum* was estimated as 5.2% (7/135) in our region. Of seven positive samples, one was a sewage water sample collected from the city center, while the remaining (two tap water, two well water and two sewage water samples) belonged to the samples collected from Karaduvar county, interestingly. It was thought that deficient infrastructure and use of well water as drinking water supply in Karaduvar region might be the cause of high rate of *Cryptosporidium* (6/45; 13.3%). Further studies which will determine the genotypes and investigate the phylogenetic relationship between these *Cryptosporidium* spp., might aid to the epidemiology of cryptosporidiosis in our region.

Key words: *Cryptosporidium parvum*; polymerase chain reaction; modified Kinyoun's staining method; water source; Turkey.

GİRİŞ

İlk kez 1907 yılında tanımlanan *Cryptosporidium* bir hücre içi paraziti olup, insan ve ekonomik değeri olan birçok hayvanda enteritin en önemli nedenlerinden biri olarak ka-

bul edilmektedir¹. Kriptosporidiyoz, immün sistemi zayıf/baskılanmış kişilerde ve özellikle AIDS'li hastalarda ciddi morbidite ve hatta mortaliteye neden olabilir^{2,3}. İnsanlarda yedi *Cryptosporidium* türünün (*C.parvum*, *C.hominis*, *C.meleagridis*, *C.felis*, *C.canis*, *C.suis*, *C.muris*) enfeksiyon yaptığı belirlenmiş olmasına rağmen en sık saptanan tür *C.parvum*'dur². *C.parvum*'un özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülen ishal olgularına neden olduğu bildirilmiştir³. Zoonotik bir enfeksiyon olan kriptosporidiyoz, insanlara hayvanlardan bulaşabildiği gibi kontamine yiyecek, içecek ve su tüketimiyle de bulaşabilir². Parazitin enfekte insan ve hayvan dışkılarından çevreye yayılıp, döngü içerisinde doğrudan ya da dolaylı yollarla gıda maddeleri veya yeraltı sularını kontamine ederek, bu sularda aylarca enfektivitesini koruyabildiği bildirilmiştir^{4,5}. *Cryptosporidium*'un en önemli özelliği, içme ve kullanma sularına uygulanan klorlama işlemine karşı dirençli olmasıdır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, tarım alanlarında atık suların sulama amaçlı kullanılmasının *Cryptosporidium* ookistlerinin bulaşında önemli olduğu bildirilmiştir⁶. Alt yapı problemi olan ve şebeke sularının kullanıldığı bölgelerde bu parazitlere rastlanabilmektedir^{1,2}.

Kriptosporidiyozun tanısı, genellikle dışkı örneklerinde aside dirençli ookistleri saptayan Kinyoun veya Ziehl-Neelsen gibi boyama yöntemleriyle konulmaktadır⁷. Uygulama ve değerlendirmesi deneyimli uzmanlarca yapılan bu boyama yöntemleri, bazen boya almayan ookistler ve az sayıda ookist içeren örnekler nedeniyle yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Mikroskopik tanıdaki bu sorunlar nedeniyle, son yıllarda geliştirilen tanı yöntemlerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nin duyarlı bir yöntem olduğu ve boyanmada sorun yaşanan olgularda alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmektedir^{8,9}. PCR ile *Cryptosporidium* türlerinin saptanması, bunların genotiplendirilmesi ve filogenetik analizine de olanak sağlamaktadır. Bu amaçla PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ve dizi analizi gibi yöntemler, su kaynaklarında insan ve hayvan kökenli *Cryptosporidium* türlerinin saptanmasında kullanılmaktadır⁴. Bu çalışmada, Mersin ilindeki içme ve kullanma suyu kaynaklarında, *Cryptosporidium* spp. araştırılması ve izole edilen türlerin PCR-RFLP ile genotiplendirilerek bölgemizdeki *Cryptosporidium* türlerinin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması, İşlenmesi ve Boyanması

