

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ (TIP) DOKTORA PROGRAMI

***Trichomonas vaginalis* ve *Cryptosporidium parvum* PARAZİTLERİNDE
BULUNAN SİSTEİN PROTEAZ GENLERİNİN KLONLANMASI VE
REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ**

ZEYNEP ERDEM AYNUR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. BÜLENT BOZDOĞAN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TPF18034 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	3
2.1.1. Taksonomi	3
2.1.2. Morfolojisi	5
2.1.3. Genotipik Özellikleri	6
2.1.4. Virulans Faktörleri	8
2.1.4.1 Tutunma faktörleri	8
2.1.4.2. Hücresel hasar verenler	10
2.1.4.3. Isı şoku proteinleri	10
2.1.4.4. <i>Contingency</i> genleri	11
2.1.5. Yaşam Döngüsü	12
2.1.5.1. Eksistasyon (kistin açılması) dönemi	12
2.1.5.2. Merogoni dönemi	13
2.1.5.3. Gametogoni dönemi	14
2.1.5.4. Döllenme dönemi	14
2.1.5.5. Ookist dönemi	14
2.1.5.6. Sporogoni dönemi	14
2.1.6. Epidemiyolojisi	16
2.1.6.1. İnsanlardaki epidemiyolojisi	17
2.1.6.2. Buzağılardaki epidemiyolojisi	24
2.1.6.3. Su Örneklerindeki epidemiyolojisi	28
2.1.7. Bulaş	30

2.1.8. Patogenez.....	32
2.1.9.Cryptosporidiosis.....	33
2.1.9.1. İntestinal kryptosporidiozis	33
2.1.9.1.1. Asemptomatik taşıyıcılar	33
2.1.9.1.2. Akut Sınırlı enfeksiyon.....	34
2.1.9.1.3. Kronik enfeksiyon	34
2.1.9.1.4. Fulminant enfeksiyon	34
2.1.9.2. Respiratuar cryptosporidiosis	34
2.1.9.3. Hepatobiliyer cryptosporidiosis.....	34
2.1.9.4. Pankreatik cryptosporidiosis.....	35
2.1.10.Tanı.....	35
2.1.11. Tedavi	42
2.1.12. Korunma	43
2.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	44
2.2.1. Tarihçe.....	44
2.2.2 Taksonomisi	44
2.2.3. Morfolojisi.....	45
2.2.3.1. Genel Morfolojisi	45
2.2.4. Beslenme ve Hareket	46
2.2.5. Moleküler Yapısı	47
2.2.6. Virulans Faktörleri.....	47
2.2.6.1. Hücre penetrasyonu(sitoaderens)ndan sorumlu virulans faktörler.....	47
2.2.6.2. Sitotoksisite	48
2.2.6.3. Hemoliz	49
2.2.6.4. Apoptozis.....	49
2.2.6.5. İmmun sistemden kaçış	49
2.2.7. Yaşam Döngüsü.....	50
2.2.8. Epidemiyolojisi	51
2.2.9. Patogenez ve trikomoniyaz.....	52
2.2.10. Tanı.....	53
2.2.10. 1. Direkt mikroskopik inceleme	53
2.2.10.2. Boyama	53
2.2.10.3. Kültür.....	54
2.2.10.4.Serolojik testler.....	54

2.2.10.5. Hızlı tanı kitleri.....	54
2.2.10.6. Moleküler testler.....	54
2.2.11. Tedavi.....	55
2.3. Proteazlar.....	55
2.3.1. Proteazların Sınıflandırılması.....	56
2.3.1.1. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar.....	57
2.3.1.1.1.Ekzopeptidazlar.....	57
2.3.1.1.2.Endopeptidazlar.....	57
2.3.1.2. Aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar.....	57
2.3.1.2.1. Serin proteazlar.....	57
2.3.1.2.2. Aspartil proteazlar.....	58
2.3.1.2.3. Metallo proteazlar.....	58
2.3.1.2.4. Sistein Proteazlar.....	58
2.3.1.3. Kaynağına göre proteazlar.....	58
2.3.1.3.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar.....	58
2.3.1.3.2. Hayvansal kaynaklı proteazlar.....	59
2.3.1.3.3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar.....	59
2.3.2. Parazitik Protozoonlarda Bulunan Sistein Proteazlar.....	60
2.3.2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' da sistein proteazlar.....	60
2.3.2.2. <i>Trichomonas vaginalis</i> ' te bulunan sistein proteazlar.....	65
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	69
3.1.Gereç.....	69
3.1.1. İzolasyon Örnekleri.....	69
3.1.2 Klonlama Vektörleri ve Kompetan Hücre.....	69
3.1.3. Besiyerleri.....	69
3. 1. 3. 1. Blood agar.....	69
3. 1. 3. 2. Brain hearth infusion broth.....	69
3. 1. 3. 3. Trypton soy broth.....	70
3. 1. 3. 4. Kanamisin içeren seçici besiyerinin hazırlanması.....	70
3.1.3. 5. Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi için seçici besiyerinin hazırlanması.....	70
3. 1. 3. 6. Skim milk powder.....	70
3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar ve Ayraçlar.....	70
3.1.4.1. EDTA (0,5 M).....	70
3.1.4.2. %10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Stok Solüsyonu.....	71

3.1.4.3. %1,5 Amonyum Persülfat (APS)	71
3. 1. 4. 4. Tris (1M)	71
3. 1. 4. 5. NaCl (5M)	71
3. 1. 4. 6. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer.....	71
3. 1. 4. 7. Gel Loading Buffer (6X)	72
3. 1. 4. 8. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA).....	72
3. 1. 4. 9. Sarkozin (%10).....	72
3. 1. 4. 10. Kanamisin Stok Solüsyonu.....	72
3. 1. 4. 11. IPTG Stok Solüsyonu (0.1M).....	72
3.1.4.12. 1M CaCl ₂ stok solüsyonunun hazırlanması	73
3.1.4.13. 1M MgCl ₂ stok solüsyonunun hazırlanması.....	73
3.1.4.14. %10 Gliserol içeren solüsyonun hazırlanması	73
3.1.4.15. Sodyum deoksikloat (%10)	73
3.1.4.16. RIPA Buffer hazırlama.....	74
3.1.4.17. Separasyon Buffer hazırlama.....	74
3.1.4.18. Stacking Buffer hazırlama	74
3.1.4.19. Sample Buffer hazırlama	74
3.1.4.20. Running Buffer hazırlama	74
3.1.4.21. Destaining solüsyon hazırlanması	75
3.1.4.22. Coomassie Brilliant Blue solüsyonunun hazırlanması	75
3.1.5.Genotipik Çalışmalar.....	75
3.1.5.1. 10X Taq Buffer, dNTP, Taq DNA polimeraz	75
3.1.5.2. Primerler	75
3.1.5.3.Kullanılan cihazlar.....	81
3.1.5.4. Agarose jel hazırlanışı	81
3.1.5.5. Marker	82
3.1.6. Protein Analizi.....	82
3.1.6.1. Seperasyon jelinin hazırlanması	82
3.1.6.2. Stacking jelinin hazırlanması	83
3.2. Yöntem	83
3.2.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. şüpheli dışkı örneklerinden ookist çoklaştırmaları.....	83
3.2.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. tayini için Kinyoun Asit-Fast Boyama	83
3.2.3. <i>Cryptosporidium</i> spp. tayini için İmmunfloresan Antikor Testi	84

3.2.4. Mikroskopi sonrası <i>Cryptosporidium</i> spp. pozitif bulunan örneklerden DNA izolasyonu.....	84
3.2.5. PCR.....	85
3.2.5.1 PCR miksinin hazırlanması	85
3.2.5.2. Amplikonların elektroforez tankına yüklenmesi	87
3.2.5.3. Yürütme	87
3.2.5.4. Görüntüleme ve değerlendirme	87
3.2.6. Klonlama	88
3.2.6.1. pET28a içeren <i>Escherichia coli</i> BL21 suşundan plazmit ekstraksiyonu.....	88
3.2.6.2. pET28a plazmidi ile klonlanacak genleri içeren amplikonların restriksiyonu	89
3.2.6.3. Presipitasyon.....	90
3.2.6.4. pET28a plazmidi ve klonlanacak genleri içeren (cryptopain, cryptostatin ve CP 39) amplikonların ligasyonu	90
3.2.6.5. Kimyasal Transformasyon Yolu ile <i>E.coli</i> BL21 hücrelerinin hazırlanması.....	91
3.2.6.6. Kimyasal Transformasyon.....	91
3.2.6.7. İnsert Alan Rekombinant plazmidleri içeren kolonilerin seçimi ve doğrulanması	92
3.2.6.8. sekans analizi.....	92
3.2.7. SDS.....	92
3.2.7.1. Kısmi protein saflaştırması.....	92
3.2.7.2. SDS jelinin hazırlanması	93
3.2.7.3. Örneklerin hazırlanması	95
3.2.7.4. Örneklerin jelde yürütülmesi	95
3.2.7.5. Jel boyama	95
3.2.8. Rekombinant Olarak Üretilen Proteinlerin Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	96
4. BULGULAR	97
5. TARTIŞMA.....	113
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR.....	122
ÖZGEÇMİŞ.....	153

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AIDS	: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
C°	: Santigrat derece
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
HSP	: Isı şoku proteini
kDa	: Kilodalton
PCR	: <i>Polimerase Chain Reaction</i>
RNA	: Ribo Nükleik asit
α	: Alfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Cryptosporidium spp.</i> ‘ ye ait virulans faktörleri.....	12
Şekil 2. <i>Crptosporidium</i> ’un bulaş yolu.....	15
Şekil 3 <i>Cryptosporidium</i> ’ un yaşam döngüsü.....	16
Şekil 4. <i>T. vaginalis</i> trofozoitinin şematik görüntüsü	47
Şekil 5. <i>Trichomonas vaginalis</i> ’in yaşam döngüsü.....	51
Şekil 6. Çoklu dizi hizalaması yapılarak <i>Cryptosporidium</i> ve diğer türlerin karşılaştırılması.....	63
Şekil 7. Cryptostatin ‘nin <i>Entamoeba histolytica</i> EhSPİ2’nin (pdb: 3M86) kristal yapısına dayandırılarak yapılan homoloji modellemesi.....	63
Şekil 8. İmmungold elektron mikroskobu yöntemiyle cryptostatin ve cryptopain-1’in lokalizasyonunun gösterilmesi.....	64
Şekil 9. <i>Trichomonas vaginalis</i> genom sekansında sınıflandırılan 440 proteinazın daire grafiğinde gösterimi.....	65

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>İn vitro</i> kültürde Giemsa ile boyanmış trofozoit görünümü.....	46
Resim 2. Papain enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi	59
Resim 3. <i>Cryptosporidium</i> oookistlerinin Kinyoun asit fast boyama yöntemi ile gösterilmesi	97
Resim 4. Crypto-Giardia immunfloresan antikor testi ile değerlendirme sonrası floresans mikroskopisi görüntüsü	98
Resim 5 . Sekans sonrası değerlendirme sonucu.....	101
Resim 6. <i>cryptostatin</i> ve <i>pET28a</i> ile <i>cryptopain</i> ve <i>pET28a'</i> nin <i>EcoRI</i> ve <i>XhoI</i> ile endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü	102
Resim 7. <i>Cryptostatin</i> geninin <i>pET28a'</i> ya transformasyonu sonrası seçici besiyerindeki görünümü.....	103
Resim 8. <i>Cryptopain</i> geninin <i>pET28a'</i> ya transformasyonu sonrası seçici besiyerindeki görünümü.....	103
Resim 9. <i>Cryptostatin</i> 'nin koloni PCR sonrası elektroforez görüntüsü.....	104
Resim 10. <i>Cryptopain</i> 'nin koloni PCR sonrası elektroforez görüntüsü.....	104
Resim 11. <i>cryptostatin</i> insertini almış <i>cs7</i> klonunun restriksiyon analizi.....	105
Resim 12. <i>cryptopain</i> insertini almış <i>cp3</i> klonunun restriksiyon analizi.....	105
Resim 13. <i>CP39</i> ve <i>pET28a'</i> nin <i>EcoRI</i> ve <i>XhoI</i> ile endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü.....	106
Resim 14. <i>CP39'</i> un klonlama sonrası seçici besi yerindeki görüntüsü.....	107
Resim 15. <i>CP39</i> genine ait koloni PCR sonrası elektroforez görüntüsü.....	107
Resim 16. <i>CP39</i> insertini almış <i>ts1</i> klonunun restriksiyon analizi.....	109
Resim 17. <i>cryptostatin</i> genine ait sekans sonrası değerlendirme sonucu	109
Resim 18. <i>cryptopain</i> genine ait sekans sonrası değerlendirme sonucu	109
Resim 19. <i>CP39</i> genine ait sekans sonrası değerlendirme sonucu	109
Resim 20. <i>pET28a</i> + <i>cryptostatin</i> içeren BL21 total proteini.....	110
Resim 21. <i>pET28a</i> + <i>cryptopain</i> içeren BL21 total proteini.....	110
Resim 22. <i>pET28a</i> + <i>CP39</i> içeren BL21 total proteini.....	111
Resim 23. Üretilen rekombinant proteinlerin ve <i>pET28a</i> içeren BL21' in jelatinaz aktivitesi.....	112

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Cryptosporidium</i> cinsinin taksonomideki yeri	4
Tablo 2. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un subgenotipleri.....	7
Tablo 3. <i>Cryptosporidium hominis</i> ' in subgenotipleri.....	7
Tablo 4. Dünyada <i>C. parvum</i> ' un HIV pozitif insanlardaki prevalansı.....	18
Tablo 5. Cryptosporidiosis sıklığı.....	19
Tablo 6. Ülkemizde ve bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda <i>Cryptosporidium</i> spp. görülme sıklığı.....	23
Tablo 7. Türkiye' de cryptosporidiosis olgularının mevsimsel dağılımı	24
Tablo 8. Dünyada ve Türkiye' de buzağılarda <i>Cryptosporidium</i> spp. prevalansı	27
Tablo 9. Farklı tipte su kaynaklarında (1 litrede) bulunan fekal indikatörlerin ve enterik patojenlerin sınır değerleri.....	29
Tablo 10. İçme suyu örneklerinde bulunan ve suyla taşınan patojenler.....	30
Tablo 11. Dünyada su ve gıda kaynaklı <i>Cryptosporidium</i> salgınları.....	31
Tablo 12. <i>Trichomonas vaginalis</i> ' te bulunan sistein proteazların virulans özellikleri.....	67
Tablo 13. <i>Cryptosporidium</i> spp.' nin moleküler olarak doğrulanması için gerekli olan cinse özgü 18s rRNA primer çiftleri.....	76
Tablo 14. Kullanılan primerler.....	76
Tablo 15. Mastermixin hazırlanma oranları.....	86
Tablo 16. <i>Cryptosporidium</i> spp. spesifik 18s rRNA PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	86
Tablo 17. <i>Cryptopain</i> geninin amplifikasyonundaki ısıl döngü ve süre diyagramı...	86
Tablo 18. <i>Cryptostatin</i> geninin amplifikasyonundaki ısıl döngü ve süre diyagramı.	86
Tablo 19. <i>CP39</i> geninin amplifikasyonundaki ısıl döngü ve süre diyagramı.....	87
Tablo 20. pET28a plazmid DNA' sının <i>EcoRI</i> ve <i>XhoI</i> endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu	89
Tablo 21. Hedef bölgeye ait ampliconların (<i>Cryptopain</i> , <i>Cryptostatin</i> ve <i>CP39</i>) <i>EcoRI</i> ve <i>XhoI</i> endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu.....	89
Tablo 22. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	90

Tablo 23. %15' lik separasyon jeli hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	94
Tablo 24. Stacking jeli hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	94
Tablo 25. <i>Cryptosporidium</i> şüpheli dışkı örneğinin alındığı yer, çiftlik numarası, ookist varlığı ile <i>Cryptosporidium</i> spesifik PCR sonuçları	98



ÖZET

***Trichomonas vaginalis* ve *Cryptosporidium parvum* PARAZİTLERİNDE BULUNAN SİSTEİN PROTEAZ GENLERİNİN KLONLANMASI VE REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ**

Aynur ZE. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Tıp) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Protozoa âleminin Apicomplexa filumunda yer alan *Cryptosporidium* türleri ökaryotik protozoonlardır ve tüm türleri hücre içi parazitlerdir. Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* cinsine bağlı, protozoonların neden olduğu, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan ve 100'den fazla canlı türünde görülen zoonoz bir hastalıktır. Flagellalı bir protozoon olan *Trichomonas vaginalis*, insanlarda üreme yolu enfeksiyonu olan trikomoniyaza neden olur. Trikomoniyaz dünyada viral olmayan cinsel yolla bulaşan en yaygın hastalıktır. *T. vaginalis*, idrar yolu, vajina ve prostata bulaşan, flagellalı, tek hücreli, anaerobik bir protozoondur. Sistein proteazlar hem *Cryptosporidium* hem de *Trichomonas* suşlarında önemli virulans faktörleri arasındadır. Birçok parazitte bulunan ve invazyonda önemli olan bu enzimler ilaç tasarımları için hedef olarak kabul edilirler.

Bu çalışmada patojen olan *Cryptosporidium parvum* ve *Trichomonas vaginalis* türlerinin sistein proteaz genlerinin klonlanması amaçlanmıştır. Klonlamada kullanılmak amacıyla gen pozitif örnek bulmak için 63 *Cryptosporidium spp* ve 28 *T. vaginalis* örneği çalışılmış ve cryptopain için, 22(%35) ve CP39 içinse 19(%68) pozitiflik bulunmuştur. Tüm cryptopain pozitif suşların aynı zamanda cryptostatin için de pozitif olduğu saptanmıştır. Cryptopain, cryptostatin ve CP39 için pozitif saptanan örneklerden, restriksiyon enzim tanıma bölgeleri eklenerek oluşturulan primerler yardımıyla PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Amplikonlar pET-28a ekspresyon plazmidine yerleştirilmiş ve *E.coli* BL21 suşuna transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Klonlanan cryptostatin, cryptopain ve *cp39* genlerinden protein sentezlenip sentezlenmediği SDSPage yöntemiyle test edilmiştir. Transformantların sistein proteaz aktivitesinin belirlenmesi için jelatini parçalama özelliği test edilmiş sonuçta hem cryptopain hem de *CP39* genleri aktarılmış *E.coli* BL21 suşlarının jelatinaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Cryptostatinin bu aktiviteyi önleme etkisi test edilmiş ve jelatinaz aktivitesinin önlendiği belirlenmiştir.

Rekombinant olarak üretilen sistein proteazların tanıda ve tedavide kullanım potansiyeli vardır. Bu proteinlerin antijen olarak kullanılmasıyla elde edilecek antikorların tanı kitlerinde kullanım olasılığı mevcuttur. Bu proteazların hasarlı dokuda debridman olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca sistein proteazların başka parazitlerde aşı antijeni olarak kullanımı üzerine çalışmalar mevcuttur. Proteaz inhibitörlerinin ise parazit enfeksiyonlarının tedavisinde ilaç olarak kullanılma olasılığı vardır.

Anahtar Kelimeler: *Trichomonas vaginalis*, *Cryptosporidium parvum*, sistein proteaz, klonlama, rekombinant üretim



ABSTRACT

CLONING AND RECOMBINANT PRODUCTION OF CYSTEINE PROTEASE GENES IN THE PARASITES OF *Trichomonas vaginalis* and *Cryptosporidium parvum*

Aynur ZE. Aydin Adnan Menderes University Institute Parasitology (Medicine)
Program PhD Thesis Aydin, 2020.

The *Cryptosporidium* species in the *Apicomplexa* phylum of the Protozoa realm are eukaryotic protozoons and all species are intracellular parasites. Cryptosporidiosis is a zoonotic disease that is caused by protozoal species in the genus *Cryptosporidium* and has been reported in more than 100 species. *Trichomonas vaginalis* is a flagellated, single-celled and anaerobic protozoon that causes trichomoniasis in humans. This protozoal infection affects the reproductive tract, urinary tract, vagina and prostate. Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted disease in the world.

Cysteine proteases are among the major virulence factors in both *Cryptosporidium* and *Trichomonas* strains. These enzymes, which are found in many parasites and are important in invasion, are considered as targets for drug designs.

In this study, it was aimed to clone the cysteine protease genes of the pathogen *C. parvum* and *T. vaginalis* species. In order to find gene positive samples for cloning, 63 *Cryptosporidium* spp and 28 *T. vaginalis* samples were studied and 22 (35%) and 19 (68%) positivity were found for cryptopain and CP39, respectively. All cryptopain positive strains were also found to be positive for cryptostatin. Cryptopain was amplified using PCR method with the help of primers created by adding restriction enzyme recognition regions from the samples found positive for cryptostatin and CP39. Amplicons were placed in the expression plasmid pET-28a and transferred to *E. coli* BL21 strain by transformation. Protein synthesis of the cloned cryptostatin, cryptopain and cp39 genes was tested by SDS Page method. The cysteine protease activity of transformants was tested against gelatin. It has been determined that *E. coli* BL21 strains showing both gelatinase activity have been transferred to both cryptopain and CP39 genes. Prevention of gelatinase activity of cryptostatin was tested and it was found that gelatinase activity was inhibited.