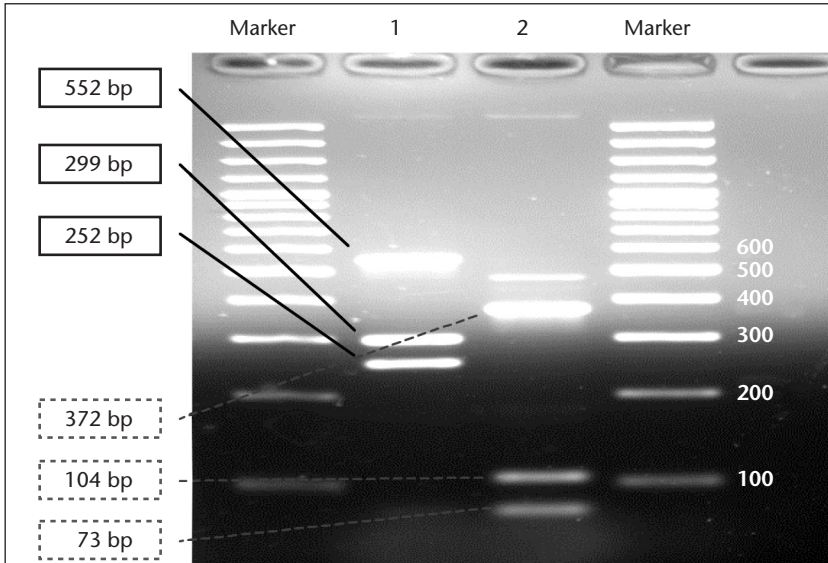
Mersin ilinde Mart 2007-Mayıs 2009 tarihleri arasında, 135 farklı musluk, kuyu ve atık su kaynağından (şehir merkezi, Tarsus, Mezitli ve Karaduvar) 10 L hacimde olacak şekilde su örnekleri toplandı. Örnekler, por çapı 0.45 µm olan selüloz asetat membran filtresi bulunan vakum pompalı filtrasyon cihazında (Millipore) süzöldükten sonra filtre üzerinde kalan süzöntü yine aynı su örneğinin 20 ml'si içerisinde yıkandı ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dipteki sedimentin 1.5 ml'si ependorf tüpüne alındı ve buradan lam üzerine 100 µl konularak modifiye Kinyoun'un aside dirençli (soğuk) boyama yöntemi (MKSA) ile boyandı. Bu amaçla lam üzerinde kurutulan 100 µl örnek saf meta-

molde bir dakika tesbit edildi. Kinyoun'un karbol fuksin boyasıyla beş dakika boyandıktan sonra %50 etanolde 3-5 saniye tutuldu ve su ile yıkanıp %1'lik sülfürik asitle iki dakika muamele edildi. Tekrar su ile yıkanan preparat metilen mavisi ile bir dakika boyandı; su ile yıkanıp, kuruması beklendikten sonra x100 objektifte incelendi⁷.

PCR-RFLP

Filtre üzerindeki kalan süzüntüden fenol-kloroform yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldı¹⁰. Daha sonra *Cryptosporidium*'a özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyon uygulandı. PCR karışımı 50 µl olacak şekilde; steril distile su, PCR reaksiyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) (promega), 4.5 mM MgCl₂ (Promega), 200 mM her bir dNTP (Promega), 25 pM her bir primer [F: 5' GCC TTG AAT ACT CCA GCA TG 3' (MOLBIOL, 50 pM/µl); R: 5' GCA GGT TAA GGT CTC GTT CG 3' (MOLBIOL, 50 pM/µl)], Taq DNA polimeraz (2.5 U/ml) (Promega) ve ekstrakte edilen 5 µl örnek DNA'sı konularak hazırlandı¹¹. Amplifikasyonda kullanılan PCR programı; başlangıç denatürasyonu 94°C'de beş dakika, 40 döngü olacak şekilde denatürasyon 94°C'de bir dakika, primer bağlanması 62°C'de bir dakika zincir uzaması 72°C'de bir dakika ve son uzatma 72°C'de beş dakika olacak şekilde uygulandı. PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jelde elektroforez yapıldıktan sonra ultraviyole transilüminatöre yerleştirilerek (312 nm) görüntülendi¹².

PCR ürünleri 552 baz çifti (bp) uzunluğunda olan örnekler *Cryptosporidium* DNA'sı pozitif olarak kabul edilerek, tür düzeyinde tanımlama amacıyla *MaeI* ve *VspI* restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesildi¹² (Resim 1).



Resim 1. *C. parvum* saptanan bir örneğin *MaeI* ve *VspI* enzimleriyle kesimleri [Marker: Ağırlık belirteci; Hat 1: *MaeI* kesim ürünleri (299, 252); Hat 2: *VspI* kesim ürünleri (372, 104, 73)].