Recombinantly produced cysteine proteases have the potential to be used in diagnosis and treatment of protozoal infections. It is possible to use the antibodies produced against these proteins as antigens in diagnostic kits. It is envisaged that these proteases can be used as debridement in damaged tissue. Also, there are studies on the use of cysteine proteases as vaccine antigens in other parasites. In conclusion, protease inhibitors can be used as drugs in the treatment of parasitic infections.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, *Cryptosporidium parvum*, cysteine protease, cloning, recombinant production



1. GİRİŞ

Cryptosporidium spp. hücre içi ve ekstrasitoplazmik bir protozondur. İnsanları da kapsayan çok sayıda omurgalı türünde gastrointestinal mikrovilluslarda hasara neden olan apikompleksa şubesinde yer alan parazitlerdir. Klinik tablo enfekte konağın, immun durumuna ve yaşına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda ve immunsupresif hastalarda 20 litreye varabilen kolera benzeri diyareye neden olup, hayatı tehdit edici bir tablo oluşturabilmektedir. Hastalık koruma ve kontrol merkezi (CDC)'nin verilerine göre biyoterörizm ajanı olarak değerlendirilen ve kategori B'de yer alan tek parazit türüdür. *Cryptosporidium* türlerinin yaptığı hastalığa kriptosporidiyoz adı verilir. Cryptosporidiosis intestinal, respiratuar, hepatobiliyer ve pankreatik cryptosporidiosis olmak üzere dört farklı klinik tablo görülür (Griffiths ve ark, 1998). Zoonotik tür olarak öne çıkan *C. parvum* dünyada oldukça yaygın olarak bulunmakta gelişmekte olan ülkelerin yanı sıra uygulanan mücadele programlarına rağmen gelişmiş ülkeleri de önemli düzeyde etkilenmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 15 milyon insanın ishal şikayeti ile kliniklere başvurduğu, bunun yaklaşık 300.000 kadarına kriptosporidiyoz teşhisi konduğu ve bu düzeyin gıdaya bağlı ishal olgularından 45 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Fayer ve ark, 2000).

Flagellalı bir protozoon olan *Trichomonas vaginalis* ise, insanlarda ürogenital sistem enfeksiyonu olan trikomoniyaze neden olur (Poole ve McClelland, 2013). Trikomoniyaz dünyada viral olmayan cinsel yolla bulaşan en yaygın hastalıktır. *T. vaginalis*, idrar yolu, vajina ve prostata bulaşan, flagellalı, tek hücreli, anaerobik bir protozondur (Schwebke ve Burgess, 2004).

Proteazlar veya peptidazlar peptid bağlarının hidroliz reaksiyonu ile yıkımını katalizler. Peptid bağlarını parçalamakta substrat bağlama bölgelerinde bulunan sisteinleri kullananlara sistein proteazlar adı verilir. Sistein proteazlar hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır. Sistein proteaz inhibitörleri (SPI); *chagasin* inhibitörlerinin benzeri olup oldukça küçük proteinlerdir ve düşük molekül ağırlıklarına (11-15 kDa) sahiptirler. Bazı parazitik protozoonlarda, bakterilerde ve arkealarda tanımlanmışlardır (Rigden ve ark, 2002). SPIler (cryptostatin, thyropin vb.) arasında düşük sekans benzerlikleri mevcuttur. İlk olarak tanımlanan SPI *Trypanosoma cruzi* 'den elde edilen chagasindir. Sistein proteazlar bir çok parazitte önemli virülans faktörleridir ve ilaç

tasarımları için hedefler sağlamaktadır (Sajid ve McKerrow, 2002) *T. Cruzi*'de bulunan sistein proteinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, bunların Chagas hastalığına karşı tedavide kullanılabileceğini göstermiştir. Toksoplazmoz *Toxoplasma gondii* parazitinin etken olduğu özellikle gebelerde ve immün yetmezliği olan hastalarda ağır seyredilen bir hastalıktır. AIDS hastalarında sülfalalerjilerinin sıklığı, toksoplazmozun tedavisinin de sorun olmaktadır. Toksoplazmadan izole edilen *cathepsinB* (TgCPB) spesifik inhibitörleri *in vitro* ortamda takizoitlerin istilasını engellediği gösterilmiştir (Que ve ark, 2002).

Bu tez çalışmasında patojen olan *C. parvum* ve *T. vaginalis* türlerinin önemli virulans faktörlerinden olan sistein proteaz genlerinin klonlanması amaçlanmıştır. Bunun için koleksiyonumuzda bulunan *T. vaginalis* ve *C. parvum* örnekleri kullanılmıştır. Sistein proteaz inhibitörü olan *cryptostatin* ve sistein proteaz olan *cryptopain* genleri *C.parvum*'dan ve sistein proteaz kodlayan *cp39* geni *T. vaginalis*'ten PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Amplikonlar pET-28a ekspresyon plazmidine yerleştirilmiş ve *E. coli BL21* suşuna transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Klonlanan *cryptostatin*, *cryptopain* ve *cp39* genlerinin ekspresyonu moleküler ve mikrobiyolojik yöntemlerle doğrulanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. *Cryptosporidium parvum*

2.1.1.Taksonomi

İlk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilen ve “fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1907 yılında Amerikalı parazitolog Ernest Edwart Tyzzer tarafından Yunanca’da gizli spor anlamına gelen *Cryptosporidium* olarak isimlendirilmiştir. Tyzzer 1910 yılında bu protozoonun seksüel ve aseksüel gelişimini açıklayarak ookistlerin dışkı ile dışarı atıldığını ve ookistlerin içindeki sporozoitlerin serbest halde olduğunu tespit etmiştir. 1911 yılında ise Leger tarafından *Cryptosporidium* türlerinin sınıflandırmadaki yeri ilk olarak belirlenmiştir (Dubey ve ark, 1990). 1955 yılında ise hindilerde bu parazite bağlı (*C. meleagridis*) rapor edilen ilk ölüm görülmüştür (Slavin, 1955).

Toxoplasma, *Cyclospora*, *Isospora* ve *Sarcocystis* gibi *Cryptosporidium*’ da *Eucoccidiorida* taksonomik grubunda bulunan apikompleksan bir parazittir (Levine,1984). Memeli, sürüngen, kuş ve balıklar gibi birçok konakta hastalığa neden olan *Cryptosporidium* cinsi organizmalar; koksidiyan alt sınıfına ait protozoonlardır . 100’ün üzerinde farklı türü rapor edilen bu parazit, dünyada yaygın olan patojen bir protozoondur (Spano ve Crisanti 2000). İnsanlarda ve hayvanlarda *Cryptosporidium* türleri ishal ve gastroenteritin önemli sebeplerinden biri olarak bilinmektedir.

Tablo 1. *Cryptosporidium* cinsinin taksonomideki yeri (Tyzzer, 1912; Xiao ve ark, 2002)

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik Özellikler
Alem	<i>Animalia</i>	
Alt Alem	<i>Protista</i>	Ökaryotik, tek hücreli canlı
Şube	<i>Apicomplexa</i>	Mikrotübüllerden oluşan apikal kompleks yapıları olup, veziküler bir çekirdeğe sahiptir ve tüm türleri parazittir
Sınıf	<i>Sporozoa</i>	Ookist oluşturma, seksüel ve aseksüel üreme, hücreye giren parazitin kayma kontraksiyon şeklinde hareketi vardır
Alt Sınıf	<i>Coccidia</i>	Yaşam döngüleri merogoni, gametogoni ve sporogoni şeklinde olup çoğu omurgalıda parazit olarak yaşarlar.
Takım	<i>Eucoccidia</i>	Merogoni evresi omurgalı konakta geçer.
Alt Takım	<i>Eimeriina</i>	Makro ve mikrogamet oluşumu farklıdır. Zigot hareketsiz olup konoid mevcuttur.
Aile	<i>Cryptosporidiidae</i>	Monoksen gelişim söz konusudur ve konak süreci yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez, çıplak 4 sporozoiti vardır.
Cins	<i>Cryptosporidium</i>	

Bu tabloda, farklı konaklardan izole edilen *Cryptosporidium* türlerinin, ookist duvarı ve sporozoit antijenleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve türler arasında farklılıklar gösterilmiştir. Tyzzer'ın farelerde yaptığı çalışma sonucunda, büyük ookist yapısıyla mide paraziti olan *C. muris* ve küçük ookist yapısıyla bağırsak paraziti olan *C. parvum* olarak iki tür tanımlanmıştır (Tyzzer, 1912; Xiao ve ark, 2002).

Bugüne kadar *Cryptosporidium* cinsine ait olan 27 tür belirlenmiştir (Ryan ve ark,2014,2015). Bunlardan 3 tanesi (*C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli*) kuşlarda; 19 türü (*C. muris*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis*, *C.bovis*, *C. fayeri*, *C. macropodum*, *C. ryanae*, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. tyzzeri*, *C. viatorum*, *C. scrofarum* ve *C. erinacei*) memelilerde; 1 türü (*C. fragile*) amfibilerde ; 2 türü (*C. serpentis* ve *C. varanii*) reptillerde ve 2 türü ise (*C. molnari* ve *C. huwi*) balıklarda bulunmuştur. (Ryan ve ark. 2014,2015). *C.parvum*, *C.hominis*, *C.meleagridis*, *C.felis*, *C.canis*, *C.suis* ve *C.muris*) olmak üzere 7 farklı *Cryptosporidium* türü insanlarda hastalığa sebep olmakta, fakat

salgınların ve vakaların çoğunda *C.parvum* ve *C.hominis* saptanmaktadır (Cacciò ve ark 1999).Şu ana kadar 40 genotipi tanımlanmış olmakla beraber artan biyolojik ve moleküler çalışmalar doğrultusunda bu sayıda da artış olabileceği düşünülmektedir.

2.1.2.Morfolojisi

Ökaryotik protozoon olan *Cryptosporidium* Protozoa âleminin Apicomplexa filumunda yer almaktadır. Hücre içi parazitler olan *Cryptosporidium* cinsindeki tüm türlerin DNA'ları bir çift zarla etrafi çevrili olan nükleus içinde bulunur (Fayer 2008).

Cryptosporidium; konak hücre içerisinde bulunduğu yere göre; diğer hücre içi parazitlerinden ayrılırlar (Huang ve ark, 2014).

Bu ayrıma neden olan özellikler:

1) Hücre içi yerleşim gösteren diğer parazit türleri hücrenin sitoplazmasına yerleşirken, *Cryptosporidium* türleri hücrenin ekstrasitoplazmik alanında yerleşirler. (Unat ve ark, 1995).

2) Parazitte konak hücreye bağlanmasının ardından kendi için gerekli besin maddelerini almasını kolaylaştıran çok membranlı bağlanma ya da beslenme organeli benzeri oluşan paraziter vakuol oluştururlar.

3) İnce ya da kalın duvarlı iki farklı ookistleri vardır.

4) Boyutu 5.0 x 4.5 µm olan küçük ookistleri sporokist, mikrofil ve polar granül içermezler (Petry,2004).

5) Tüm anti-koksidiyal ilaçlara karşı dirençlidirler (Cabada ve White, 2010).

6) Anti- kriptosporodiyal monoklonal antikolar gregarinlerle çapraz reaksiyon verirler (Bull ve ark,1998).

Ookistlerinin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistlerinin olmaması nedeniyle *Cryptosporidium* (=gizli sporokistler) olarak isimlendirilmiştir (Tyzzer 1912).

Genomik ve biyokimyasal veriler *Cryptosporidium*'un diğer apikompleksan parazitlerden apikoplast organelinin eksik olması nedeniyle de farklı olduğunu göstermiştir (Abrahamsen ve ark,2004).

Moleküler çalışmalar; *Cryptosporidium* türlerinin gregarinlere koksidiyanlardan daha yakın olduğunu göstermiştir. *Cryptosporidium* türleri ile gregarin türü olan *Ascogregarina taiwanensis*'in tüm genom analizi karşılaştırıldığında filogenetik açıdan benzer oldukları

saptanmıştır (Templeton ve ark,2010). Yapılacak olan genomik çalışmalar *Cryptosporidium* türlerinin taksonomik yerlerinin çok daha iyi anlaşılabilmesini sağlayacaktır.

İnsanlar yaklaşık 20 farklı *Cryptosporidium* genotipi ile enfekte olabilirken en sık rapor edilenleri *C. parvum* ve *C. hominis*'tir (Ryan ve ark, 2014).

2.1.3. Genotipik Özellikleri

Cryptosporidium türlerine ait ookistlerin yapısında, büyüklüğü 0.9-1.4 Mb arasında değişen 8 adet kromozom bulunmaktadır. Genomun GC oranı %30-40 arasında değişmekte olup, toplam genom uzunlukları *C. parvum*'da 9,11 Mb ve *C. hominis* 'te 9,16 Mb olduğu bilinmektedir. Kromozom üzerinde bulunan gen sayıları türler arasında farklılıklar göstermektedir. Örneğin; *C. hominis* 'te 3.994, *C. parvum* 'da 3.952 gen bulunmaktadır. (Thompson ve ark, 2005; Kissinger, 2008). Genomun G+C oranı ise *C. parvum*'da %30.3 iken, *C. hominis* 'te %31.7'dir. Genlerin %5- 20'sinde intron yoktur. *C. parvum*'da kodlanmayan bölge büyüklüğü 2.32 Mb iken, *C. hominis*'de 2.87 Mb'dir (Abrahamsen ve ark, 2004). *C. parvum* ve *C. hominis* türleri incelendiğinde genom uzunluğundaki değişikliklere rağmen genomlarının %97 oranında aynı olduğu ve türleri arasındaki fenotipik farklılıkların genler arasındaki çok küçük değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki türde de 4 - 5 adet tRNA, 6 adet 5S rRNA ve 5 adet 5.8S, 18S ve 28S RNA genleri bulunmaktadır (Kissinger, 2008).

Cryptosporidium hominis'in Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig olmak üzere toplam 6, *C. parvum*'un IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIe, IIg, IIh, Iii, IIk, III olmak üzere toplam 11 subtip familyası tespit edilmiştir. *C. parvum*'un bu subtip familyalarından IIa, IIb ve IId zoonotik olup çok sayıda subgenotipleri bulunmuştur. *C. parvum* IIa subtip familyasının 45 subgenotipi tanımlanmış olup, bunlardan 18'i hem insan hem de sığırlarda bulunmaktadır. *C. parvum* IId'nin ise 13 subgenotipi vardır ve bunlardan 6'sı insan ve sığırlarda görülmektedir. İnsan ve hayvanlarda en çok görülen zoonotik tip *C. parvum* IIa subtip familyasıdır. Dünyada en yaygın olarak görülen zoonotik subtipler ise IIaA15G2R1 ve IIaA18G3R1'dir. *Cryptosporidium* türlerinin GP-60 gen sekans analizi sonucu yüksek derecede genetik polimorfizm gösterdiği ve bu nedenle çok sayıda genotiplerinin belirlendiği kaydedilmiştir (Plutzer ve Karanis 2007, Thompson ve ark. 2007). Dünyada 61 *Cryptosporidium* subgenotipi rapor edilmiştir. Bunlardan 24 subgenotip insanlara bulaşmaktadır(Plutzer ve Karanis 2007, Thompson ve ark. 2007).

Konak spektrumu geniş olan ve sığırlarda da yaygın olarak bulunan *C. parvum* türünün GP60 lokusundaki subgenotipleri Tablo 2 'de görülmektedir (Nichols 2008).

Tablo 2. *Cryptosporidium parvum*' un subgenotipleri (Nichols, 2008)

Subtip Familya	Konak/Ookist Kaynağı	Subgenotipi
<i>C. parvum IIa</i>	Buzağı- insan (zoonotik)	IIaA15G2R1, IIaA15G2R2, IIaA16G1R1 (45 subgenotipi, 16'sı sığır ve insanlarda)
<i>C. parvum IIb</i>	İnsan, Buzağı, Koyun(zoonotik)	IIbA14
<i>C. parvum IIc</i>	İnsan (Antroponotik)	IIcA5G3a, IIcA5G3b, IIcA5G3d
<i>C. parvum IId</i>	İnsan, Buzağı (zoonotik)	IIdA18G1 (13 subgenotipi, 6 sı sığır ve insanlarda)
<i>C. parvum IIe</i>	Antroponotik	IIeA12G1
<i>C. parvum IIIf</i>		IIIfA6
<i>C. parvum IIg</i>		IIgA9
<i>C. parvum IIh</i>		IIhA7G4
<i>C. parvum IIi</i>		IIiA10
<i>C. parvum IIk</i>		
<i>C. parvum III</i>		

Dünyada yaygın olarak bulunan türlerden olan ve insanların *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında etiyolojik olarak birinci derecede rol oynayan *C. hominis* türünün GP60 lokusundaki subgenotipleri Tablo 3.'de sunulmuştur (Nichols 2008).

Tablo 3. *Cryptosporidium hominis*' in subgenotipleri (Nichols, 2008)

Subtip familyası	Konak/ookist kaynağı	Subgenotip
<i>C. hominis Ia</i>	İnsan	IaA23R4
<i>C. hominis Ib</i>	İnsan	IbA10G2, IbA9G3
<i>C. hominis Id</i>	İnsan	IdA16
<i>C. hominis Ie</i>	İnsan	IeA11G3T3
<i>C. hominis If</i>	İnsan	IfA19G1
<i>C. hominis Ig</i>	İnsan	IgA24

Apicomplexa grubu parazitlerde bulunan mitokondri veya plastid organelleri *C. parvum*'da görülmemektedir (Üner ve ark, 2007).

Cryptosporidium spp. alt türlerinin belirlenmesi için son zamanlarda yapılan moleküler taksonomik çalışmalarda *Cryptosporidium* genotipleri 18S rRNA' daki ve 70 kDa *heat shock* protein genindeki farklılıklar esas alınmıştır (Plutzer, 2008).

2.1.4. Virulans Faktörleri

Cryptosporidium enfeksiyonunun başlaması ve devam etmesinden sorumlu faktörleri belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Cryptosporidium* normal olarak sistemik bir enfeksiyona neden olmaz ya da derin dokuya nüfuz etmez. Parazit bağırsak epitelinin apikal yüzeyinde membrana bağlı bir bölme içinde bulunur ve bağırsağın emilim ve salgı fonksiyonlarında önemli anormalliklere neden olur. Bu hasar, konak epitel hücrelerine ya doğrudan hasar verebilir ya da enflamasyon hücreleri ile sitokinlerin enfeksiyon bölgesine yönlendirilmesiyle dolaylı olarak olabilir (Okhuysen ve Chappell, 2002).

Virulans faktörleri, enfeksiyonu başlatması ve sürdürebilmesi için gerekli faktörlerdir. Bu faktörler, yaşam döngüsü boyunca, parazitin konak hücresine girdiği andan öldüğü ana kadar ya da başka bir deyişle yaşamsal döngüsünü tamamlayana ve konak hücreden atılana kadar sürer. Bu şekilde konak canlılarını etkileyebilirler (Fayer ve ark, 2009).

Cryptosporidium'un varsayılan virülans faktörleri, parazitin başlangıç etkileşim süreçlerinde yer alan genler olarak tanımlanmıştır. Bunlar; *Cryptosporidium*' un ookist ve sporozit evrelerinde bulunmaktadır (Wanyiri ve Ward, 2006).

2.1.4.1 Tutunma faktörleri

Enfeksiyonun oluşturulmasında kritik ilk adım, konak hücrelere parazitin bağlanmasıdır. Tutunma faktörleri; müsin benzeri glikoproteinler ve trombospondin olmak üzere iki ana sınıftan oluşmaktadır (Wanyiri ve Ward, 2006). Riggs ve meslektaşları tarafından; 1.300 kDa' boyutunda olan circumsporozoite benzeri glikoprotein (CSL)'nin sporozoit ve merozoitlerin apikal kompleksiyle ilişkili olduğu tanımlanmıştır. (Riggs ve ark, 1997, Langer ve Riggs 1999) . CSL, çözünür bir glikoprotein olarak salınır. İnsan ve sığır bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyindeki bir reseptöre spesifik olarak bağlanan bir ligand içerir (Langer ve Riggs 1999). CSL'ye karşı üretilen monoklonal antikorlar sporozoitler ve merozoitlerdeki değişimleri, sıtma sirkülerleri sporozoit çökelti (CSP) reaksiyonuna benzer

şekilde ortaya çıkar ve sporozoit bulaşıcılığının ,tamamen nötralize edilmesine neden olur (Riggs ve ark, 1997).

Glikoprotein 900 (gp900), sporozoit ekstraktlarının hiperimmün sığır kolostrumuyla immüno-çökeltilmesi ile tanımlanan büyük bir glikoproteindir. Bu mürin benzeri büyük glikoprotein, mikronemlerde ve invaziv merozoitler ile sporozoitlerin yüzeyinde bulunur. Gp900' ün konak hücre invazyonunda görev aldığı bilinmektedir (Barnes ve ark, 1998; Bonnin ve ark,2001). Gp900'ün amino asit dizisi, bir sinyal peptidine ve bir transmembran alana sahiptir (Barnes ve ark, 1998). *Cryptosporidium* türlerinin sporozoit ve merozoit evrelerinde yüzey proteini olarak gp15/40/60 komplekleri de tanımlanmıştır. Strong ve arkadaşları gp15/40/60 mRNA bölgesinin, *C. parvum* yaşam çevrimindeki , hücre içi aşamaları sırasında 60-kDa glikoprotein öncüsüne dönüştürüldüğünü kanıtlamışlardır(Strong ve ark, 2000). Bu çalışmadan bağımsız olarak Cevallos ve arkadaşları aynı geni *C. parvum* genomik DNA'sından klonlamış ve bunu Cpgp40 / 15 olarak adlandırmışlardır (Cevallos ve ark, 2000). Sentezden kısa süre sonra, 60 kDa öncüsü olan 15- ve 45-kDa glikoproteinleri de üretilmiştir. Gp40, parazitin yüzeyinde ve apikal bölgesinde lokalizedir ve yüzeyden salınırlar, oysa gp15 sporozoitlerin yüzeyindedir ve kayma hareketi sırasında salınmaktadır (Cevallos ve ark, 2000; Boulter ve ark, 2007). Bu yapıların parazitte motilitede, hücre istilasında ve parazitin konak hücreye bağlanmasında önem taşıdığı belirlenmiştir (Wanyiri ve Ward, 2006; O'Connor ve ark, 2009).

P23, antijenik olarak 23 kDa'lık bir sporozoit yüzey proteindir. Enfeksiyonun ilk safhalarında salınırlar ve coğrafi olarak farklı izolatlardan elde edilmiştir (Perryman ve ark, 1996). P23, *C. parvum*'a maruz bırakılan hayvanlarda ve insanlarda antikör yanıtlarını ortaya çıkarmaktadır. P23 nötralizasyona duyarlı epitoplara sahiptir. P23 antijeninin oluşturduğu monoklonal antikörler, farelerde enfeksiyonu belirgin olarak azaltmakta ve buzağları kriptosporidiosis'e karşı korumaktadır (Boulter ve ark,2007) .

TRAP-C1 (trombospondin ile ilişkili adeziv protein *Cryptosporidium* 1), sporozoitlerin apikal kutbuna yerleşmiş 76 kDa'lık bir proteindir. Diğer apikompleksan parazitlerde (*Plasmodium spp*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Neospora spp.*) bulunan TRAP' lere dizi ve yapısal homoloji göstermektedir (Boulter ve ark,2007). TRAP ve onlarla yapısal olarak ilişkili proteinler, parazitlerin kayma motilitesinden ve hücre penetrasyonundan sorumlu olabilmektedir (Boulter ve ark,2007).

2.1.4.2. Hücresel hasar verenler

Cryptosporidium enfeksiyonu sırasında enterosit mono tabakalarında; dar hücre kavşaklarının kesilmesi, bariyerlerdeki fonksiyon kaybı, laktat dehidrogenaz salımı ve artmış hücre ölüm oranları parazitin meydana getirdiği hücre hasarları olarak bildirilmiştir. Ayrıca fosfolipazlar, proteazlar ve hemolizinler doğrudan doku hasarına neden olabilmektedirler (Okhuysen ve Chappell,2002).

Proteazlar parazitin yaşam döngüsünde, protein bozulmasına aracılık etmede, konak dokularının istilası ve konak hücre bağışıklığından kaçınma gibi önemli işlevlere sahiptir (Que ve Reed 2000). *Cryptosporidium* sporozoitlerinde eksistasyon sürecinde; aminopeptidaz, sistein proteaz ve serin proteazın belirgin proteaz aktiviteleri tanımlanmıştır (Nesterenko ve ark,1995). Eksistasyon sırasında sporozoitlerdeki fonksiyonel proteazların tanımlanması ve proteaz inhibitörlerinin varlığında enfeksiyonun önlenmesi, proteazların *Cryptosporidium* enfeksiyonunun yaşam döngüsünün ilk evrelerinde önemli olduğunu göstermektedir (Okhuysen ve Chappell, 2002).

C. parvum' da bulunan hemolizin H4 faktörü koyun kanlı agarda tanımlanabilmiştir (Steele ve ark, 1995). Bu yapı enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7'ye benzer bir hemoliz meydana getirmektedir (Steele ve ark, 1995). H4'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, hücre membranlarını bozma kabiliyeti nedeniyle; hücre istilada ve / veya vakuolar zarların parçalanmasında, merozoitlerin parasitoforous vakuolden çıkmasında ve diğer hücrelere yayılmasında görev aldığı düşünülmektedir (Okhuysen ve Chappell, 2002). Bir başka *Cryptosporidium* proteini ise, *C.parvum* ATP bağlayıcı kaset (CpABC)'dir (CpABC) , bu proteinin parazitin konak hücrelerden gerekli besin maddelerini almada kilit rol aldığı düşünülmektedir (Perkins ve ark, 1999).

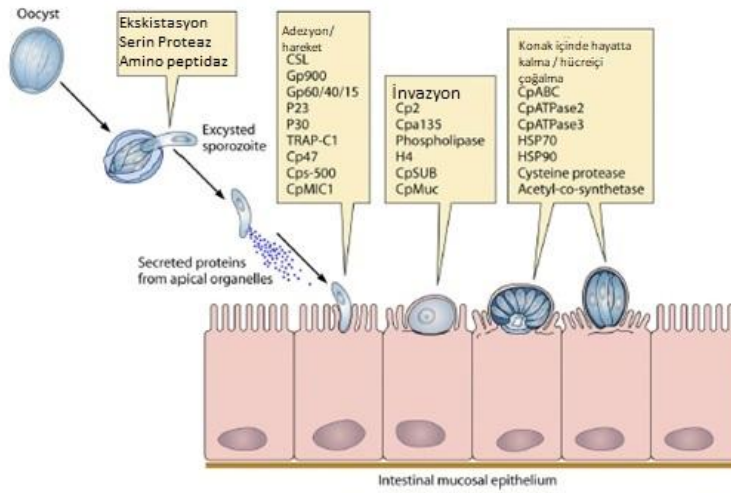
2.1.4.3. Isı şoku proteinleri

Isı şoku proteinleri (HSPs) çeşitli stress uyarılarına cevap olarak bütün canlıların hücreleri tarafından üretilen bir grup proteindir. Hücreler bu proteinleri ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerinde değişiklik gibi çevresel faktörlere maruz kaldıkları zaman üretirler ve bu proteinler oldukça iyi korunan proteinlerdir. Genellikle sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlenen belirgin moleküler ağırlıkları olan HSP90, HSP70 ve HSP65 tanımlanan yapıların ortak ailesidir (Miller ve ark, 2000). HSP'lerin, özellikle HSP70'in sentez seviyesi

stres koşulları altında ani bir şekilde artar (sıcaklıkta ani değişim, besin maddelerinin azalması ve konakta immun yanıt oluşumu). HSP'ler diğer proteinler için hücre içi şaperonlar olarak işlev görürler. Isı şoku proteinleri, protein-protein etkileşiminde önemli bir rol oynamaktadır; yeni oluşmuş proteinlerin taşınması, katlanması, birleştirilmesi, biyosentezi ve sekresyonunu kolaylaştırır (Okhuysen ve Chappell, 2002). *Cryptosporidium*' da HSP70 ve HSP90 olmak üzere iki adet ısı şoku proteini tanımlanmıştır. HSP70 geninde önemli polimorfizmler tanımlanmış ve genotiplendirme amaçları için kullanılmıştır. Buna rağmen stres altında oluşan HSP' ler izolatlar veya alt tipler arasındaki genetik ilişkiyi yansıtmamaktadır (Morgan ve ark, 2000). Apicomplexan bir parazit olan *T. gondii*' de bulunan ısı şoku proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki nicel ve nitel farklılıkların direkt olarak parazit virulansı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Miller ve ark, 2000).

2.1.4.4. Contingency genleri

Contingency genleri patojen mikroorganizmalarda yaygın bulunan genlerdir. Bu genlerde oluşan mutasyonlar sayesinde fenotipte çabuk ve klonal değişikliklerin oluşması sonucu konaklarda patojenin hayatta kalmasına ve çoğalmasına destek olurlar (Barry ve ark, 2003). *Contingency* genleri oldukça değişkendir. Virus, bakteri, fungus ve protozoanlar gibi patojenik mikroorganizmalarda bulunmaktadır. *Contingency* genleri, genomdaki diğer genler için geçerli olan rekombinasyon oranından daha yüksek spontan rekombinasyon oranlarına tabidir. Bu mutasyonel olaylar, konakta; parazitinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına daha elverişli bir ortam hazırlamaktadır. *C. parvum* ve *C. hominis* genomik analizlerine bakıldığında, söz konusu bu genlerin kromozom sonlarına yakın oldukça farklı bölgelerde yer aldıkları görülmektedir (Bouzid ve ark, 2010; Widmer ve Sullivan, 2012). Genomik analizlerin karşılaştırılması sonucunda *C. parvum*' a spesifik olarak bulunan acil durum genine; Cops-1 adı verilirken; *C. hominis*'te bu gen Chos- 1 adı verilmiştir. Her iki yapıda 50kDa' luk glikoprotein yapısında olup, benzer özellikleri paylaşmaktadırlar (Bouzid ve ark, 2010). Şekil 1.'de *Cryptosporidium spp*'ye ait virulans faktörleri yer almaktadır



Şekil 1. *Cryptosporidium spp.* 'ye ait virulans faktörler (Bouزيد ve ark, 2013)

2.1.5.Yaşam Döngüsü

Seksüel ve aseksüel siklulardan oluşan *Cryptosporidium* türlerinin yaşam çemberleri komplekstir. Kimyasal ve mekanik etkilere karşı son derece dayanıklı olan sert trilaminar çepere sahip olan enfektif ookistler olumsuz çevre koşulları altında sporozoitlerin canlılıklarını korumasına yardımcı olmaktadır (Fayer ve Ungar,1986). Oldukça sert olan çeper yapısı atomik kuvvet mikroskobu altında plastik malzemeye benzemektedir. Monoksen bir parazit olan *Cryptosporidium spp.* ara konaksız bir yaşam döngüsüne sahiptir ve konağın bağırsaklarında süren döngüler sonucu enfeksiyon oluşur. *Cyptosporidium spp.* ookistlerinin alımı, enfekte hayvan ve kişilerden veya bunların dışkısı ile enfekte olmuş gıda ya da su ile olmaktadır. *Cryptosporidium*' un yaşam döngüsü memelilerde enfeksiyona neden olan *Eimeria* ve *Isospora* gibi diğer koksidiyan parazitlerin yaşam döngülerine benzerlik göstermektedir. Buna göre başlıca altı gelişim evresi bulunmaktadır (Ülgen ve Balcıoğlu, 2007).

2.1.5.1. Ekskistasyon (Kistin açılması) dönemi

Parazitin hayat döngüsü dışkıyla atılan ookistlerin ağız yolu ile alınmasıyla başlar. Ağız yoluyla alınan ookistlerin içerisinde dört adet sporozoit bulunmaktadır. Diğer koksidiyan parazitler gibi sporokist içermezler. Enfekte olan canlının on iki parmak bağırsağında ki sindirim enzimleri ve safra tuzları yardımıyla ookistler parçalanmaktadır, bunun yanı sıra spesifik etmenler olmadan da parçalanma (ekskistasyon) gerçekleşmektedir.

Spesifik etmenler olmadan meydana gelen eksistasyon, konjunktival enfeksiyonu, solunum sistemi enfeksiyonunu ve oto enfeksiyona neden olmaktadır. Konakta şekillenen eksistasyona benzer kist açılımı bazı şartlar altında özellikle osmotik stres sonucunda dış ortamda da gerçekleşebilmektedir. Bunun yanı sıra safra tuzlarında kistlerin açılımını uyardığı, total safra salgısının da özellikle ookistin zayıf hipoklorit solusyonu gibi oksidatif ajanlara maruz kalmasından sonra eksistasyonu sağladığı yapılan deneysel çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan bir diğer araştırmada, 4-23 °C'lik bir ortamda bir gece tutulan ookistlerin 37°C deki fosfatbuffer tuz solusyonunda saatlerce bekletildikten sonra açıldığı gözlenmiştir. Ookistlerin açılabilmesi ve açılan ookistlerden çıkan sporozoitlerin etkinliği için en uygun pH'nın 6,8-7,4 olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Starling ve Arrowood, 1993).

Ookistin açılması ookist duvarı üzerinden başlar ve açılan aralıktan aktif hareketli 4 adet muz şeklinde olan sporozoit serbest hale geçer. Sporozoitlerin baş kısımları, bazı kaynaklarda feeder organel olarak anılan bağlayıcı bir protein içermektedir. Serbest hale geçen sporozoitler barsağın apikal yüzeyindeki hücrelere derin olmayacak şekilde tutunurlar (Sears ve Kirkpatrick, 2001).

2.1.5.2. Merogoni dönemi

Sporozoit konak hücre yüzeyine tutunduktan sonra apikal kompleksi aracılığıyla membran eritici faktör salgılamaya başlar. Böylece konak mikrovillusların ve membranı ile kendisini sararak koruma alanı oluşturan vakuölü oluşturur. Parazite intraselüler ekstrasitoplazmik bir konum kazandıran bu yapı "parazitik vakuöl" olarak adlandırılır (Starling ve Arrowood, 1993; Sears ve Kirkpatrick, 2001). Vakuöl içerisinde trofozoit halini alan protozoon eşeysiz olarak (merogoni=şizogoni) çoğalarak tip I merontları oluşturur. Şizogoni sırasında trofozoitin çekirdeği ard arda bölünerek 6-8 çekirdekli şizontu oluşturur. Takip eden dönemde her bir çekirdek, şizont duvarında farklı kısımlardan dışa doğru evagine olarak merozoitleri şekillendirir (Dubey ve ark, 1990). Şekillenen merozoitler konak hücreyi parçalayarak barsak lümenine dökülürler ve civardaki tahrip olmamış sağlam hücrelere tutunurlar (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Merozoitler barsak lümeninde yeni bir şizogoni aşamasına girerler ve tip I ya da tip II şizontları oluştururlar. Her iki şizontun da oluşumu aynı tarzda gerçekleşmesine rağmen, tip I şizonttan 6-8 merozoit şekillenir tip II şizonttan ise sadece 4 merozoit oluşur. Bu aşamadan sonra, Tip I şizontlardan köken alan merozoitler konakta yeni hücreleri enfekte ederek tekrar bir merogoni başlatırlar. Cryptosporidiosis,

özellikle de immünsüpresif hastalarda, Tip I şizont oluşumunun sürekli tekrarı söz konusu olabilmektedir ki sürekliliğin temelinde yatan ana etkenin de bu olduğu bildirilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993).

2.1.5.3. Gametogoni dönemi

Tip II şizontlardan oluşan merozoitler yeni bir döngü oluşturmadan konak içinde yeni hücrelere girerler ve eşeyli üreme fazı olan gametogoniye başlatırlar. Gametogoni ile birlikte merozoitlerden mikro ve makrogamontlar meydana gelmektedir. Gametogoni ile oluşan yapıların büyük bir çoğunluğu makrogamont olmaktadır (Starling ve Arrowood, 1993).

2.1.5.4. Döllenme dönemi

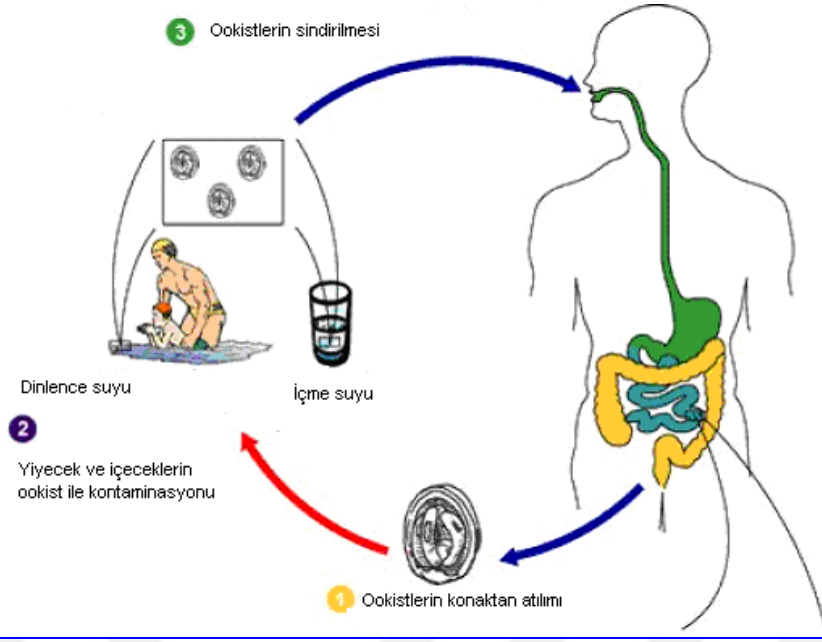
Küçük kamçısız fakat hareketli olan mikrogametler, mikrogamontlardan oluşmaktadır. Mermi benzeri bu yapılardan bir tanesi makrogameti döller ve sonuçta zigot meydana gelir (Özcel ve ark, 2007).

2.1.5.5. Ookist dönemi

Parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayan , dış çevre koşullarına dayanıklı olan ookist zigot duvarının kalınlaşması ile oluşmaktadır (Özcel ve ark, 2007).

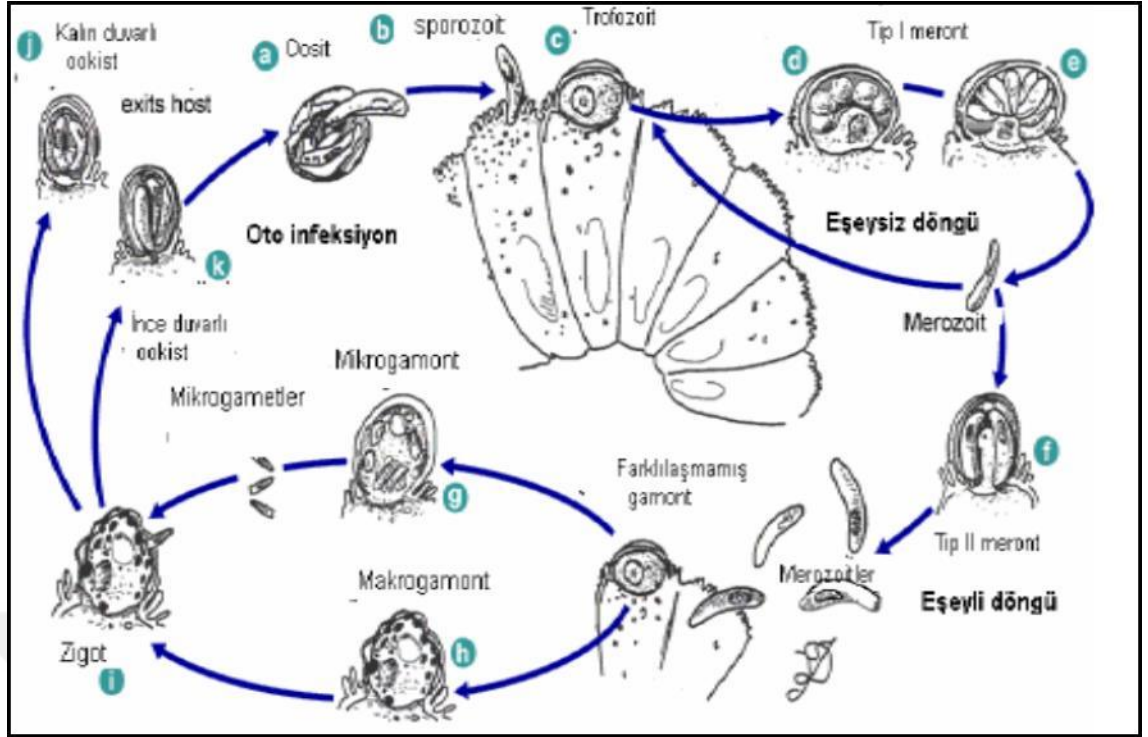
2.1.5.6. Sporogoni dönemi

Diğer koksidiyanlardan farklı olarak sporlanma konak içerisinde gerçekleşir. Sporlanma yolu ile ookist içinde enfektif sporozoitler oluşur (Current ve Garcia, 1991). Şekil 2'de *Cryptosporidium*'un bulaş yolu, Şekil 3'te ise *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü yer almaktadır.



Şekil 2. *Crptosporidium*'un bulaş yolu (Goldoft ve Todd, 2008)

Konak hücre içerisinde sporogoni geçiren ookistler, konak barsak lümenine döküldüğünde enfektif haldedir. *Cyclospora*, *Toxoplasma* ve *Isospora* gibi diğer koksidiyan parazit türlerinin ookistleri dış ortamda oksijenle temas edene kadar sporlanmamaktadırlar (Current ve Garcia 1991). *Cryptosporidium* ookistlerinin % 80'i dış koşullara dayanıklı kalın bir duvar ile çevrilidir. Kalın duvarlı ookistler dışkıyla atılarak diğer konaklarda enfeksiyon oluşturmaktadır. Geriye kalan% 20'lik kısmının ookistleri ince çeperli olup, konak hücrede içlerindeki sporozoitlerin serbestleşmesiyle diğer enterositlere girerler ve yeni bir yaşam döngüsü başlatarak otoenfeksiyona sebep olurlar. Otoenfektif ookistler, az sayıda ookistle enfekte olan kişilerde bile şiddetli enfeksiyon tablosu geliştirirler. Bağışıklığı baskılanmış kişilerde, etken dışarıdan yeniden alınmasa da uzun süren ve hastanın yaşamını tehlikeye düşürebilen tabloların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Fayer ve ark 1997).