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 11.5 ve MedCalc versiyon 10.3.0 programları kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmada şehir merkezi, Tarsus, Mezitli ve Karaduvar bölgelerinden 70 musluk suyu, 50 kuyu suyu ve 15 atık su olmak üzere 135 su örneği toplanmıştır. Karaduvar'daki bir kuyu suyu ve iki atık su örneği olmak üzere toplam üç su örneğinde (%2.2) MKSA boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır. PCR-RFLP tekniği ile iki musluk suyu (Karaduvar), iki kuyu suyu (Karaduvar) ve üç atık su örneği (iki Karaduvar ve bir şehir merkezi) olmak üzere toplam 7 (%5.2) örnekte *C.parvum* tiplendirilmiştir (Tablo I). Mersin iline içme suyu sağlayan ve Tarsus'ta bulunan Berdan içme suyu tesislerinden alınan örneklerin hiçbirinde *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmamıştır.

Bölgemizdeki su kaynaklarında *C.parvum* prevalansı %5.2 (7/135) olarak tespit edilmiş, pozitif saptanan örneklerin büyük çoğunluğunun (6/7) Karaduvar ilçesinden alınan su kaynaklarına ait olduğu dikkati çekmiştir (Tablo I).

Çalışmamızda her iki yöntemle birlikte saptanan pozitif sonuçlar dikkate alındığında; MKSA ve PCR-RFLP yöntemlerinin duyarlılığı sırasıyla %46 ve %100 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde *Cryptosporidium* enfeksiyonu prevalansının, gelişmiş ülkelere oranla çok daha yüksek olduğu ve bu durumun gelişmekte olan ülkelerde içme suyuna uygulanan temizlik ve dezenfeksiyon prosedürlerinin yetersizliğine bağlı olduğu ifade edilmektedir^{3,13}. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir çalışmada, yılda yaklaşık 15 milyon kişinin gıda kaynaklı ishal yüzünden sağlık kuruluşlarına başvurduğu ve 30.000 kişinin *Cryptosporidium* enfeksiyonuna yakalandığı bildirilmiştir¹⁴. MacKenzie ve arkadaşları¹⁵ ise, Milwaukee'de şehir şebeke suyu ile bulaşan büyük bir kriptosporidiyoz salgını bildirmişlerdir. Norveç'te yapılan bir çalışmada, 305 atık su örneği-

Tablo I. Çeşitli Su Örneklerinde PCR-RFLP Tekniği ile Tiplendirilen *C. parvum*'un Dağılımı

Bölge	Alınan örnek sayısı (Pozitif örnek sayısı)			
	Musluk suyu	Kuyu suyu	Atık su	Toplam
Tarsus	20 (0)	10 (0)	2 (0)	32 (0)
Karaduvar	20 (2)	20 (2 ^a)	5 (2 ^b)	45 (6)
Şehir merkezi	10 (0)	10 (0)	5 (1)	25 (1)
Mezitli	20 (0)	10 (0)	3 (0)	33 (0)
Toplam	70 (2)	50 (2)	15 (3)	135 (7)

^a MKSA ile bir örnekte pozitiflik.

^b MKSA ile iki örnekte pozitiflik saptanmıştır.

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, MKSA: Modifiye Kinyoun'un aside dirençli boyama yöntemi.

nin 55 (%13.5)'inde *Cryptosporidium*, 10 (%2.5)'unda ise hem *Cryptosporidium* hem de *Giardia* varlığı tespit edilmiştir¹⁶. Ono ve arkadaşları¹⁷ Japonya'da nehir suyu örneklerinde *Cryptosporidium* prevalansını %47; Rose ve arkadaşları¹⁸ da ABD'nin 17 farklı eyaletinde *C.parvum* prevalansını %51 olarak saptamışlardır. Lowery ve arkadaşları¹² Kuzey İrlanda'da içme sularında *Cryptosporidium* prevalansını %1.9 olarak bildirmişler; Liu ve arkadaşları¹⁹ ise 48 atık su örneğinde bu oranı %31.3 olarak vermiş ve dizi analiziyle suşları *C.andersoni* ve *C.ubiquitum* olarak tanımlamışlardır.