Şekil 3. *Cryptosporidium*' un yaşam döngüsü (Current ve Garcia, 1991)

İlk kez Hijjawi ve arkadaşlarının 2002 yılındaki çalışmalarında *Cryptosporidium*' un yaşam döngüsündeki gamont varlığı gibi hücre dışı aşamaları gözlenmiştir (Hijjawi ve ark, 2002). Ekstraselüler gamont benzeri yapılar *C. parvum* ile enfekte farelerden izole edilmiştir (Hijjawi ve ark,2004).Ekstraselüler yapının kökeni bilinmemektedir ancak bu yapıların konak hücreye penetre olamamış hareketli trofozoit formlardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Hijjawi ve ark,2004).

2.1.6. Epidemiyolojisi

Cryptosporidiosis epidemiyolojisini belirleyen temel faktörler arasında, az sayıda ookistin konağı enfekte edebilir özellikle olması, ookistlerin dış ortamda uzun süre hayatta kalabilmesi, ookistlerin birçok dezenfektana karşı dirençli olması ve konak vücudundan atıldığında enfektif özellikte olması ile bazı genotipler için hayvanların rezervuar konumunda olması yer almaktadır. *Cryptosporidium spp.*'nin ookistleri hem tatlı hem tuzlu sularda aylarca enfektif kalabilmektedir. İçme sularının rutin bir şekilde klorlanmasının veya ozonlanmasının *Cryptosporidium spp.*'nin ookistleri üzerine etkisi ya çok azdır ya da hiç

yoktur. Tüm bu nedenlerden *Cryptosporidium* biyoterörizm listesinde yer alan tek parazitik türdür (Casemore, 1991).

2.1.6.1. İnsanlardaki epidemiyolojisi

1976 yılında, 3 yaşındaki gastroenteritli bir kızda ilk insan olgusu saptanmış (Nime ve ark,1976) ve daha sonra ise immun sistemi baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide kriptosporidiosis görülmüş olup, bu olgu bir çiftlikte yaşayan hayvanlarda saptanan enfeksiyonla aynı zamanda ortaya çıkmıştır. Bu nedenle cryptosporidiosisin zoonoz bir hastalık olabileceği düşünülmüştür.

1981-1982 yıllarında ise AIDS'li hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları saptanmış ve bu hastalarda şiddetli ishale neden olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerde görülen uzun süreli, sıklıkla bol sulu dışkı ve zayıflama gibi belirtiler enfeksiyonun fırsatçı patojen olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki yıllarda yayımlanan araştırmalarda laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle hayvan bakıcılarında, turistlerde ve bağışıklığı sağlam kişilerde de salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (Özcel ve ark, 2007). 1985-1995 yılları arasında enfeksiyonun klinik ve epidemiyolojisine ilişkin bilgilerin çoğu elde edilmiştir (Fayer ve Ungar 1986, Current ve Garcia 1991). *Cryptosporidium* parazetine bağlı oluşan enfeksiyonlar 1982 yılında ABD'de Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından AIDS'li hastalarda ishal nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir.

Günümüzde ise 6 kıtadan 90 ülkede önemli bir problem boyutunu kazandığı ifade edilmiştir (Fayer ve ark, 2000). *C. muris* ve *C. parvum*'un hem insan hem de sığır genotipinin, *C. meleagridis*, *C. felis* ve *C. parvum*'un köpek genotipinin insanlarda etkili olduğu (Dillingham ve ark, 2002) ancak etkenin maymun, domuz, keseli, gelincik genotiplerinin etkili olmadığı (Abe ve ark, 2002) ortaya konmuştur. *C. hominis*'in (eski adıyla *C. parvum* genotip I) insan dışı canlıları pek etkilemediği, ancak sadece bir domuz yavrusundan, bir primattan ve bir deniz ineğinden (*Dugong dugon*) izole edilmiş olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda enfeksiyon oluşturabilmek için ortalama 132 (9 – 1042) *C. parvum* (eski adıyla *C. parvum* genotip II) ookistinin yeterli olduğu bilinmektedir. Milwaukee salgınında enfektif dozun 1 -10 arasında olabileceği de görülmüştür (Dillingham ve ark, 2002).

Zoonotik tür olarak da öne çıkan *C.parvum* dünyada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır ve gelişmiş ülkelerde uygulanan mücadele programlarına rağmen hastalık önemini sürdürmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). ABD'de yılda 15 milyon insanın ishal şikayeti ile kliniklere başvurmakta ve bunun yaklaşık 300.000 kadarına cryptosporidiosis

teşhisi konmaktadır. Bu oran gıda kaynaklı ishal olgularından 45 kat daha fazladır (Fayer ve ark, 2000). Yapılan epidemiyolojik taramalar sonucunda, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasında belirgin bir fark olduğu saptanmış (Sears ve Kirkpatrick, 2001) ve bu farkın üçüncü dünya ülkelerinde su dezenfeksiyonun tam anlamıyla yapılamamasından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Fayer ve ark, 2000). Avrupa ve Kuzey Amerika’da insanlarda yapılan dışkı taramalarında %1-3, gelişmekte olan ülkelere ise %7-8,5 düzeyinde prevalans elde edilmiştir (Fahey, 2003).

Epidemiyolojik açıdan asıl risk grubunu çocuklar, hastalarla ilişkili olan aile fertleri, hasta bakıcılar, hayvan bakıcıları (Dubey ve ark, 1990), beslenme problemi olan bireyler, doku transplantasyonu yapılan hastalar, kemoterapi alan hastalar, zihinsel engelli kliniğinde kalan hastalar, turistler ve özellikle AIDS hastalarının olduğu immünsüpresif bireyler oluşturmaktadır (Fayer ve ark, 2000). Hastalıkta belli bir cinsiyet veya ırk yatkınlığı ortaya konamamasına rağmen insidensin, kadınlara ve damar içi uyuşturucu kullananlara kıyasla homoseksüellerde daha fazla olduğu bildirilmiştir (Fahey, 2003). Özellikle 1-5 yaş arası çocuklarda hastalık önemli olmaktadır (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Hastalığın özellikle HIV-pozitif bireylerde önem taşıması epidemiyolojik verilerin de yine bu insanlar üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. AIDS’li bireylerde yapılan taramalarda insidens Amerika’da %15-16, gelişmekte olan ülkelere ise %30-50 düzeyinde bulunmuştur (Fahey, 2003). Tablo 4’te Dünyada *C. parvum*’ un HIV pozitif insanlardaki prevalansı verilmektedir.

Tablo 4. Dünyada *Cryptosporidium parvum*’ un HIV pozitif insanlardaki prevalansı (Wang ve ark, 2018)

	Prevalans Dağılımı (%)	Ortalama Prevalans (%)
Avrupa	7,7-78,1	26,7
Asya	2,1- 45	15,7
Afrika	6,9-73,6	21,0
Amerika	3,9- 31,3	12,9
Avustralya	1,1-3,4	2,3

Hastalık gelişmekte olan ülkelere oranla daha fazla görülmektedir (Casemore 1991). İshalli ve mide-barsak şikayetleri olan, hastanede yatan ve dışkısı laboratuvara gönderilen yetişkin ve çocukların dışkı örneklerinden yapılan araştırmalara göre cryptosporidiosis oranının Avrupa’da %1-2, Kuzey Amerika’da 0,6-4,3, Asya, Avustralya,

Afrika, Orta ve Güney Amerika'da ise % 3-4'den başlayıp %10-20'ye kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Fayer ve Ungar 1986)

Çocuklarda immun sistemin çok gelişmiş olmaması, fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması ve temizlik kurallarına yeterli özenin gösterilmemesine paralel olarak cryptosporidiosis prevalansında yetişkinlere göre daha yüksek olduğu ve semptomların çok daha şiddetli seyrettiği belirtilmektedir (Fayer ve Ungar 1986, Ungar 1995). İngiltere'de incelenen semptomatik 867 hastada %5 oranında, beş yaşın altındaki çocuklarda ise %7 oranında cryptosporidiosis tanısı konduğu bildirilmiştir (Al-Braiken ve ark 2003). Yapılan bir çalışmada okul öncesi kreşlerdeki beş yaş altı semptomatik ve asemptomatik çocuklarda cryptosporidiosis prevalansı sırasıyla %3,2 ve % 4,7 olarak belirtilirken (Miller ve ark. 2003), gündüz bakım merkezlerindeki çocuklarda cryptosporidiosis prevalansını %8,9 olarak bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, cryptosporidiosis oranı 0-3 yaş grubundaki çocuklarda %2,97, 4-10 yaş grubundaki çocuklarda %1.17 ve 11-15 yaş grubundaki çocuklarda %2.6 olarak bulunmuştur. Kotloff ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları epidemiyolojik çalışma; dört Afrika ve üç Asya çalışma bölgesinden 22000 üzeri çocuğun (5 yaş altı) *Cryptosporidium* ile enfekte olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada diyare etkenleri arasında ikinci yaygın parazit olduğu ve 12-13 aylık bebeklerde ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Kotloff ve ark,2013). Rotavirüsten sonra ikinci diyare etkeni olan *Cryptosporidium*, diyare yüzünden ölen 5 yaş altı çocukların %30-50'sinde etken olduğu bildirilmiştir (Snelling ve ark, 2007). Enfeksiyonun bu yaş gruplarında gelişimsel problemlere neden olduğu da bildirilmiştir (Guerrant ve ark, 1999). Asya, Afrika, ve Latin Amerika'da yıllık 250-500 milyon insan *C. parvum*'la enfekteli hale gelmektedir (Adal ve ark, 1995). Diyareli bağışıklık sistemi normal kişilerde yapılan, gelişmiş ülkelerdeki 43, gelişmekte olan ülkelerdeki 35 çalışma sonucunda, cryptosporidiosis sıklığı Tablo 5'te gösterilmektedir (Adal ve ark, 1995).

Tablo 5. Cryptosporidiosis sıklığı (Adal ve ark, 1995)

Alan	Kriptosporidiyoz / % total diyareli hasta
Gelişmiş Ülkelerde	1.486/24.269 (%6.1)
Gelişmekte Olan Ülkelerde	2.232/107.329 (%2.1)

Türkiye’de cryptosporidiosis ile ilgili yapılan çalışmalarda, insanlarda hastalığın prevalansının % 0-35,5 olduğu bildirilmiştir (Al-Qubaji 2005). Çoğu tanı temelli olan bu çalışmalarda hayvanlar ve gıdalar üzerine yapılan araştırmalar çoğunlukla insan ağırlıklıdır. 1980–1996 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında yapılan bir çalışmada toplam 122.400 dışkı örneğinde, incelenen dışkıların 45’inde (% 0,04) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (Şener ve ark. 1997). Ankara Onkoloji Hastanesinin değişik kliniklerinde yatan 106 gastroenteritli kanser hastası Mart–Temmuz 1992 tarihleri arasında çalışma grubu olarak incelenmiş, hastaların 18’inde (%16,9) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (Gün ve ark. 1994). Ocak 1995–Mayıs 1997 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi pediatri polikliniğinden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ishalleri 540 çocuğa ait dışkı örneği ile 0–6 yaş grubu yetiştirme yurdunda yaşayan ishalleri 67 çocuktan alınan dışkı örnekleri incelenmiş olup, 607 örneğin 22’sinde (%3,6) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (Doğan ve Akgün 1998).

Değirmenci ve arkadaşlarının 2005 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde yaptıkları çalışmada; 1 Ocak - 31 Aralık 2005 tarihleri arasında Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran 3925 hastada bağırsak parazitleri incelenmiş 30 örnekte (%0,76) *Cryptosporidium* spp. açısından pozitiflik bulunmuştur (Değirmenci ve ark, 2007).

Otağ ve arkadaşlarının Mersin İli merkezi ve semtlerinde dört ilköğretim okulunda öğrenim gören 8-12 yaş grubu öğrencilerinden (n=72) alınan dışkı örneklerinin Modifiye Kinyoun’s aside dirençli boyama (soğuk) yöntem ve Auramin-O ile boyama yöntemi ile boyanarak *Cryptosporidium* ookisleri araştırılmış dört öğrencide %5,5 oranda *Cryptosporidium* ookisti saptanmıştır (Otağ ve ark,2007).

Doğan ve arkadaşlarının 2003-2007 yılları arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi’nde yaptıkları çalışmaya göre incelenen 34733 dışkı örneğinin 1252’sinde bir veya daha fazla parazit varlığı tespit edilmiştir (apatojen olarak kabul edilen protozoonlar dahil). Parazit saptanan olguların %52,5’i kadın, %47,5’i erkek olarak saptanmıştır. Parazit olguları içinde en çok görülen *Entamoeba histolytica/dispar* grubu amipler olup; %31(397/1252), bunu *Giardia intestinalis* %19 (236/1252) ve *Blastocystis hominis* %7 (108/1252) ve *C. parvum* %4,5 (56/1252) izlemiştir (Doğan ve ark. 2008) .

Tamer ve Gülenç’ in 2008 yılında Kocaeli Tıp Fakültesi’nde yaptıkları çalışmada raslantısal olarak ishal, karın ağrısı, bulantı-kusma gibi gastrointestinal yakınma ile başvuran 80 olgunun ve kontrol grubu olarak sağlıklı 65 kişinin dışkı örnekleri kryptosporidiosis yönünden Kinyoun asit fast boyama yöntemi ve dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerini aramaya yönelik hazırlanmış ELISA kiti (r- biopharm, Germany) ile incelenmiştir. İncelenen

dışkı örneklerinin sonuçlarına bakıldığında kinyoun asit fast boyama yöntemi ile üç örnekte (%3,75) *Cryptosporidium* spp. ookistleri, monoklonal ELISA ile yapılan değerlendirmelerde ise beş örnekte (%6,25) *Cryptosporidium* spp. spesifik antijenlerin saptandığı görülmüştür (Tamer ve Gülenç, 2008).Tamer ve arkadaşlarının Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları çalışmada; Hemotoloji-onkoloji servisinde yatan lösemi ve lenfoma tanısı almış ve ishali olan toplam 89 çocukta cryptosporidiosis prevalansı dışkıda ELISA (*Cryptosporidium* Rida Screen, R-Biopharm, Germany) ve kinyoun asit fast boyama ile araştırılmıştır. ELISA ile çalışmaya alınan 89 hastanın 11'i (%12,35), kinyoun asit fast boyama ile 7'si (%7,86) cryptosporidiosis tanısı almıştır (Tamer ve Gülenç 2008).

Çiçek ve Yılmaz'ın Van İli'nde yaptıkları çalışmada 450 çocuğun dışkı örnekleri parazitolojik yönden incelenmiş, 154 (% 34,2)'ünde parazit saptamıştır. Parazitlik açısından pozitiflik veren dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. oranı % 2,2 olarak bulunmuştur (Çiçek ve Yılmaz,2011).

Bayramoğlu ve arkadaşlarının Adana İli gıda çalışanlarında yaptıkları çalışmada; 500 gıda çalışanının dışkı örneklerinden nativ-lugol ve Kinyoun asit fast boyama yöntemleri ile mikroskopik inceleme, Direkt Flouresan Antikor testi (DFA) ve immunokromatografik test ile *Giardia* ve *Cryptosporidium* antijen araması yapılmış, *Cryptosporidium* spp. tespit edilememiştir (Bayramoğlu ve ark, 2012).

Eren ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; onkoloji (n=156), diyaliz (n=98) ve malnütrüsyonlu çocuklardan (n=21) oluşan toplam 275 immün sistemi baskılanmış hasta ve immün sistemi normal ancak gastroenterit şikayeti ile laboratuvara gönderilen gastroenteroloji hastaları (n=22) ve pediatri hastaları (n=178) olmak üzere 200 hastadan alınan dışkı örnekleri çalışılmıştır. Ayrıca farklı kliniklerden gönderilen, ishal şikayeti olmayan immün sistemi normal 55 bireyin dışkı örneği kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Makroskopik olarak da incelenen her dışkı örneğine lam-lamel arası preparasyon, modifiye aside dirençli boyama yapılarak *Cryptosporidium* ve diğer bağırsak parazitleri açısından incelenmiştir. Ayrıca dışkı örneklerinde "Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti" (OXOID) ile *Cryptosporidium* türlerine ait antijenler aranmıştır. Çalışmada, toplam 530 dışkı örneğinin 17 (%3,2)'sinde modifiye aside dirençli boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* türleri ookisti saptanırken, ELISA yöntemi ile 31 [31/530 (%5,8)] hastanın dışkısında *Cryptosporidium* türlerine ait antijen tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile, 40 yaş üstü immün sistemi baskılanmış hastalar, aside dirençli boyama yönteminde olduğu gibi *Cryptosporidium*'un en fazla pozitif olduğu hastalardan olduğu tespit edilmiştir. Modifiye aside dirençli boyama yönteminin duyarlılığı %54, özgüllüğü %100; ELISA yönteminin duyarlılığı %100,

özgüllüğü de %100 olarak bulunmuştur. Nativ-lugol preparasyon yöntemiyle örneklerin 61 (%11,5)'inde çeşitli protozoon kistleri ve 3 (%0,5)'ünde de *Hymenolepis nana* yumurtaları görülmüştür (Eren ve ark, 2012).

Özçelik ve arkadaşlarının Eylül 2009- Eylül 2010 tarihleri arasında Sivas'a bağlı farklı köylerde yaşayan 50 çiftçiden, şehir merkezinde yaşayan, ishal v.b. yakınmaları olmayan 65 kişiden ve bu yörelerde yetiştirilen 200 sığır ve buzağıdan alınan dışkı örnekleri incelenmiştir, Deneylede *Cryptosporidium* Stool Antigen Microwell ELISA Kiti kullanılmış olup, çalışma sonucunda kontrol grubunda 4 (%6,2) kişide, hayvancılıkla uğraşan 9 (%18,0) kişide ve sığır ve buzağuların ise 15 (%7.5)'inde *Cryptosporidium spp.* antijen pozitifliği saptanmıştır (Özçelik ve ark, 2012).

Karaman ve arkadaşlarının Malatya'da *Cryptosporidium spp.* epidemiyolojisini belirlemek için yaptıkları çalışma da toplamda 2281 dışkı örneği kinyoun asit fast yöntemiyle incelenmiş ve 161 (%7,1) örnek pozitif olarak değerlendirilmiştir (Karaman ve ark, 2015).

Tablo 6'da Ülkemizde ve bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium spp.* görülme sıklığı verilmektedir

Tablo 6. Ülkemizde ve bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklığı

Yapıldığı Yer	Grup	% (Pozitif örnek/ Tüm örnekler)	Çalışmacı/Yıl
İzmir/Türkiye	Retrospektif değerlendirme	%0,76(30/3925)	Değirmenci ve ark./2007
Mersin/Türkiye	İlköğretim öğrencileri	%5,5 (4/72)	Otağ ve ark./2007
Eskişehir/Türkiye	Retrospektif değerlendirme	%4,5(56/1252)	Doğan ve ark./2008
Adana/Türkiye	Gıda Çalışanları	%0 (0/500)	Bayramoğlu ve ark./2012
Malatya/Türkiye	Retrospektif değerlendirme	%7,1(161/2281)	Karaman ve ark./2015
Van/Türkiye	Pediyatrik onkoloji hastaları	%2 (3/150)	Birdal Akış ve Beyhan/2018
Van/Türkiye	Retrospektif değerlendirme	%0,7(92/13.847)	Cengiz ve ark./2019
Sivas/Türkiye	Retrospektif değerlendirme	%0,3(53/19.760)	Ataş/2020
Fransa	Retrospektif değerlendirme	%0,96(407/42.004)	ANOFEL Cryptosporidium National Network/2010 (WEB1)
İran	Retrospektif değerlendirme	%4,4(363/8387)	Berahmat ve ark/2017
Tanzanya	İmmüsuprese hastalar	%50 (63/127)	Houpt ve ark./2005
Mısır	İmmüsuprese hastalar	%7 (7/100)	Baiomy ve ark./2010
Polonya	Retrospektif değerlendirme	%1,4(4/283)	Bednarska ve ark./2018
Kanada	Retrospektif değerlendirme	%15,7 (17/108)	Iqbal ve ark.2015
Almanya	Retrospektif değerlendirme	%1,29(1084/84.031)	Caccio ve Chalmers./2016
İngiltere		%8,25(4128/50.036)	
Hollanda		%1,93(314/16.269)	

Cryptosporidiosis olgularının mevsimsel dağılımı incelendiğinde, Kuzey Amerika'da ilk bahar ve yazın son aylarında, Avustralya'da yaz ayında, Almanya'da yazın son aylarında kriptosporidiyoz olgularının sayısında artış gözlenmiştir (Meinhardt ve ark, 1996). Kosta

Rika ve Hindistan'da cryptosporidiosis olgularının sayısındaki artış, sıcaklığın yükseldiği, yağmurlu ve rutubetli günlerde artmıştır (Janoff ve Reller, 1987). Türkiye' de ise özellikle ilk bahar ve yaz aylarında cryptosporidiosis olgularının sayısında artış görülmektedir (Tablo 7 Doğan ve Akgün, 1998).

Tablo 7. Türkiye' de cryptosporidiosis olgularının mevsimsel dağılımı (Doğan ve Akgün, 1998).