Çalışmamızda Mersin ili su kaynaklarında *Cryptosporidium* varlığı MKSA ve PCR-RFLP yöntemleriyle araştırılmış; pozitiflik oranı %5.2 (7/135) olarak belirlenmiştir. MKSA boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* oookistlerinin saptandığı üç örneğin hepsi PCR ile de pozitif sonuç vermiş, buna karşın PCR-RFLP ile *C.parvum* olarak tiplendirilen dört örnek MKSA ile negatif bulunmuştur. Bu durumun örneklerde oookist sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Araştırmamızda, PCR-RFLP yönteminin duyarlılığının MKSA yöntemine göre daha yüksek olduğu izlenmiş ve bu sonuç Sungur ve arkadaşlarının⁸ sonuçlarıyla benzer bulunmuştur. Kriptosporidiyoz tanısında alternatif olarak kullanılan PCR temelli yöntemler, çok az sayıda oookisti saptayabilmesi nedeniyle boyama yöntemlerinden daha yüksek duyarlılığa sahiptir^{8,9}. Ayrıca bu yöntemler, kolay uygulanabilir olma ve çok sayıda örneğin aynı anda değerlendirilmesine olanak sağlama gibi avantajlara sahiptir. Dezavantajları arasında ise, ölü parazitlere ait nükleik asidin saptanması sonucu alınan yanlış pozitif; dışkı örneğindeki inhibitör maddelerin yoğunluğu ve uygulama sırasındaki kontaminasyonlar sonucu alınan yanlış negatif sonuçlar sayılabilir^{9,20}.

Çalışmada Tarsus ve Mezitli'den alınan tüm örnekler *Cryptosporidium* açısından negatif bulunmuş; ancak şehir merkezinden alınan bir atık su örneği ile Karaduvar'dan alınan üç farklı su kaynağı örneğinde pozitiflik saptanmıştır. Buna göre Karaduvar bölgesindeki su kaynaklarının %13.3 (6/45)'ünde *Cryptosporidium* kontaminasyonu gösterilmiştir. Bu sonuç, ilimizde Otağ ve arkadaşları²¹ tarafından yapılan çalışmanın verileriyle birlikte değerlendirildiğinde oldukça anlamlıdır. Zira bu araştırmacılar, Mersin ilinde ilkokul öğrencilerinden alınan dışkı örneklerinde MKSA ve Auramin-O boyama yöntemleriyle *Cryptosporidium* oookistlerini araştırmışlar ve sadece Karaduvar'da yaşayan çocuklarda pozitiflik (4/72; %5.5) saptamışlardır²¹. Yine ilimizde Çeber ve arkadaşları²² tarafından yapılan çalışmada, MKSA ve Auramin-O boyama yöntemleriyle içme sularının %11.4 (5/44)'ünde, kuyu sularının %50 (1/2)'sinde, atık suların %21 (4/19)'inde ve deniz suyu örneklerinin %2.8 (1/35)'inde olmak üzere incelenen 100 su örneğinin 11 (%11)'inde *Cryptosporidium* oookistlerine rastlandığı bildirilmiştir. Bakır ve arkadaşlarının²³ Ankara nehrinde yaptıkları çalışmada, altı su örneğinin 1 (%16.6)'i *Cryptosporidium* açısından pozitif bulunurken, İstanbul'da yapılan bir çalışmada²⁴ çeşitli barajlardan toplanan 40 ham su örneğinin hiçbirisinde pozitiflik saptanmamıştır. Ülkemizde gastrointestinal yakınmaları ve/veya ishali olan olgular üzerinde yapılan çalışmalarda ise *Cryptosporidium* spp. pozitifliği %2.3-35.5 arasında bildirilmektedir²⁵⁻²⁹.