Aylar	İncelenen Olgu Sayısı	Pozitif Olgu Sayısı	Pozitiflik %
Ocak-Şubat	68	0	0
Mart-Nisan	97	2	2,1
Mayıs-Haziran	107	3	2,8
Temmuz-Ağustos	162	5	3,1
Eylül -Ekim	101	11	10,9
Kasım-Aralık	72	1	1,4
Toplam	607	22	3,6

2.1.6.2. Buzağılardaki epidemiyolojisi

Sığırlarda ishal olguları ile *Cryptosporidium* türlerinin ilişkisi 1970'lerin başlarında gözlenmiştir. Paancier ve arkadaşları tarafından 1971 yılında yapılan çalışmada, kronik zayıflama, dehidrasyon ve ishal görülen bir buzağıda *Cryptosporidium* etkenleri ilk olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar nekropsisi yapılan bu buzağının ince bağırsaklarının histopatolojik muayenesinde villuslarda genel atrofi ve *Cryptosporidium* türlerinin gelişme dönemlerini gördüklerini bildirmişlerdir. 1974 yılında Meuten ve arkadaşları tarafından iki haftalık bir buzağının otopsisinde başlıca ileum ve kolonda lezyonlara rastlandığı ve histopatolojik incelemede *Cryptosporidium* türlerinin çeşitli gelişme dönemlerine rastlandığı bildirilmiştir (Tzipori ve Ward 2002). Türkiye'de ise ilk kez buzağılarda (Burgu, 1984), kuzularda (Özer ve ark, 1990), oğlaklarda (Özkul ve ark, 1992), piliçlerde (Özkul ve ark,1991) ve güvercinlerde cryptosporidiosisin varlığı bildirilmiştir.

Sığırlarda,yüksek bir insidense ve öneme sahip olan intestinal cryptosporidiosis etkeni *C. parvum* (4,8x5,0 µm), diğeri ise ilk Amerika'da sığırlarda ve Almanya'da dağ gazellerinde ortaya konmuş olan, abomazumda yerleşim gösteren *C. andersoni* olmak üzere iki

Cryptosporidium türü etkili olmaktadır (Dubey ve ark, 1990). Yine buzağılarda *C. parvum*'un insan genotipinin bulunabildiğine dair bildirimler de söz konusudur (Tzipori ve Ward, 2002).

Sığır cryptosporidiosisinin hastalık karakteri üzerine yapılan çalışmalar, klinik tablonun daha çok genç hayvanlarda gözlemlendiğini, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ergin sığırlarda da yüksek oranda antikör titresinin olabileceğini göstermiştir (Vergara-Castiblanco ve ark,2001).

Diğer pek çok hayvan türünde fırsatçı bir özellik taşıyan etken, buzağı, kuzu ve oğlaklarda tek başına ölümcül hastalık tablosu oluşturabilmektedir (Dubey ve ark, 1990). Buzağılarda hastalık oluşturan en temel kaynak aynı çiftlikte yer alan diğer enfekte buzağılardır. Buna ek olarak bakıcılar, kullanılan her türlü araç ve malzeme ookist taşınımında rol alabilmektedir. Fare ve rat gibi memeliler, buzağılarda etkili olan *Cryptosporidium* türlerini dışkılarıyla çıkarıp saçabilmekte, artropodlar, kediler, köpekler ise etkenin mekanik taşınımında rol alabilmektedirler. Ergin sığırlarda subklinik, uzun süreli hastalık tablosu oluşmakta ve bu hayvanların çıkardığı ookistler buzağılarda hastalığın oluşumuna neden olabilmektedir. *Cryptosporidium* ookistlerinin dışkı ile atıldığı andan itibaren enfektif olması, değişik çevre koşullarına ve dezenfektanlara dirençli, oldukça küçük yapıda olmaları bulaşmayı garanti altına almaktadır. Bulaşmada esas fekal-oral yol olup buzağılarda enfeksiyon için gerekli minimal doz 10-100 ookist arasında değişir. Enfekte bir buzağı günlük 10^7 ookist çıkarabilirken, hastalık boyunca bu sayı ortalama 4×10^7 'ye ulaşabilmektedir (Nydam, 2003).

Buzağılarda hastalığın çoğunlukla rotavirus, coronavirus, ETEC-K99 veya *Salmonella* gibi etkenlerle birlikte izlendiği görülmüştür. ETECK99 enfeksiyonu, genelde bir haftalıktan daha küçük buzağılarda, özellikle de 1-2 günlük yavrularda önem taşımakta iken cryptosporidiosis, çoğunlukla bu dönemlerde yavruyu henüz etkilememektedir. Rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarının cryptosporidiosis ile ortak enfeksiyon oluşturma olasılığı daha yüksektir. *C. parvum* ve *Salmonella* ortak hastalık tablosuna en azından 35 günlük döneme kadar ki buzağılarda rastlanılmaktadır. Yine, özellikle kalın bağırsağa tutunan non-enterotoksijenik *E. coli*, *Schigella* benzeri toksin üreterek dizanteriyi andıran bir tablo ortaya koymakta ve aynı bölgeye yerleşebilen *C. parvum* ile karşılıklı sinerjik bir ilişkide bulunabilmektedir. *Campylobacter* türleri buzağılar için pek önemli kabul edilmezler ancak, ilgili etkene ağır cryptosporidiosis olgusuna sahip buzağılarda daha çok rastlandığı ortaya konmuştur. Benzer durum insanlarda da görülebilmektedir. Protozoon hastalıklardan giardiosis, genelde daha ileri yaştaki buzağuların bir problemi olarak karşımıza çıkar ve cryptosporidiosis ile birlikteliğine pek rastlanamaz. Bunun yanında *Eimeria* ve

Cryptosporidium türlerinin birlikte izlendiği hastalık tabloları bildirilmiş ancak olayın klinik önemi ortaya konamamıştır (Dubey ve ark, 1990; Starling ve Arrowood, 1993).

Tüm dünyada yaygın olarak bulunan sığır cryptosporidiosisinin insidensi bölgeden bölgeye az çok farklılık gösterebilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Kolombiya’da ergin sığırlarda yapılan serolojik taramalarda %53,3 (Vergara-Castiblanco ve ark,2001), Avrupa’nın değişik bölgelerinde buzağılarda %20-40 dolaylarında hastalığa rastlanmıştır (Krull, 2000).

Doğal enfekte buzağılarda cryptosporidiosis olgusu Türkiye’de ilk kez, Burgu tarafından 1984’te bildirilmiştir. İlgili çalışmada, Karacabey Harasından, yaşları 1-28 gün arasında değişen buzağılardan, rektal tuşe yardımı ile alınan 51 sulu 5 normal kıvamda 56 dışkı örneğinin incelenmesi sonucunda 15 (%26,7) pozitif olgu ile karşılaşılmıştır (Burgu, 1984). Aydın yöresinde, 1-29 günlük 68 ishallerli buzağı üzerine yapılan başka bir taramada, %20,6 oranında hastalık dağılımı ile karşılaşılmıştır (Özlem ve ark, 1997). Sarı ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, Erzurum il merkezi ve çevresinden olmak üzere 12 odadaki 30 buzağı ahır/çiftliği 2007 yılı Mart-Nisan aylarında ziyaret edilmiştir. Üç aya kadar olan buzağuların rektumlarından alınan dışkı örnekleri santrifüj edilmiş ve sedimentten yaymalar hazırlanarak modifiye asit fast boyama yöntemi ile incelenmiştir. Erzurum yöresinde buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansı %22,8 (43/189) oranında bulunmuştur (Sarı ve ark, 2008). Tablo 8’de Dünyada ve Türkiye’de buzağılardaki *Cryptosporidium spp.* prevalansı yer almaktadır.

Tablo 8. Dünyada ve Türkiye’de buzağılardaki *Cryptosporidium spp.* prevalansı

Ülke	Pozitiflik Oranı (%)	Araştırmacı ve yılı
Estonya	%23	Santoro ve ark, 2018
Arjantin	%26,3	Lombardelli ve ark,2019
Çin	%11,9	Gong ve ark,2017
Nijerya	%16- %78	Maikai ve ark,2011
Japonya	%20	Murakoshi ve ark,2012
Fransa	%41,5	Delafosse ve ark, 2015
İngiltere	%10,2	Smith ve ark,2014
Etiyopya	%25,2- %17,3	Wegayehu ve ark.2016, Ayele ve ark,2018
Mısır	%6,9	Mahfouz ve ark, 2014
İran	%22,3- %31	Mirzai ve ark,2014, Ranjbar ve Fattahi,2017
Irak	%7,3	Al-Robaiee ve Al-Farwachi,2014
Vietnam	%43,3	Nguyen, ve ark,2007
Hindistan	%37,25	Joute ve ark,2016
Myanmar	%82	Khin, 2007
Aydın/Türkiye	%10,7	Özlem ve ark,1997
Diyarbakır/Türkiye	%21,8	İçen ve ark,2013
Ankara/Türkiye	%35,8	Şahal ve ark, 2005
Hakkari/Türkiye	%22,14	Göz ve ark, 2007
Erzurum/Türkiye	%22,8	Sarı ve ark,2008
Van/Türkiye	%13,19	Gül ve ark,2008
Ankara/Türkiye	%37,5	Sakarya ve ark,2010
Nevşehir/Türkiye	%20,7	İnci ve Şimşek, 2011
Sivas/Türkiye	%7,5	Özçelik ve ark,2012
Burdur/Türkiye	%93	Yıldırım ve ark,2012
Konya/Türkiye	%47,4-%53,6	Yıldırım ve ark,2013
Kars/Türkiye	%5,1-%3,8	Gündüz ve Özkan,2017
Samsun/Türkiye	%57,9	Karaman ve ark,2017
Kütahya/Türkiye	%40	Akalın,2018
Tokat/Türkiye	%11,21	Kaya ve Coşkun,2018

İçme suyunun hijyenik olmaması, yetersiz kanalizasyon sistemleri gibi kötü hijyen koşulları, hayvancılıkla uğraşma, evcil hayvan besleme, veteriner hekimlik, epidemik bölgelere yolculuk, immun sistem yetmezliği, 0-4 yaş ve 60 yaş üstü olma gibi yaş faktörü, enfekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama, yetersiz beslenme *Cryptosporidium* enfeksiyonları için risk faktörleri olarak bilinmektedir (Spano ve Crisanti 2000, Altıntaş 2002). Her geçen yıl, gerek bağışıklık sistemi baskılanmış olguların sayısındaki artış, gerekse bağışıklık sistemi sağlam kişilerde salgınlara neden olması kriptosporidyozin önemini arttırmıştır (Ülgen ve Balcıoğlu, 2007).

2.1.6.3. Su örneklerindeki epidemiyolojisi

Gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyonun prevalansının endüstrileşmiş ülkelere oranla çok daha yüksek olduğu ve bu durumun endüstrileşmiş ülkelerde içme suyuna uygulanan etkili temizlik ve dezenfeksiyon prosedürlerine bağlı olduğu öne sürülmektedir. Yapılan seroprevalans çalışmaları sonucunda, endüstrileşmiş ülkelerdeki populasyonun % 25-35'inin, gelişmekte olan ülkelerdeki populasyonun ise % 64'ünün kriptosporidyoz ile enfekte olduğunu ortaya koymuştur.

1993'te Amerika Birleşik Devletleri'nin Güney Milwaukee bölgesinde içme suyu kaynaklı olarak ortaya çıkan ve 400.000'den fazla kişiyi etkileyen salgınla birlikte olgu epidemik karakter taşıyan önemli hastalıklar grubuna dahil edilmiştir (Sears ve Kirkpatrick 2001, Dillingham ve ark 2002, Fahey 2003). Baldursson ve Karanis'in 2011 yılında yaptıkları çalışmaya göre dünyada 2004-2010 yılları arasında bildirilen, su kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının %60,3'ünde *Cryptosporidium* etmeni saptanmıştır (Baldursson ve Karanis, 2011). Su kaynaklı epidemik nedenleri arasında parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, klora dirençli olması ve çok az sayıda parazitin dahi enfeksiyona neden olabilmesi gösterilmektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve kriptosporidyoz vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından salgın şeklinde olduğu bildirilmiştir (Ungar 1995, Topçu ve ark 2002). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Cryptosporidium* ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7.0'de iki saat içinde öldüğü kanıtlanmıştır. Su dezenfeksiyonunda kullanılan diğer bir yöntem olan ozonlama işleminin *Cryptosporidium* ookistleri üzerine etkisi araştırılmış ve enfektivitesinin 1 ppm konsantrasyonda 10 dakika sonra ortadan kalktığı gözlenmiştir. Aynı şartlarda *Cryptosporidium* ookistlerinin, *Giardia* kistlerine göre ozona 30 kat, klora ise 14 kat daha fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Dezenfektanlarla yapılan çalışmalar sonucunda, sulardaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun, klor ya da klordioksitten daha etkili bir dezenfektan olduğu bildirilmiştir (Över 1996, Erickson ve Ortega 2006). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, farklı tipte su kaynaklarında (1 litrede) bulunan fekal indikatörlerin ve enterik paojenlerin sınır değerleri Tablo 8’ de içme suyu örneklerinde bulunan ve suyla taşınan paojenler ise Tablo 9’ da yer almaktadır.

Tablo 9. Farklı tipte su kaynaklarında (1 litrede) bulunan fekal indikatörlerin ve enterik patojenlerin sınır değerleri (WHO,2016)

Patojen ya da enterik grup	Göller ve baraj gölleri	Yerleşim bölgelerindeki dere ve ırmaklar	Yerleşim bölgelerinden uzaktaki dere ve ırmaklar	Yeraltı suyu
<i>Campylobacter</i>	20-500	90-2500	0-1100	0-10
<i>Salmonella</i>	-	3-58000	1-4	-
<i>E. coli</i>	10000-1.000000	30000-1000000	6000-30000	0-1000
Virüsler	1-10	30-60	0-3	0-2
<i>Cryptosporidium</i>	4-29	2-480	2-240	0-1
<i>Giardia</i>	2-30	1-470	1-2	0-1

Tablo 10. İçme suyu örneklerinde bulunan ve suyla taşınan patojenler (WHO, 2016)

Patojen	Sağlığa etkisi	İnsidans	Su kaynaklı salgın oluşturma	Doğada kalıcılığı	Kimyasallara dirençliliği	Önemli hayvansal kaynak
<i>Entamoeba histolytica</i>	Asemptomatik-şiddetli	Yaygın	Yaygın	Orta	Yüksek	Yok
<i>Giardia lamblia</i>	Orta	Yaygın	Yaygın	Orta	Yüksek	Var
<i>Cryptosporidium</i>	Orta	Yaygın	Yaygın	Uzun	Çok yüksek	Var
<i>Toxoplazma gondii</i>	Orta	Yaygın	Nadiren	Uzun	Çok yüksek	Var
<i>Cyclospora cayatensis</i>	Orta	Nadir	Nadiren	Uzun	Yüksek	Yok
<i>Blastocystis hominis</i>	Asemptomatik-Orta	Yaygın	Bilinmiyor	Uzun	Bilinmiyor	Yok
<i>Naegleria fowleri</i>	Çok şiddetli	Çok nadir	Bir olgu	Suda yaşıyor	Kist formları için yüksek	Yok
<i>Acanthamoeba</i>	Şiddetli/Çok şiddetli	Çok nadir	Nadiren	Suda yaşıyor	Kist formları için yüksek	Yok

2.1.7. Bulaş

Hayvan gübrelerinin yaygın bir biçimde toprağa bırakılması sonucu, aerosol yayılmayla direk olarak veya su kaynaklarının kontaminasyonu ile indirekt olarak enfeksiyon oluşabilmektedir (Fayer ve ark, 2000). Hasta bireylerle direk temas halinde olan insanlarda, umumi yüzme havuzlarını kullanan kişilerde, bu hastalığın yoğun olarak bulunduğu yerlere seyahat edenlerde kriptosporidiyoz riski büyüktür. Enfeksiyonun oluşabilmesi için ookistlerin kontamine yiyecek, içecek ve bazı diğer çevresel etmenlerle ağız yoluyla ya da enfekte konak tarafından solunumla veya konjunktiva aracılığıyla bulaşması gerekmektedir (Starling ve Arrowood, 1993).

Kriptosporidial ookist her tip suda bulunmaktadır. Dokunulmamış yüzey sularında, filtre edilmiş yüzme havuzu suyunda, hatta klorlanmış veya filtre edilmiş içme sularında dahi

bulunabilmektedir (Chen ve ark, 2002). Depo ve musluk sularında mikrobiyolojik kirliliğin tespit edilmesi, klorlama işleminin yetersiz olduğunun göstergesidir. Bu sebeple klorlamaya karşı dirençli ve enfeksiyon dozu oldukça düşük olan bu parazitin kontamine yüzme havuzlarıyla temas halindeki insanlar ve kontamine derelerden su içen hayvanlar (özellikle buzağılar) için tehlike oluşturduğu bilinmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

Tablo 11. Dünyada su ve gıda kaynaklı *Cryptosporidium* salgınları (Ryan ve ark,2018)

Yıl	Ülke	Olgu Sayısı	Salgın Kaynağı
1984	İngiltere	24	Az pişmiş sosis veya kontamine süt
1990	Rusya	13	Kefir
1993	ABD	160	Taze sıkılmış elma suyu
1995	ABD	15	Tavuk Salatası
1995	İngiltere	50	İnek sütü
1996	ABD	31	Elma suyu
1997	ABD	54	Yeşil soğan
1998	ABD	152	Sebze ve meyve
2001	Avustralya	8	Pastörize edilmemiş süt
2003	ABD	144	Ozonlanmış elma suyu
2005	Danimarka	99	Salata
2006	Japonya	4	Çiğ et
2008	İngiltere	23	İçme suyu
2008	Finlandiya	72	Salata
2008	İsveç	39	Salata
2009	Norveç	74	Havuç
2010	İsveç	89	Salata
2011	İsveç	186	İçme suyu
2012	İngiltere	648	Tüketime hazır gıda
2012	Finlandiya	250	Salata
2014	ABD	11	Pastörize edilmemiş keçi sütü
2015	İngiltere	424	Salata

Zayıf bağışıklık sistemi olan HIV/AIDS bulaşmış kişiler, organ transferi yapılanlar, kemoterapi tedavisi devam eden insanlar, böbrek hastaları, çocuk yuvaları veya çocukların bulunduğu günlük bakım merkezlerinde çalışanlar, ülkeler arası yolculuk yapanlar (yolculuk ishali), izciler, kampçılar gibi işlenmemiş su kaynaklarından su içmek zorunda kalanlar bu parazitin bulaşmasındaki risk gruplarını oluşturmaktadır. Enfeksiyon açısından risk altında olan kişilerin, ishalleri hastalar, çiftlik hayvanları, özellikle 6 aydan küçük hayvanlarla temastan kaçınmaları gerekmektedir. Özellikle hastaneler, laboratuvarlar, gündüz bakım evleri başta olmak üzere toplu yaşanan alanlarda genel hijyenik önlemlere dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Ok ve Balcıoğlu, 2007).

2.1.8. Patogenez

C. parvum' dan primer olarak ileum ve jejunum etkilenmektedir. Bunun yanı sıra proksimal ince bağırsaklarda ve kalın bağırsağın bir bölümünde de bulunabilmektedir. *C. parvum* hücrelerin apikal kısımlarında bulunduğu için minimal invaze mukozal patojen olarak sınıflandırılır (Laurent ve ark, 1999).

Parazitin patolojik tablosu, parazitik vakuolün yırtılması ile merozoitlerin serbest kalıp diğer enterositlere yayılması ile oluşur. Patolojik tabloda villus atrofisi, villus erimesi, kript hiperplazisi, yangısal infiltrasyon ve mikrovillusların dejenerasyonu görülmektedir (Gookin ve ark, 2002; O'Handley ve Olson, 2006).

Bağırsaklardaki villusların fazla miktarda kaybı sonucu şiddetli villus atrofisi meydana gelmektedir. Koruma bariyerini oluşturan villusların yok olması sonucu kaybedilen hücrelerin tekrar kazanılması için kriptlerde hiperplazi gelişir (Gookin ve ark, 2002; Tzipori ve Ward, 2002; Foster ve Smith, 2009). Parazite bağlı şiddetli enfeksiyonda epitel bariyeri yırtılmaktadır. Parazitin bağırsak villuslarının kenarına invaze olmasıyla, ince bağırsak mukozasının fonksiyonları ve enzim aktivitesinde bozulmalar meydana gelmektedir. Buna bağlı peptid ve disakkaritlerin yıkımlanması ile besin ve elektrolit transportundaki azalmalar meydana gelmektedir (Gookin ve ark, 2002; Tzipori ve Ward, 2002; O'Handley ve Olson, 2006).

Parazitin konak hücreye tutunması eksistasyondan sonra olmaktadır (Şekil 3) Apikal komplekste bulunan organeller ve yüzeyde bulunan proteinlerin etkisi ile parazitik vakuol formasyonu uyarılır (Gookin ve ark, 2002; O'Hara ve Chen, 2011). Parazitik vakuolün oluşumu, tutunması ve invazyonunda çok karmaşık bir mekanizma görev almaktadır. Bu

mekanizmadan birçok yüzey ve apikal kompleks proteinleri sorumlu olduğu yeni çalışmalarla saptanmıştır. (Tzipori ve Ward, 2002). Tutunmanın ardından internalizasyon şekillenmekte ve daha sonra parazit konak hücre membranına invaze olmaya başlamaktadır. Konak hücrenin tutunma bölgelerine parazit roptri ile temas eder ve mikronemler ile dense granülleri birleşme bölgesine göç eder. Parazit bu aşamadan sonra kanal benzeri bir görünüme sahip olur ve parazitin sitoplazması vakuollü bir görünüm kazanır. Bu vakuollü form konak hücre tarafından kapsülленir. Sporozoidler konak hücre tarafından kabul edilmekte ve parasitovorus vakuol bu şekilde oluşmaktadır (çift membranlı-intrasellüler ekstrasitoplazmik yerleşimli). Parazit-konak arasında, polimerize aktinli elektron-dense yapısı meydana gelmektedir. Hücrenin aktin dalları oluşturdukları sinyaller ile epitel membrandan parazite su, sodyum, glikoz geçişini sağlarlar (O'Hara ve Chen, 2011).

2.1.9. Cryptosporidiosis

Tıp ve veterinerlik açısından önemli enterik bir protozoon olan *Cryptosporidium* insanlarda ve hayvanlarda geniş çaplı yayılım gösterir. *Cryptosporidium* cinsine bağlı, protozoonların neden olduğu cryptosporidiosis, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan ve 100'den fazla canlı türünde görülen zoonoz bir hastalıktır (Miller ve ark, 2003).

Cryptosporidiosisde intestinal, respiratuar, hepatobiliyer ve pankreatik kriptosporidyoiz olmak üzere dört farklı klinik tablo görülür (Griffiths ve ark, 1998).

2.1.9.1. İntestinal cryptosporidiosis

2.1.9.1.1. Asemptomatik taşıyıcılar

Bu tipte hiçbir klinik belirti görülmez ancak enfektif kişiler hastalık için portör görevi görürler. Asemptomatik taşıyıcılık oranı HIV pozitif olgularda sağlıklı bireylerden daha yüksektir. ABD'de yapılan bir çalışmada normal toplumun % 6,4'ünde, HIV pozitif olguların ise % 22'sinde hiçbir klinik belirti gözlenmezken dışkılarında *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır (Pettoello-Mantovani ve ark, 1995).

2.1.9.1.2. Akut sınırlı enfeksiyon

İmmun sistemi sağlam kişilerde daha yaygın görülen bu tipte en sık görülen semptom bol ve sulu, mukuslu, çok nadir kanlı ishaldir. Barsak hareketlerinde artış, hızlı kilo kaybı ve dehidratasyona neden olabilmektedir. Karın ağrısı, anoreksia, ateş (<39 °C), bulantı kusma, başağrısı gözlenen belirtilerdir. Bu klinik belirtiler birkaç gün ile birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebilmektedir (Ülgen ve Balcıoğlu, 2007).

2.1.9.1.3. Kronik enfeksiyon

Daha çok yetersiz beslenen çocuklarda ve HIV pozitif hastalar başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış grupta görülen klinik tablodur. Olguların %85'inde dirençli ishal, %100'ünde kilo kaybı ve yetersiz beslenme gözlenmektedir (Moolasart ve ark, 1995).

2.1.9.1.4. Fulminant enfeksiyon

HIV pozitif hastalarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. En belirgin özelliği kolera benzeri klinik tablo oluşturması ve çok yüksek mortalite ile karakterize olmasıdır. Vücuttan aşırı sıvı kaybı ve şoka neden olabilmekte bu nedenle tedavide öncelikle sıvı elektrolit dengesinin sağlanması önerilmektedir (Ülgen ve Balcıoğlu, 2007).

2.1.9.2. Respiratuar cryptosporidiosis

Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde yaygın olarak görülen bu klinik tablo şiddetli, dirençli öksürük, ses kısıklığı, ateş, trakeal sekresyon ve solunum güçlüğü ile karakterizedir. AIDS olguları başta olmak üzere malign lenfoma ve kemik iliği transplant olguları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde öldürücü solunum sistemi tablosu daha çok görülmektedir (Dupont ve ark, 1996).

2.1.9.3. Hepatobiliyer cryptosporidiosis

Genellikle AIDS'li ve kronik cryptosporidiosisli hastalarda gelişen safra kesesi ve safra yolları epitelinin tutulumu ve taşsız kolesistit tablosuyla ortaya çıkmaktadır. AIDS

olgularında intestinal enfeksiyonların tekrarı (dirençli cryptosporidiosis) veya paramomisin gibi intraluminal ajanlarla sağaltım biliyer enfeksiyon için risk oluşturmaktadır (Ülgen ve Balcıoğlu, 2007).

2.1.9.4. Pankreatik cryptosporidiosis

Pankreatik kanalların kolonizasyonu ile gelişen ve genellikle AIDS'li hastalar başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde gözlenen bu klinik tablo hepatobiliyer cryptosporidiosis ile eşlik eder (Arrowood, 1997).

2.1.10. Tanı

Memelilerde cryptosporidiosis olguları genel olarak birbirine benzer bulgularla seyretmekte (Starling ve Arrowood, 1993) ve parazit kaynaklı gelişen akut ishal tablosu, hastalığa spesifik bir özellik taşımamaktadır (Fahey, 2003). Kansız, sulu, homojen bir ishalin gözlenmesi *Cryptosporidium* enfeksiyonları için kuşku uyandırıcı bulgular arasında yer almaktadır (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Ancak diğer parazitik, virüs ya da bakteri kaynaklı enfeksiyonlar ile cryptosporidiosis arasında önemli bir klinik ayırım ortaya konamamıştır (Starling ve Arrowood, 1993).

Cryptosporidiosis tanısında direk bakı, özel boyama yöntemiyle inceleme, IFAT, ELISA, PCR ve yavaş sitometri gibi tekniklerden yararlanılabilmektedir (Gasser ve O'Danoghue, 1999). Klinik laboratuvarlarda hastalığın tanısı için en temel inceleme yöntemi dışkı taraması ve etkenin görülmesidir (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Bunun yanı sıra endoskopi, mukozal biyopsi taramaları (Clark, 1999), etkilenen dokuların radyografisi, bronşiolveolar lavaj (Fahey, 2003), ince bağırsak aspiratı, endoskopik pankreas kanalları grafisi gibi tekniklerden de teşhis amacı ile yararlanılabilmektedir (Sears ve Kirkpatrick, 2001).

Cryptosporidium parazitin teşhisi için en uygun ve kolay teknik, dışkı taramasıdır (Emre ve ark, 1997). Hastalıkta ookist atılımı aralıklı olduğu için teşhis için farklı zamanlarda, çok sayıda dışkı örneği almak gerekebilmektedir (Sears ve Kirkpatrick, 2001). Ayrıca, etken atımının bol olduğu sulu dışkılarda, ookistlerin çoğu mukus içinde saklı kalabilmekte, şekilli ve az mukuslu dışkılarda ise etken atımı düzensiz veya yetersiz olmaktadır. Genel tanı kuralları açısından, alınan materyalin taze olması gerekir (Sears ve

Kirkpatrick, 2001). Dışkının makroskopik olarak incelenmesinde hastalarda %75 oranında lökosit rastlandığı da bildirilmiştir (Tzipori ve Ward, 2002).

Alınan taze dışkılar laboratuarda direk incelenebileceği gibi uygun koşullarda uzun süre de saklanabilir (Dubey ve ark, 1990). Yapılan araştırmalar sonucunda ookistlerin canlı kalabildiği sıcaklık aralığının 4-23 °C olduğu bunun üzerinde ki ve altındaki sıcaklıklarda protozoonun canlılık oranının da düştüğü bildirilmektedir (Carey ve ark, 2004). Toplanan dışkılar taze olarak, pH'sı 7,2 olan 0,15M PBS solusyonu içinde ; %2,5'lik K₂Cr₂O₇, %10'luk formalin, sodyum asetoasetik asit-formalin (SAF) veya merkürük klorit solusyonları içerisinde muhafaza edilebilir (Starling ve Arrowood, 1993). %2,5'lik K₂Cr₂O₇ içerisinde +4 °C'de saklanan dışkıların uzun süre (3 aydan- 12 aya kadar) enfektivitelerini korudukları bildirilmektedir (Limor ve ark, 2002). Penicilin, streptomycin, fungizone, mycostatin gibi antimikrobiyal ajan içeren, Hank's dengeli tuz solusyonu gibi çözeltiler içerisinde alınan dışkının saklanması ile çevresel kontaminasyonunda önüne geçilebileceği vurgulanmaktadır (Dubey ve ark, 1990).

Mikroskopik inceleme sırasında incelenen alanda ookist miktarının artırılması amacıyla Sheater'in sukroz flotasyon yöntemi, Percoll-sukroz flotasyon yöntemi, çinko sülfat, sodyum klorit solusyonları, demir III sülfat flotasyonu, formalin-eter, formalin-etil asetat sedimentasyon yöntemleri kullanılabilir (Starling ve Arrowood, 1993).

Kriptosporidiosis tanısında boyasız preparatlarda tanı zordur ve ön bir tarama olarak kullanılmaktadır (Dubey ve ark, 1990). Kriptosporidiosisde tanı amacı ile çok sayıda boyama tekniğinden yararlanılabilmektedir. İodin ile yapılan boyama basit, kolay olması açısından, mantar sporu ve ookistleri faz kontrast veya differensiyel interferens kontrast mikroskopunda ayırmanın mümkün olabilmesinden dolayı ön tanı amacıyla kullanılmaktadır. Kriptosporidiosisde teşhis amacı ile *carbol fuchsin*, safranin-metilen mavisi, asit fast, nigrosin, Giemsa, floresan boyama (auramin-rhodamin, auramin-fenol floresans, auramin-carbol fuchsin, akridin oranj) gibi tekniklerden yararlanılmaktadır (Leng ve ark, 1996). Günümüzde tanı amacı ile en sık kullanılan boyama teknikleri, asit fast boyama yöntemleridir. Bu grupta kinyoun-modifiye asit fast (Roberts ve ark, 1996), modifiye Ziehl Neelsen, soğuk ve sıcak asit fast teknikleri yer alır (Sears ve Kirkpatrick, 2001).

Modifiye Ziehl Neelsen tekniği ile boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yeşil zemin üzerinde kırmızı-pembe bir renkte görünür. Ookistin seçilemeyen iç kısmı, etkenin yüzeyine göre daha koyu boyanır. Mantar sporları, bakteriler, dışkı kalıntıları ve diğer asit fast özellik taşımayan yapılar mavi renkte görülür. Ancak bazı bakteri sporları ve kimi diğer organizmalar ookistlerle karışabilmektedir (Emre ve ark, 1997; Garcia ve Bruckner,

1997). Modifiye Ziehl Neelsen tekniği cryptosporidiosisin tanısında uygun bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (Emre ve ark, 1997). Kinyoun -asit fast boyamada, ookistler kolay tanınabilecek şekilde koyu kırmızı-pembe bir renkte boyanırken, maya ve diğer doku artıkları boya almazlar (Doğan ve Akgün, 1998; Dirim ve ark, 2003). Soğuk kinyoun boyamada ise ookistler mavi zemin üzerinde parlak kırmızı, heterojen boyanmış olarak görölmektedir (Över, 1996).

Safranin-metilen mavisini ile boyanan preparatlarda ookistler şeffaf bir hale ile çevrili olarak turuncu kırmızı renkte, dışkı kalıntısı ise mavi renkte gözlenmektedir. Yöntemin dezavantajı ookist iç yapısının seçilmemesidir (Fayer ve ark, 2000).

Carbol fuchsin boyamada zemin kırmızı gözlenirken, ookistler şiddetli ışık kırıcı özellikte, düzgün duvarlı ve tam anlamıyla oval bir yapıda görülürler (Erman ve ark, 2000). Mikroskop altında 40X objektifte, eğer mikrometre ile oynanır ise ookistlerin içerisinde kırmızı kalıntılar şeklinde sporozoitler fark edilebilir (Özlem ve ark, 1997). *Carbol fuchsin* DMSO (dimetilsülfooksit) ile kombine edilerek uygulandığında, ayırt edilebilir bir zemin üzerinde kırmızıya boyanmış ookistler rahatlıkla fark edilebilmektedirler (Fayer ve ark, 2000).

Mantar sporları ile ookistlerin birbirinden ayrılması amacıyla asit fast-trikrom kombine boyama tekniğinden yararlanılmaktadır. Bu yöntem ile boyanmış preparatlarda, *Microsporidium* sporları 1-2,5 µm uzunlukta, oval-yuvarlak, parlak pembe renkte görülürken, boya almış bir polar vakuol fark edilebilir. *Cryptosporidium* ookistleri 4-6 µm büyüklüğünde, yuvarlak oval, parlak pembe renkte görülür (Reisner ve Spring, 2000).

Hastalığın tanısında, serum analizi ve etkene spesifik antikorun tespiti yoluna da gidilebilmektedir (Bannai ve ark, 2006). Cryptosporidiosisde, ookist ve sporozoit antijenlerine karşı IgA, IgM ve IgG'lerin oluşumu söz konusudur (Riggs, 2002). İlgili antikorların tespiti amacı ile, IFAT (indirek immunfloresan antikor testi), ELISA ve Western blot tekniklerinden yararlanılabilmektedir. IFAT'ta ookist veya hem ookist hem de sporozoit antijenleri kullanılabilmektedir. Etkili bir test olan ELISA, pek çok araştırmacı tarafından Western blot tekniğine göre daha duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Al-Qubaji, 2005). Söz konusu teknikler genel olarak, klasik boyama tekniklerine göre daha duyarlıdır. Hayvanlarda ve insanda hastalığın teşhisi amacı ile kullanılabildikleri gibi çevresel materyallerden etken izolasyonu konusunda da yararlanılabilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Özellikle incelemek materyalin formalin ile tespit edildiği veya stoklamamanın uygunsuz yapıldığı durumlarda ELISA, IFAT gibi testler önemli bir teşhis alternatifi konumundadır (Gasser ve O'Danoghue, 1999). Ancak, bu yöntemler antijen-antikor birlikteliği temeline dayandığı için

belli oranda diğerk mikroorganizmalarla çarpaz reaksiyon verme riski taşımaktadır (Fayer ve ark, 2000) ELISA yöntemi diğerk boyama tekniklerine göre oldukça duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntemin sensitivite ve spesifitesi %94'ün üzerindedir (Garcia ve Shimizu, 2000). IFAT'tan daha duyarlı olan ELISA'nın etkinliğı kitlere göre değışebilmekte (Leng ve ark, 1996), güvenilirliğı açısından, incelenen materyalin her ml.'sinde 10^3 - 10^4 'ten daha fazla sayıda ookistin bulunması gerekmekte (Leng ve ark, 1996), testte kullanılan antikorlar ise çarpaz reaksiyon verebilmektedir. Tüm bu maddeler ELISA yönteminin dezavantajları olarak görölmektedir

Hem semptomatik hem de asemptomatik enfeksiyondan sonra oluşan antikor yanıtı *Cryptosporidium* için serolojik çalışmaların temelini oluşturmaktadır. *Cryptosporidium*'un serolojik tanısında IgA, IgG Cp23, Cp17 (gp15) ve P2 antijenleri kullanılmaktadır (Priest ve ark, 2006). Luminex esaslı serodiyagnostik bir platforma adapte edilen bu tahliller, filtre kağıdına veya oral sıvı ile parmak ucundan toplanan kanla yapılabilmektedir(Lammie ve ark, 2012).

*Cryptosporidiosis*in etkensel tanısındaki zorluklar dikkate alınmış ve rastlantısal olarak ishal, karın ağrısı, bulantı-kusma gibi gastrointestinal yakınma ile başvuran 80 olgunun ve kontrol grubu olarak sağlıklı 65 kişinin dışkı örnekleri *cryptosporidiosis* yönünden Kinyoun asit fast boyama yöntemi ve dışkıda *Cryptosporidium spp.* antijenlerini aramaya yönelik hazırlanmış ELISA kiti (r-biopharm, Germany) ile incelenmiştir. Alınan sonuçlar karşılaştırılarak ELISA ile dışkıda spesifik antijen arama yönteminin etkensel tanıya katkı sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. İncelenen 80 dışkı örneğinin sonuçlarına bakıldığında kinyoun asit fast boyama yöntemi ile üç örnekte (%3,75) *Cryptosporidium spp.* ookistleri, monoklonal ELISA ile yapılan değerlendirmelerde ise beş örnekte (%6,25) *Cryptosporidium spp.* spesifik antijenlerin saptandığı görölmüştür. Kinyoun asit fastle boyanan üç örnek ELISA ile de pozitif olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise her iki yöntemle *Cryptosporidium* etkeni saptanmamıştır. *Cryptosporidium* ELISA kitinin bu çalışmada sensitivitesi %85, spesifitesi %100, negatif prediktif değeri %97,4, pozitif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır (Tamer ve Gülenç, 2008).

Cheun ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada diyareli hastalarda *C. parvum* ve *G. lamblia*'nın saptanması için yüksek hassasiyetli bir antikor teşhis kiti geliştirmeyi amaçlamıştır. Antikor titreleri elde etmek için sığır ve köpeklere *C. parvum* ookistleri ve farelere *G. lamblia* kistleri enjekte edilmiştir. Bağışıklaştırılmış farenin dalak hücreleri ayrılmış ve monoklonal antikorları oluşturan hibrid hücre çizgileri üretmek üzere miyelomlarla harmanlanmıştır. ELISA yöntemini kullanarak, özellikle *C. parvum*'a tepki

veren antikorlar ve *G.lambli*a seçilmiştir. Hücreler, bir BALB / c faresinin karın boşluğuna enjekte edilerek izole edilmiştir. Yüksek düzeyde antikor içeren hidrops abdominis. IgG antikor protein G jel yöntemiyle saflaştırılmıştır (Cheun ve ark, 2013).

Hawash ve arkadaşları *Giardia/Cryptosporidium* antijenlerinin insan dışkı örneklerinin taranması ve tanımlanması için üç ticari kitini değerlendirilmişlerdir. İlk olarak, enzim bağlantılı immunosorbent assay (ELISA) olan *Giardia/Cryptosporidium* Chekkit (TechLab) tarama için seçilmiştir. ELISA pozitif reaksiyonlar daha sonra RIDA Quick *Giardia* ve RIDA Quick *Cryptosporidium* immunokromatografik kitleri (R-Biopharm) ile karakterize edilmiştir. Tek tek kitlerin performansı, 50 *Giardia* pozitif, 40 *Cryptosporidium* pozitif ve 70 *Cryptosporidium* / *Giardia* negatif içeren bu numunelere karşı test edilmiştir. *Cryptosporidium* için, ELISA ve RIDAQuick *Cryptosporidium* kitlerinin spesifiklikleri sırasıyla% 95,71 ve% 100 bulunmuştur. Her iki kit de% 95 hassasiyet göstermiştir. *Giardia* için, ELISA ve RIDA Quick *Giardia* kitleri sırasıyla% 100 ve% 97,5 duyarlılık sergilemiştir. ELISA ve RIDAQuick*Giardia* ile elde edilen spesifiklikler sırasıyla% 95,7 ve % 100 bulunmuştur. İki farklı rastgele örneklemlerden, algoritmaya duyarlılık, özgüllük, olumlu tahmini değer ve negatif prediktiv değer% 97,06,% 100,00, % 100,00 ve % 98,91 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, bu imünoassay tabanlı algoritma, çok sayıda numunenin taranması için tanı laboratuvarlarında rutin test olarak kullanılabilceği saptanmıştır (Hawash, 2014).

Cryptosporidium türlerinin klinik olgulardan ve çevresel kaynaklardan izole edilmesi amacıyla günümüzde PCR yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR sayesinde örneklerde bulunan bir ookist bile saptanabilmektedir (Clark, 1999) Sıvı örneklerden ookist izolasyonu konusunda ELISA tekniğine göre çok daha duyarlı olan PCR, önemli bir tanı tekniğidir (Leng ve ark, 1996). Bunun yanı sıra etkenin hibridizasyon ürünlerini hedefleyen PCR teknikleri IFAT yöntemine göre de çok etkili bulunmaktadır (Jenkins ve ark, 2000). Ayrıca PCR kötü koşullarda muhafaza edilen numunelerde tanı amacı ile kullanılabilcek mevcut en uygun yöntemdir (Gasser ve O'Danoghue, 1999).

PCR, oldukça hızlı, yüksek düzeyde duyarlı ve doğru sonuçlar çıkaran bir testtir. Buna rağmen PCR yönteminin dezavantajları arasında laboratuvar kontaminasyonlarından kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların olması, zaman alıcı olması, pahalı bir yöntem olarak değerlendirilmesi ve deneyimli elemanlara gereksinim duyulması yer almaktadır (Fayer ve ark, 2000). Bunun yanı sıra dışkıdan DNA izolasyonunda kullanılan yöntemler de PCR'ın dezavantajları arasında yer almaktadır. Örneğin rutinde yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyonu (Xiao ve ark, 2000), dışkıda yer alan kompleks polisakkaritler, safra

tuzları, bilirubin ve bazı diğer komponentler PCR tekniği için inhibe edici özellik taşımaktadırlar (Clark, 1999). Günümüzde, teşhiste kullanılmak üzere seçilebilecek hedef moleküller konusunda ayrıntılı bilgilere ulaşılmıştır. İzole edilen etkenin türünün, canlılığının ve enfektivitesinin tayini amacı ile geliştirilmiş değişik PCR teknikleri bulunmaktadır.