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^{30,31}. Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda, *Cryptosporidium* spp. genotiplendirilmesi amacıyla PCR-RFLP yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır^{17,19,30,31}. Çalışmamızda da kullandığımız PCR-RFLP tekniğinin hızlı ve tür düzeyinde tiplendirmeyi mümkün kıldığı saptanmıştır. Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda *Cryptosporidium* ookistlerinin tespitinde boyama tekniklerinin yanı sıra tiplendirmenin önemli olduğu durumlarda moleküler yöntemlerin kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, Mersin ili su kaynaklarında *Cryptosporidium* spp. varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada; çeşitli su kaynağı örneklerindeki toplam pozitiflik oranı %5.2 olarak saptanmış; tüm suşlar *C.parvum* olarak tanımlanmış ve özellikle Karaduvar bölgesindeki sularda parazit oranının yüksek (%13.3) olduğu gösterilmiştir. Bu durumun, Karaduvar bölgesindeki mevcut alt yapı ve su sisteminin yetersiz olması; kuyu sularının içme-kullanma suyu olarak kullanılması ve atık suların sulama amaçlı olarak kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. İleride planlanacak moleküler epidemiyolojik çalışmalarla *Cryptosporidium* türlerinin genotiplendirilmesi ve filogenetik ilişkinin saptanması bulaş kaynaklarının belirlenmesinde yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Fahey T. Cryptosporidiosis. Primary Care Update for OB/GYNS 2003; 10(2): 75-80.
2. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol 2004; 126(1-2): 37-56.
3. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infections in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2002; 15(1): 145-54.
4. Brescia CC, Griffin SM, Ware MW. *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. Appl Environ Microbiol 2009; 75(21): 6856-63.
5. Moulin L, Richard F, Stefania S, et al. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. Water Res 2010; 44(18): 5222-31.
6. Redder A, Dürr M, Daeschlein G, et al. Constructed wetlands-Are they safe in reducing protozoan parasites? Int J Hyg Environ Health 2010; 213(1): 72-7.
7. Garcia LS (ed). Diagnostic Medical Parasitology, pp: 30-60. 2001, 4th ed. ASM Press, Washington DC.
8. Sungur T, Kar S, Güven E, Aktaş M, Karaer Z, Vatansever Z. Detection of *Cryptosporidium* spp. in feces with nested PCR and carbol fuchsin staining method. Türkiye Parazitoloj Derg 2008; 32(4): 305-8.
9. Dirim Erdoğan D, Dağci H, Turgay N, Akarca US, Alkan MZ. The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples. Türkiye Parazitoloj Derg 2009; 33(2): 120-4.
10. Carraway M, Tzipori S, Widmer G. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. Appl Environ Microbiol 1996; 62(2): 712-6.
11. Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. Appl Environ Microbiol 1992; 58(11): 3494-500.
12. Lowery CJ, Moore JE, Millar BC, et al. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. J Med Microbiol 2000; 49(9): 779-85.
13. Fayer R, Lewis EJ, Trout JM, et al. *Cryptosporidium parvum* in oysters from Commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. Emerg Infect Dis 1999; 5(5): 706-10.
14. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5(5): 607-25.

15. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994; 331(3): 161-7.
16. Robertson LJ, Gjerde B. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scand J Public Health* 2001; 29(3): 200-7.
17. Ono K, Tsuji H, Rai SK, et al. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(9): 3832-6.
18. Rose JB, Gerba CP, Jakubowski W. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ Sci Technol* 1991; 25(8): 1393-400.
19. Liu A, Ji H, Wang E, et al. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in raw urban wastewater in Harbin, China. *Parasitol Res* 2011; 109(3): 913-8.
20. Doğan N, Sağlık I. *Cyclospora cayentanensis* and *Cryptosporidium parvum* coinfection in a pregnant woman with prolonged diarrhoea. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(1): 155-9.
21. Otağ F, Aslan G, Emekdaş G, Aydın E, Özkan AT, Çeber K. Mersin ilinde ilkokul öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2007; 31(1): 17-9.
22. Ceber K, Aslan G, Otağ F, et al. Investigation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg* 2005; 29(4): 224-8.
23. Bakır B, Tanyuksel M, Saylam F. Investigation of waterborne parasites in drinking water sources of Ankara. *J Microbiol* 2003; 41(2): 148-51.
24. Köksal F. Kaynak sulunun *Cryptosporidium* ve *Giardia* yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002; 32(3-4): 275-7.
25. Över U, Söyletir G. İshalle seyreden hastalıklarda kriptosporidyumun rolü. *FLORA* 1997; 2(2): 98-104.
26. Akyön Y, Ergüven S, Arikan S, Yurdakök K, Günalp A. *Cryptosporidium parvum* prevalence in a group of Turkish children. *Turk J Pediatr* 1999; 41(2):189-96.
27. Babür C, Kılıç S, Taylan Ozkan A, Esen B. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Parazitoloji Laboratuvarında 1995-2000 yıllarında saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitol Derg* 2002; 26(3): 286-91.
28. Nihal Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. The prevalence of intestinal parasites according to the distribution of the patients' gender and parasite species for five years at the Osmangazi University Medical Faculty. *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32(2): 120-5.
29. Uyar Y, Taylan Ozkan A. Antigen detection methods in diagnosis of amebiasis, giardiasis and cryptosporidiosis. *Türkiye Parazitol Derg* 2009; 33(2): 140-50.
30. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 2010; 124(1): 80-9.
31. 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.