Cryptosporidiosisin, PCR ile teşhisi için *HSP70* mRNA geni (Di Giovanni ve ark, 1999), 18s SSU rRNA geni, β tubulin kodlayan mRNA geni (Widmer ve ark, 1999), amyloglikosidoz enzimini kodlayan mRNA geni (Jenkins ve ark, 2000), methionin aminopeptidaz, T-kompleks protein 1 delta (TCP-1) içeren chaperonin kodlayan genler, *COWP*, *TRAP-C1* (trombospondin related adhesive proteins *Cryptosporidium-1*), *TRAP-C2* genleri sık kullanılan moleküller arasındadır. Duyarlılık açısından en yaygın gen bölgelerinin, nested PCR tekniğinde kullanılan ve genomda tek kopyası bulunan dihidrofolat redüktaz enziminin kodlayan gen ile genomda 5 kopyası bulunan 18 S rDNA geni olduğu bildirilmiştir (Pedroza-Diaz ve ark, 2001).

Gerek tanıda, gerekse tiplendirmede ve de etken özelliklerinin saptanmasında değişik gen kısımları kullanılarak yapılan PCR tekniklerinin yanı sıra izoenzim analizlerinden de yararlanılabilmektedir. Bu amaç için ookist duvar proteini, zoit yüzey proteinleri, apikal kompleks komponentleri, proteazlar, karbonhidrat metabolizması enzimleri, folat biyosentezi, poliyamin biyosentezi enzimleri ve antioksidatif enzimler kullanılabilmektedir (Gasser ve O'Danoghue, 1999).

Örneklerden izole edilen ookistlerin canlılığının ve enfektivite gücünün saptanması, hastalığın veya salgının boyutlarını ortaya koyabilme açısından önem taşımaktadır. Bu amaçlar için geliştirilmiş pek çok teknik söz konusudur. Hayvan deneyleri, *in vitro* ekskistasyon, hücre kültürü, hücre kültürü-PCR kombine uygulaması, vital boyama teknikleri ve FISH (fluorescent in situ hybridisation) bu konuda verebilecek örneklerdir (Fayer ve ark, 2000; Carey ve ark, 2004).

Cryptosporidium türlerinde biyolojik, patolojik, immünolojik, moleküler ve ilaç çalışmalarında karşılaşılan en büyük engellerden biri *Cryptosporidium* türlerinin *in vitro* ortamlarda sürekli kültürlerinin yapılamıyor olmasıdır. Enfeksiyon oluşturan materyal ve izolatlarda *C. parvum* kültürleri için fare ve ineklere, *C. hominis* için ise domuz ve gerbillere sürekli olarak pasaj yapmak gerekmektedir (Tzipori ve Widmer, 2000).

Canlılık tayini amacı ile, değişik hücre kültürlerinden yoğun bir şekilde faydalanılmakta (Di Giovanni ve ark, 1999) olup, günümüzde 25'ten fazla kültür çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları Caco-2 (insan kolon karsinoma hücre kültürü), sığır fallopian tüpü epiteli hücre kültürü, Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü,

HCT-8 (insan iliosekal karsinoma hücre kültürü), insan mide adenokarsinom hücre kültürleridir. Çalışmalarda kullanılabilen en uygun kültürün HCT-8 olduğu bildirilmiştir (Hijjawi ve ark, 2004; Karanis ve Aldeyarbi, 2011). Ekimi takiben 24.-72. saatlerde kültür taranır ise, etkenin değişik üreme formları fark edilebilmektedir. HCT-8’de, 2-3 gün ara ile yapılan pasajlar sayesinde kültürü 25 gün kadar uzatabilmek mümkündür. Bu uzun süre sayesinde, ilgili dönemde yapılabilecek çalışmalar rahatlıkla yürütülebilmektedir (Carey ve ark, 2004).

Hücre kültürünün en büyük dezavantajı sürekli olarak devam ettirilebilen bir kültürün ortaya konamamış olması (Hijjawi, 2003) ve doğal etken biyolojik siklusunda oto-enfeksiyonu sağlayan ince duvarlı ookistlerin in vitro ortamda oluşmamasıdır (Gasser ve O’Danoghue, 1999).

Etkenin kültürdeki üremesini saptamak amacıyla değişik teknikler kullanılmaktadır. Örneğin, enfeksiyonun 48. saatinde etken bulunan hücre kültürü FITC ile işaretlenmiş poliklonal sporozoit spesifik antikorları içeren serum ile muamele edildikten sonra etkene tutunmuş antikorlar floresan mikroskopunda taranabilmektedir (Carey ve ark, 2004).

Hücre kültürleri, etkene karşı ilaç denemelerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, etkenin gerek ekskistasyonu, gerek üreme yetisi, gerekse de ilaç duyarlılığı inokulum hazırlama tekniklerine, inkübasyonun süresine, şartlarına, etkenin orijinine ve benzer bir takım faktörlere bağımlılık gösterir. Çalışmalarda, ilgili konuları daima göz önünde bulundurmamak gerekmektedir (Gasser ve O’Danoghue, 1999).

Aksenik kültür ortamlarında kültürlerinin yapılabileceğini ilk kez Hijjawi ve arkadaşları bildirmişlerdir. Bu çalışmada inokülasyondan 8 gün sonra yeni ookist oluşumu gözlemlenmiştir (Hijjawi ve ark, 2004). Girouard ve arkadaşlarının 2006 yılında serumsuz üretim sistemleri kullanarak yaptıkları benzer çalışmada *Cryptosporidium* üretimi yapılamamıştır (Girouard ve ark, 2006).

Hayvan deneyleri canlılık tespitinde kullanılan en kolay ve direkt yöntemdir. Deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarda etkenin gelişimi, ookistin atılımı ve hastalığın oluşumu izlenebilir. Bunun yanı sıra ilaç uygulamalarında, hastalığın patolojisi ve immunolojisi üzerine yapılan çalışmalarda da hayvanlardan yararlanılabilir (Carey ve ark, 2004). Deneysel enfeksiyon çalışmalarında, neonatal dönemde bulunan veya immünsüpresif olan (6-7 günlük fareler, 8-12 haftalık SPF fareler, 200-250 gr’lık ratlar, CD-1 veya BALB/c hatları gibi) rodentler (Widmer ve ark, 1999), SIV ile enfekte maymunlar, neonatal dönemdeki kuzu ve oğlaklar kullanılmaktadır. Deneyler için en uygun hayvan türü dezavantajları bulunmasına

rağmen faredir. Altı-yedi günlük fareleri, oral olarak verilen 10^6 ookist ile enfekte edebilmek mümkündür (Widmer ve ark, 1999). Uygun olarak seçilmiş farelerde 10^3 ookist ile de enfeksiyonun oluşturulabileceği, ancak basit bir yöntem olmasına karşın, rutin tanı ve canlılık tayini amacı ile hayvanların kullanılmasının pratik ve ucuz bir yöntem olmadığı ifade edilmiştir (Carey ve ark, 2004). Hayvanları hastalığa duyarlı hale getirmek amacı ile en yaygın olarak kullanılan kimyasalların basında Dexamethasone gelmektedir (Suresh ve Rehg, 1996).

2.1.11. Tedavi

Tüm çalışmalara karşın kriptosporidiazis tedavisi için tam etkin bir ilaç yoktur (Zhu ve Fritzler 2012). İmmün yetmezliğe sahip kişilerde hücresel bağışıklık işlevinin iyileşmesine yönelik yapılan uygulamalar kriptosporidiazis için kilit bir role sahiptir. HIV pozitif hastalarda kriptosporidiazis için, hücresel bağışıklık işlevinin iyileşmesine yönelik uygulamalar ile antiretroviral tedavi birlikte uygulanmaktadır (Cabada ve White, 2010).

Cryptosporidium'a karşı çeşitli ilaçlar *in vitro* koşullarda, hayvan modellerinde ve hastalarda karşı aktivite ile tanımlanmıştır. HIV pozitif hastalarda spiramisin, azitromisin ve immünoglobülin etkin bulunmamıştır (Cabada ve White, 2010). Semptomlarda ve ookistlerin serbestlenmesi üzerinde paromomisin çok az etki göstermiş ve kesin bir sonuç elde edilememiştir (Hewitt ve ark, 2000). Günümüzde nitozoksanidin *C.parvum* ve *C.hominis* enfeksiyonlarında kullanılması “Amerika Gıda ve İlaç Dairesi” (FDA) tarafından kabul görmüştür. Nitozoksanid ile tedavi edilen malnütrasyonlu çocuklarda mortalite önemli oranda azalırken, HIV bulunmayan erişkinlerde ve çocuklarda yapılan çalışmaların bulguları ise olumlu yöndedir (Amadi ve ark, 2002). Nitazoksanid alan hastaların %56'sında, plasebo etkili ilaç alan hastaların% 23'ünde ishal kesilmesinin olduğu görülmüştür (Amadi ve ark, 2002). Nitozoksanide ilave olarak antiretroviral tedavi uygulanmayan HIV hastalarında dahil olduğu üç kontrollü çalışmada enfeksiyonda genel olarak iyileşme görülmemiştir (Amadi ve ark, 2002, 2009).

C hominis, *C parvum* ve diğer *Cryptosporidium* türlerine karşı genom dizilimi ve işlevsel genomik verilerin bulunması ile kemoterapi hedefi için benzersiz metabolik yollar keşfedilmiştir (Abrahamsen ve ark, 2004; Aurrecoechea ve ark, 2013).

C. parvum' un spesifik bir tedavisi ve onaylanmış ticari bir aşısı yoktur. Ancak aşı çalışmaları mevcuttur. *C. parvum* için aşı çalışmaları immunojenik potansiyeli olan, konak hücreye bağlanmayı sağlayan ve invazyondan sorumlu CSL, gp900, gp40, gp15/17, Cp 15/60,

Cp23/27, Cp12 ve Muc4 üzerine yoğunlaşmıştır. Gp900, Gp40, Gp15/17 ve Cp23/27 antijenlerinin hayvan ve insanlarda hücreyel immun yanıt oluşturduğu bulunmuştur. *Cryptosporidium*' un DNA bazlı aşu adayları olarak ise P2, Cp12, Cp15/60, Cp23, Cp21 ve COWP olabileceği, bunlardan Cp15 ve Cp23 antijenlerinden elde edilen divalent aşının farelerde ki koruyuculuğunun daha fazla olduğu bulunmuştur. Mevcut çalışmalara rağmen henüz kullanılabilir bir aşu onaylanmamıştır.

2.1.12. Korunma

Doğada yaygın olarak bulunan *C. parvum*'un biyoterörizm ajanı olarak değerlendirilmesinin nedenleri su yoluyla bulaşma potansiyelinin olması; ookistlerin her zaman infeksiyel olması, oldukça küçük olmaları (3,5-6,0 µm) ve düşük sedimentasyon oranına (0,5 m/s) sahip olmalarıdır. İşlenmemiş atık sularda, filtre edilerek işlenen atık sularda, kanalizasyonda, yer altı sularında, yeryüzü sularında ve işlenmiş içme suyunda ookistlerin belirlenmesi; dışkıyla kontaminasyonu göstermektedir (Fayer, 2000).

Ookistler uygun şartlarda (nem oranı yüksek ve 20°C'nin üzerindeki sıcaklık), 6 ay canlı kalabilmekte ve daha sonra hızla enfektivitesini kaybetmektedir. Enfeksiyona sebep olan bu ookistlerin, %10'luk formolde veya %50 derişik amonyak gibi kimyasal solüsyonlarda 30 dakika içinde, ayrıca 60 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda veya -20 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletmekle canlılığını kaybettikleri bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar ışığında, ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7'de iki saat içinde veya 1 ppm ozon konsantrasyonunda 10 dk sonra öldüğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak sulardaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun, klor veya klordioksitten daha etkili bir dezenfektan olduğu tespit edilmiştir (Hazer, 2007).

Cryptosporidium enfeksiyonlarının kontrol altında tutulabilmesi için öncelikle ookistlerin çevreye yayılmasının önlenmesi gerekmektedir. Ookistlerin yok edilmesi enfeksiyonların önlenmesinde ve büyük çaplı salgınların engellenmesinde önem taşımaktadır. El yıkama ve kontamine olmuş materyallerin uzaklaştırılması gibi hijyen koşullarının düzeltilmesi ile insandan insana ve hayvandan insana ookistlerin bulaşma riski azaltılmaktadır. Ookistlerin -20°C'de 72 saat dondurulması, 45-55°C'de 20 dakika ısıtma işlemlerinin yapılması ile enfeksiyon yeteneği azalır veya yok olur. Kaynatılmış ve şişelenmiş suların kullanması ve sebzeleri iyice yıkadıktan sonra pişirilerek tüketilmesi özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyon riskini azaltmaktadır. Tuvalete gidildikten sonra ve ishalleri

hayvanlara dokunduktan ve toprakla (bahçe işleri dahi) temas ettikten sonra eller iyice yıkanmalı ve ishallerin herhangi bir rekreasyonel amaçlı kullanılan suyla temas etmemesi gerekmektedir. Hastalığın bulaşmasında önemli bir unsur olan yüzme havuzları, güvenlik için sürekli kontrol edilmeli ve kontamine suların yutulmamasına dikkat edilmelidir. Pastörize olmayan süt ve süt ürünleri veya meyve sularının içilmesinden kaçınılmalıdır (Murray ve ark, 2007).

2.2.Trichomonas vaginalis

2.2.1. Tarihçe

İlk kez Donne tarafından 1836 yılında vajinal akıntıdan izole edilerek *Trichomonas* olarak adlandırılmıştır. 1838 yılında Ehlrenberg tarafından *T. vaginalis* olarak adlandırılmıştır (Kuman ve Altıntaş, 1996). Koelliker ve Scanzoni 1855 yılında kadınlarda %50 oranında *T. vaginalis* enfeksiyonu görürken 1924 yılında Katsuma tarafından bir erkek idrarında *T. vaginalis* saptanmıştır. Ardından 1927'de Capek tarafından bir erkek üretrit vakası bildirilmiştir (Merdivenci, 1981).

2.2.2 Taksonomi

T. vaginalis'in taksonimisi aşağıda yer almaktadır (Schwebke ve Burgess, 2004).

- Domain: Eukarya
- Kingdom: Protista
- Subkingdom: Protozoa
- Phylum: Metamonada
- Subphylum: Mastigophora
- Class: Parabasilia
- Order: Trichomonadida
- Family: Trichomonadae
- Genus: *Trichomonas*
- Species: *T. vaginalis*

2.2.3. Morfoloji

2.2.3.1. Genel morfolojisi

Trichomonas vaginalis, yaşamını yalnızca insanda sürdürebilen ve kist formu olmayan tek hücreli kamçılı bir protozoondur. Trofozoit formu, yapı olarak armuta benzer bir şekilde olup, geniş kısımda kese şeklinde büyük ve oval nükleus ve içerisinde kromatin tanecikleri olan ve blefaroblast olarak adlandırılan yapı bulunmaktadır (Şekil 4) Blefaroblastların her birinden dörder adet kamçı çıkar ve gövdenin dışında serbest olarak hareket ederler. Beşinci kamçı, parazitin membranı boyunca aşağı doğru uzanır ve membran ile kamçı arasında dalgalı zar adı verilen bağlar oluşur (Altıntaş, 2002; Saygı, 2009; Honigberg, 2012). Bu zarın görevi, *T. vaginalis*' in kendi etrafında dönme hareketini sağlamaktır. Blefaroblasttan köken alan ve dalga zar boyunca uzanarak onu destekleyen kosta adı verilen bir yapı da bulunmaktadır. Nükleustan başlayıp parazitin sivri ucundan dışarı çıkan aksositil adı verilen bir oluşum bulunmaktadır (Şekil 4) Hastalardan izole edilen *T. vaginalis* trofozoitlerinin, bir yıllık kültürü yapıldıktan sonra aksositil uzunluğu ölçülmüş, yeni elde edilen *T. vaginalis* trofozoitlerinde ki aksositil uzunluğunun , kültür ortamından elde edilen trofozoitlerdekine oranla iki kat daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Cheon ve ark,2013). Bunun nedeni çevresel şartlara daha iyi adaptasyon sağlamaktır (Honigberg;2012, Cheon ve ark, 2013).

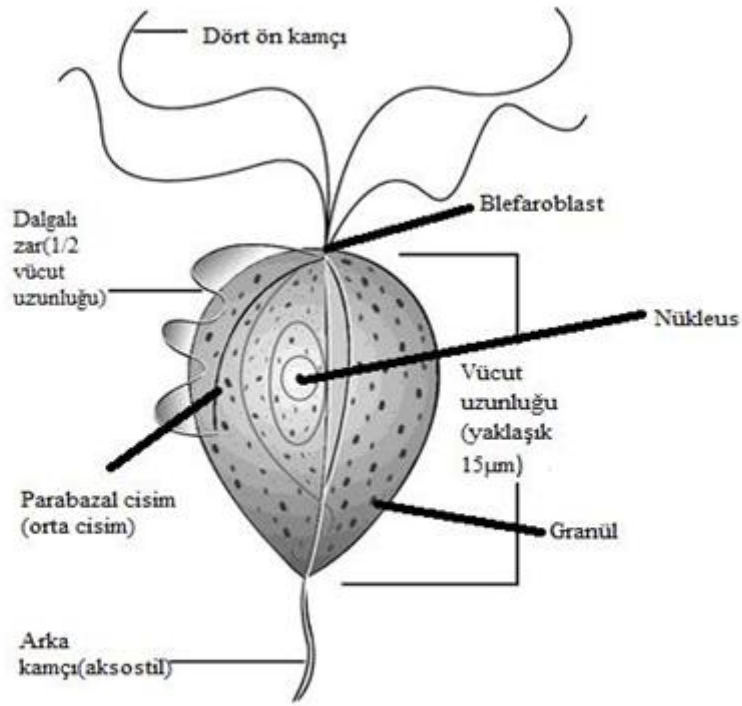
Aksositilin yanında mitokondri benzeri yapılar, nükleusla dalgalı zar arasında parabazal golgi cisimciği ve lif bulunmaktadır. Sitosom adı verilen bu yapı parazitin gıda alımını sağlayan yapıdır. (Kuman ve Altıntaş, 1996).

İnsan patojeni olarak bulunan *T. vaginalis* enerji üretimi için gerekli olan mitokondrilerden yoksundur. Bunun yerine, parazitte aksositil çevresinde ve sitoplazma içinde koyu renkli tanecikler halinde bulunan mitokondriyal benzeri hidrogenozomlar bulunmaktadır. 0,5-1 μ büyüklüğünde olan ve etraflarında çift membran bulunan hidrogenezomlar, *T. vaginalis* sitoplazmasında ki pirüvat metabolizmasında hidrojen molekülü oluşturarak ATP oluşumunda görev alır ve böylelikle parazitin enerji gereksinimi karşılanmış olur (Lindmark ve Müller;1973,1975).

Boyutları, 10-25 mikron boy ve 5-10 mikron eninde olan trofozoitler, dış etkenlere dayanıklı olmayıp, suda bir saat içinde ölmektedir. İdrarda 24 saat, kirli eşyalarda 6 saat canlı kalabilmektedir (Özcel ve Zeyrek, 2007).



Resim 1. *In vitro* kültürde Giemsa ile boyanmış trofozoit görünümü (Töz ,2011)



Şekil 4. *T. vaginalis* trofozoitinin şematik görüntüsü (Unat ve ark,1995).

2.2.4. Beslenme ve Hareket

T. vaginalis paraziti fagositoz ve pinositoz yoluyla besinlerini alır. 4,4 mikrometre boyutuna kadar olan, epitel hücreleri, bakteriler, sperm hücrelerini ve eritrositleri fagosite

edebilme yeteneğine sahiptir. *T. vaginalis* vajina pH' sını düzenleyen bakterileri fagosite ederek vajina pH'sının alkaliye dönüşmesine neden olur. Bu sayede parazit için daha uygun pH ortamı sağlanmış olur. Parazitin eritrositleri fagosite etmesi sonucunda açığa çıkan demir molekülü parazitin gelişimi ve patojenitesi açısından oldukça önemlidir (Öz, 2009).

T. vaginalis dalgalı zar yardımıyla kendi etrafında dönerek hareket etmekte ön kısımda bulunan kamçılarda bu hareketi hızlandırmaktadır (Heine ve McGregor, 1993).

2.2.5. Moleküler Yapısı

160 Mb boyutunda genoma sahip olan *T. vaginalis*, parazitik protistler içinde en büyük genoma sahip olanlardan biridir. *T. vaginalis* genomunda 59 672 protein kodlayan gen bulunmakta ve bunlardan yalnızca 65 tanesi intron içermektedir. Parazitin bağırsaktan ürogenital sisteme göçü ile birlikte çevresel değişimin sonucunda DNA içeriği ve hücre hacmindeki artışa paralel olarak genom büyümesinde olabileceği varsayılmaktadır (Özcel ve ark, 2009).

T. vaginalis suşları arasında protein, polisakkarit ve izoenzim profillerinde, klinik tablo ve metranidazol duyarlılığında farklılıklar gözlenmektedir. Bu farklılıkların parazitin biyolojik ve virulans farklılıklarına bağlı olabileceği varsayılmaktadır (Özcel ve ark, 2009).

T. vaginalis TVV adı verilen (*Trichomonas vaginalis* virüs) adı verilen çift sarmallı RNA virüsü barındırmaktadır. TVV, 33-200 nm boyutunda ikozahedral, lifli, silindirik ve küresel viral partikülleri içeren heterojen yapı olarak gözlenmektedir (Wang ve Wang, 1985; Benchimol ve ark, 2002). Klinik izolatlarda virüs varlığı yaklaşık %82 olarak saptanmaktadır (Wang ve Wang, 1985).

2.2.6. Virulans Faktörleri

2.2.6.1.Hücre penetrasyonu(sitoaderens)ndan sorumlu virulans faktörler

Parazitin insanlarda ürogenital sistem enfeksiyonu yapabilmesi için hücreye penetre olması şarttır (Lehker ve Alderete; 2000). Bu süreçte yalnızca yüzey proteinleri olan (adezinler) değil, aynı zamanda glikokonjugatlar, mikrotübül ve mikrofilament gibi hücre iskeletini oluşturan maddeler, laminin, fibronektin , kollajen gibi ECM proteinleri ve sinyal

iletimi ile otofaj süreçleri de görev almaktadır (Arroyo ve ark, 1992, 1993; Carlton ve ark, 2007).

T. vaginalis'te konak hücreye bağlanmayı sağlayan 5 adet yüzey proteini tanımlanmıştır (AP120,AP65,AP51, AP33 ve AP23)(Arroyo ve ark,1992). Bu adezinler trichomonadların içinde hidrogenozom ya da parazit yüzeyinde lokalize olmaktadır. Parazit epitelle temas ettiğinde, yüzeyden salınan adezyon proteinleri artar. Salınımları demir ile düzenlenen bu proteinler, farklı işlevler gösteren proteinler olarak tanımlanmışlardır. Bu yüzey proteinler, moleküler taklit yöntemiyle parazitin immun sistemden kaçmasını sağlamaktadırlar (Lehker ve Alderete, 2000).

Adezyondan sorumlu bir diğer virulans faktör ise laminindir. Laminin, epitelin alt tabakasında bulunan bir glikoproteindir. Laminin reseptörleri makrofaj, bakteri ve kanser hücrelerinde de bulunmuştur (Özcel ve Zeyrek, 2007). *Trichomonas* yüzeyinde D-Laktoz ve N-asetil-D-glikozamin gibi lektin bağlayan karbonhidratların eritrosit hemolizi, hedef hücre fagositozu ve ilaç duyarlılığında rol oynadığı bilinmektedir. Parazitin yüzeyinde bulunan lektinin de adezyonda rol aldığı bildirilmektedir (Petrin ve ark, 1998).

Sistein proteazlardan TvCP30 ve TvCP62, yüzey fosfoligkan (TvLPG) parazit yüzeyinde lokalize olup, trikomal hücre adezyonundan sorumludur (Arroyo ve Alderete, 1989,1995; Mendoza- Lopez ve ark, 2000; Hernandez ve ark, 2004). TvCP30 hücre adezyonuna katılır, immünojeniktir, trikomoniyaz hastalarında vajinal sekresyonlarda bulunur ve enfeksiyon sırasında vajinada bulunan pH ve sıcaklıklarda aktiftir. Bu sistein proteaz, vajinada bulunan fibronektin, kollajen IV ve hemogloblin gibi proteinleri degrade eder (Arroyo ve Alderete, 1989,1995; Mendoza- Lopez ve ark, 2000).

Bsp-A benzeri proteinler, lösince zengin tekrar bölgeleri içermektedir. Bakteriyel BspA lar konak epitel hücrelerine bağlanmada ve ECM proteinleri ile hücre agregasyonunda görev almaktadırlar. Noel ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada *T. vaginalis*' e ait Bsp-A proteinlerinin uzun süreli ürogenital enfeksiyonlarda ki hücre adezyonunda önemli rol oynadıkları saptanmıştır (Noel ve ark, 2010).

2.2.6.2. Sitotoksiste

Trikomal sitopatojenite çok aşamalı diğer süreçlere bağımlı bir olaydır. Bu mekanizma parazitin konak hücreye adezyonu ile başlar bunu sırasıyla, sitoliz, fagositoz c-ve hücrenin tek katmanının parçlanması ile devam eder. TVF , cell free *T. vaginalis* kültürlerinde bulunan 250 kDa büyüklüğünde olan ve hücreleri parçalamadan bir araya gelmelerini

indükleyen maddedir. Hücre ayrılma faktörü (CDF), ayrılmadan sorumlu bir glikoproteindir (200 kDa) ve ortama epitel hücreleri ile temasta olan *T. vaginalis* tarafından salgınır. Porin, Fosfolipaz A2 ve yüzeyde bulunan sistein proteazlar (TvCP12, TvCP39, TvCP65) da sitotoksik etki gösterirler (Lubick ve Burgess; 2004). TvCP39 ve TvCP65 Trikomoniyaz hastalarının vajinal sekresyonlarında bulunan kollajen IV ve fibronektini degrade eden ve ekspresyonları için poliamine gereksinim duyan immünejenik karakterdeki sistein proteazlardır (Alvarez- Sanchez ve ark, 2008; Ramon-Luing ve ark, 2011).

TvCP39 ve TvCP65, vaginal sekresyonlarda bulunan, enfeksiyon sırasında vajinada bulunan pH ve sıcaklıkta aktif olan, Coll IV ve Fn gibi vajinal ortamın proteinlerini bozan, ekspresyonu için poliamin gerektiren hastalarda immünojeniktir ve demir ile çinko tarafından regüle edilirler.

2.2.6.3. Hemoliz

T. vaginalis için eristrositler, lipit ve demir gibi önemli moleküllerin kaynağı olarak kullanılmaktadır (Lehker ve ark, 1990). Beta hemolitik aktivite yeni alınan *T. vaginalis* izolatlarında virulans faktörlerle ilişkilidir. Bu virulans faktörler arasında, yüzey sistein proteazları (TvCP30, TvCP4), gözenek oluşturucu proteinler, fosfolipaz A2 ve triasil gliserol lipaz (TvLIP) bulunmaktadır (Arroyo ve Alderete, 1995; Lubick ve Burgess, 2004).

2.2.6.4. Apoptozis

In vitro ortamda, *T. vaginalis*' in neden olduğu hücre ayrılması ve yıkımını göstermek amacıyla vajinal epitel hücre kültürü kullanılmış ve kütle spektrometresi yöntemiyle analiz yapılmıştır. Sonuçta 30 kDa boyutuna kadar olan sistein proteazların (TvCP2, TvCP3, TvCP4 Ve TvCPT) apoptozisi indüklediği ve hücre tahribatına neden olduğu saptanmıştır. Söz konusu bu sistein proteazlar demir iyonuna bağlı olarak düzenlenmektedir. (Kummer ve ark, 2008).

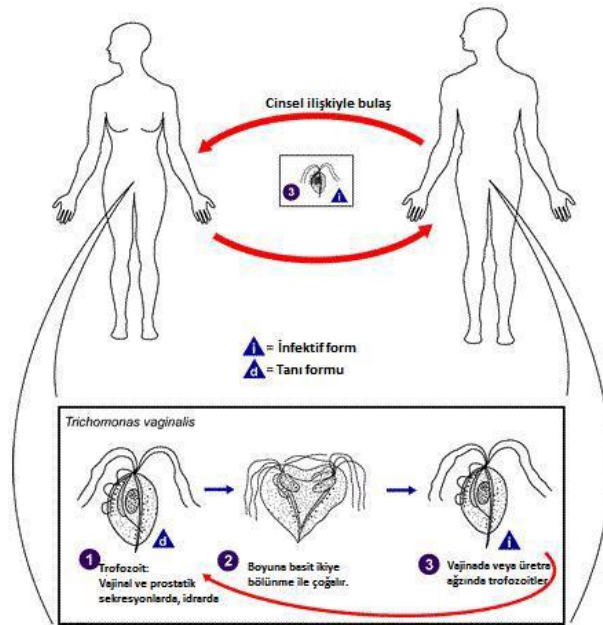
2.2.6.5. İmmun sistemden kaçış

T. vaginalis kaynaklı kronik vajinal enfeksiyonlarda, parazit mikroçevreyi değiştirme ve konak immün sisteminden kaçma yollarını kullanmaktadır. İmmün sistemden kaçış farklı yöntemlerle olmaktadır. (Figuroa- Angulo ve ark, 2012) *T. vaginalis*' te bulunan proteinazlar

yardımıyla konak immunoglobulinlerin degradasyonu yapılmaktadır. Bu yöntemde parazitte bulunan sistein proteazlar ve metalloproteinazlar önem kazanmaktadır. 60 kDa (TvCP60) ve 39 kDa (TvCP39) büyüklüğünde olan sistein proteazlar, immunoglobulin ve hemoglobulini degrade ederek hem immun sistemden kaçabilmeyi hem de parazit için gerekli olan besinin elde edilmesini sağlarlar(Lehker ve Alderete, 2000).

2.2.7. Yaşam Döngüsü

Kamçılı bir protozoon olan *T. vaginalis* monoksen bir parazittir ve konağı insandır. Konak zinciri insan-insan şeklinde olmaktadır. Hastalık belirtisi göstermeyen kişiler bu parazit için taşıyıcı konumundadır. Kist şekli olmayan *T. vaginalis* trofozoit formuyla insanlarda enfeksiyon oluşturmaktadır (Saygı, 1998; Polat ve ark, 2011). Trofozoit formu insandan insana genellikle cinsel ilişkiyle bulaşmakta olup nadiren kontamine eşyalarla da bulaş görülebilmektedir (Saygı, 1998). Trofozoit organa yerleştikten sonra burada ikiye bölünerek çoğalır. Bölünme esnasında yeni oluşan protozoalarda ikişer adet kamçı bulunur. Dalgalanan zar, kosta, parabazal cisim ile aksostil bir hücrede kalmaktadır. Yeni oluşan hücrelerdeki eksik organeller blefaroblasttan çıkarak tamamlanmaktadır (Şekil 5) (Özcel ve Zeyrek, 2007).



Şekil 5. *Trichomonas vaginalis*'in yaşam döngüsü (WEB2 ,2019)

2.2.8. Epidemiyolojisi

Dünya da birçok ülkede cinsel yollarla bulaşan hastalıklar bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. *T. vaginalis* enfeksiyonları kozmopolit bir dağılıma sahiptir, tüm ırksal ve sosyoekonomik gruplarda tespit edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre her yıl yaklaşık 250 milyon *T. vaginalis* enfeksiyonu saptanmakta ve bunun da yarısından fazlasının erkeklerde görüldüğü bildirilmektedir (WHO, 2019). Buna karşılık, yaygın *T. vaginalis* vakalarının% 89'u kadınlar arasında bulunmaktadır (WHO, 2019). Erkekler ve kadınlar arasındaki biyolojik farklılıklar, *T. vaginalis* enfeksiyonunun görülme sıklığı ve prevalansındaki farklılıkları sağlamaktadır. Kliniğe başvuran kadınlar arasında, gebelerde, AIDS' li hastalarda ve çok eşlilerde yüksek oranda *T. vaginalis* saptanmaktadır. Bu enfeksiyonun yaygın görülmesinin nedenleri arasında, gelişmekte olan ülkelerde cinsel eğitim programlarının yetersizliği, cinsel ilişki yaşının küçülmesi, evlilik öncesi cinsel ilişki, seyahat imkanlarının yagınlaşması, cinsel davranışlarda ki değişiklikler, kondom dışı doğum kontrol yöntemleri ve parazitlerin antibiyotiklere direnç geliştirmesi ile tedavi de yaşanan güçlükler yer almaktadır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, kullanılan yöntemlerin farklılığına bağlı olarak *T. vaginalis* görülme sıklığı %3-72,3 arasında değişmektedir (Aksoy ve Özkoç, 2005). Ertabaklar ve arkadaşlarının Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi' nde 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada kadın hastalıkları ve doğum polikliniğine vajinal akıntı şikayeti ile başvuran 220 hastada yaptıkları inceleme sonucunda; direkt mikroskopi yöntemiyle 12 (%5,45), kültür yöntemi ile 16 (%7,27) *T. vaginalis* saptanmıştır (Ertabaklar ve ark, 2004). Ankara'da 2004 yılında yapılan ve nonspesifik vajinal akıntısı olan hastaların jinekolojik muayenesi sırasında 114 adet vajinal akıntı örneği alınmış ve *T. vaginalis* sıklığı direkt mikroskopik bakı ve kültür yöntemleri ile incelenmiştir. Sonuçta incelenen örneklerin 8' inde (%7) *T. vaginalis* tespit edilmiştir (Akarsu, 2006). Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde Selvitopu ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada, 61 hastadan vajinal sürüntü örnekleri alınmış ve ikisinde (%3,2) *T. vaginalis* saptanmıştır (Selvitopu ve ark, 2006). 2006 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran 275 hastanın vajinal sürüntü örnekleri *T. vaginalis* açısından değerlendirilmiş ve sonuçta 6 (%2,18) hastada parazit saptanmıştır (Çulha ve ark, 2006). 2006-2008 yılları arasında Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran 273 hastadan arka fornixten vajinal sürüntü örneği alınmış, DNA hibridizasyon, nativ lügol ve Giemsa boyama yöntemleri ile

incelenmiştir. Sonuçta nativ boyama yöntemi ile, 18(%7,6), Giemsa boyama yöntemi ile 17(%7,2) ve DNA hibridizasyon yöntemi sonucunda ise 19 (%8) örnekte parazit varlığı saptanmıştır (Akdemir ve ark, 2010). 2011 yılında Sivas Devlet Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğinde vajinit ön tanımlı hastalardan alınan 258 vajinal sürüntü örneği, *T. vaginalis* varlığı açısından direkt mikroskopi ve kültür yöntemiyle incelenmiştir. Sonuçta direkt mikroskopi incelemesinde 5 (%1,9) ve kültür yönteminde ise 4 (%1,5) örnekte parazit açısından pozitiflik saptanmıştır (Değerli ve ark,2011). Ertabaklar ve arkadaşlarının Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları başka bir çalışmada , 102 vajinal sürüntü örneğinin üçünde DM ile (%2.94), beşinde TYM besiyeri (%4.90) ile ve beşinde PCR yöntemi (%4.90) ile *T. vaginalis* saptamışlardır (Ertabaklar ve ark, 2011). 2011 yılında Ankara' da Polat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 114 hastanın , direkt mikroskopi ile 8' inde (%7) ve direkt bakı ile kültür yöntemlerinin ikisi birlikte kullanılarak yapılan incelemede ise 13'ünde (%9) parazit saptanmıştır (Polat ve ark, 2011).

2.2.9. Patogenez ve trikomoniyaz

Trikomoniyaz, cinsel yolla bulaşan ve tedavi edilebilen en yaygın paraziter hastalıktır. Yenidoğanlarda pnömoniye sebep olabileceği bildirilmiştir (Özcel ve Zeyrek, 2007). Enfeksiyon oluşturma ve hastalığın şiddeti, konağa ve parazite ait faktörlerle ilişkilidir. Enfeksiyon, kadınların yaklaşık %85' inde erkeklerin ise %77'sinde semptomatik seyretmektedir. Asemptomatik olan hastaların üçte biri altı aylık süreçte semptomatik hale gelmektedir (Petrin ve ark, 1998). Hastalığın semptomatik seyrettiği bireylerde üretral akıntı ve idrar yolları enfeksiyonu görülmektedir. Kadınlarda vajinal bölgede kötü kokulu, sarı- yeşil renkte akıntı, kaşıntı, vulvada tahriş ve karın ağrısı görülebilmektedir. *T. vaginalis* epitel hücreleri fagosite ettiğinden, genital sistem içinde iltihaplanmalara yol açmakta ve vajina sıvısı içinde polimorfonükleer lökositlerin sayısının yükselmesine neden olmaktadır. Bu durum *T. vaginalis'* in tanısına yardımcı olabilmektedir (Öz ve ark, 2000).

T. vaginalis gelişebilmek için vajina florasını bozmakta ve florada bulunan *Lactobacillus acidophilus* bakterilerinin gelişimini olumsuz etkilemektedir. Bunun sonucunda, vajina pH değeri alkaline doğru değişmekte ve vajina mukozasında yangı oluşmaktadır. Vajinit olarak adlandırılan klinik tablo meydana gelmektedir. *T. vaginalis* 'in neden olduğu çilek serviks (*Coplitis macularis*) durumu parazitle enfekte kadınların yaklaşık %2' sinde görülmektedir. Parazitin neden olduğu diğer komplikasyonlar arasında, adnekslerin

(yumurtalıklar, fallop tüpleri) ,endometrium ve Skene ile Bartholin bezlerinin enfeksiyonları yer almaktadır (Walner- Hanssen ve ark, 1989).

T. vaginalis erkeklerde, epididimite, prostatite neden olmakta ve sperm hareketliliğini azaltabilmektedir. Semptomatik erkek hastalarda üretral akıntı sıklıkla görülmektedir. Trikomonyaz erkeklerin %95'inde idrar yolu enfeksiyonu ile kendini göstermekte ve 8-30 gün süren kuluçka döneminin ardından ortaya çıkmaktadır (Özcel ve ark,2007). İnfertilite, pelvik inflamatuvar hastalık, servikal ve prostat kanseri gibi komplikasyonlara da neden olabildiği bildirilmektedir (Ibanez-Escribano ve ark, 2014).

2.2.10. Tanı

Trikomonyaz, bakteriyel vajinite benzemekte ve pek çok olguda semptomsuz olarak seyretmektedir. Bu yüzden *T. vaginalis* tanısı zor olabilmektedir (Stemmer ve ark, 2012). *T. vaginalis* tanısında en güvenilir yöntem parazitini görülmesiyle olmaktadır. Tanı, direkt veya indirekt yöntemlerle yapılabilir (Rein, 2000).

2.2.10.1. Direkt mikroskopik inceleme

Vajinal akıntı, idrar sedimenti , prostat akıntısı gibi örneklerden alınan bir damla örnek bir miktar serum fizyolojik ile karıştırılıp üzerine lamel kapatılarak direkt mikroskop altında incelenebilmektedir. 22C°altındaki sıcaklıklarda parazit motilitesi azalmakta ve direk mikroskopide negatif sonuç verebilmektedir. Preparat üzerine eklenen %5'lik paraamino salisilik asit hareketsiz haldeki parazitleri harekete geçirmek için kullanılabilir. Direk mikroskopi yönteminde duyarlılık %40-70 arasında değişebilmektedir (Stemmer,2012).

2.2.10.2. Boyama

Örnekler yayma yapıp, tespit edildikten sonra Giemsa boyaması yapıldıktan sonra immersiyon objektifiyle inceleme yapılabilir. Bunun dışında May Grünland, Gram ya da Papanicolaou boyama yöntemleri de kullanılabilir. Boyama sonucunda parazitini, kamçı, nükleus, aksostil gibi organelleri kolaylıkla ayırt edilebilir.

2.2.10.3. Kültür

T. vaginalis tanısında kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu amaç için kadın hastalardan arka fornixten alınan vajinal sürüntü veya genital akıntı ile erkek hastalardan alınan üretral sürüntü veya idrar sediment örnekleri kullanılmaktadır. *T. vaginalis* kültürleri yapılırken, Modifiye Diamond (MD), CPLM (Laktoz, Sistein, Karaciğer tozu veya ekstresi, Maltoz) Besiyeri ve Trypticase-Yeast Extract Maltose (TYM), VF Diamond besiyerleri kullanılmaktadır. *T. vaginalis*'te kültür yönteminin duyarlılığı %95'lere ulaşmaktadır (Öncel ve Zeyrek, 2007).

2.2.10.4. Serolojik testler

T. vaginalis tanısında serolojik testlerden pek yararlanılmamaktadır. Asemptomatik olgularda, parazitin görülmediği durumlarda, epidemiyolojik çalışmalarda serolojik testlerden yararlanılabilmektedir. Parazitin tanısında, çeşitli yöntemlerle hazırlanan antijen ile insan kan serumundaki *Trichomonas* antikorlarını aramak için kullanılan indirek hemaglutinasyon (IHA), indirek flüoresan antikor testi (IFAT), Direk flüoresan antikor testi (DFAT) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılmaktadır (Öncel ve Zeyrek, 2007).

2.2.10.5. Hızlı tanı kitleri

Trichomonas antijenlerini veya nükleik asitlerini aramaya yönelik olan ve 10-60 dakika arasında sonuç veren testler geliştirilmiştir (Hobbs ve Sena, 2013). *Trichomonas* antijenlerine yönelik olan; OSOM *Trichomonas* Rapid Test (Sekisui Diagnostics, ABD) ve Kalon Tv Lateks Aglutinasyon Testi (Kalon Biological, İngiltere) ile nükleik asit taramaya yönelik olan Affirm VPIII (Becton Dickinson, ABD) kullanılmaktadır. Bu hızlı tanı kitlerinin duyarlılıkları %40-95 arasında değişirken, seçicilikleri yüksektir (%92-100) (Suud ve Kapil, 2008).

2.2.10.6. Moleküler testler

Moleküler tanı yöntemleri parazitin direkt mikroskopi ile görülmemesi, parazit sayısının az olması, serolojik testlerde oluşabilecek çapraz reaksiyon nedenleriyle tercih edilmektedir. Moleküler tanı yöntemlerinin temelini, parazit nükleik asitlerinin aranması ya

da varlığı oluşturmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri arasında ise en bilineni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dur. Bu yöntem sayesinde parazitin, genetik tiplendirmesi, karakterizasyonu, tanınması, klinik teşhisi ve filogenetik analizi yapılabilmektedir (Monis ve ark, 2002). PCR yönteminde parazitin tek bir nükleik asiti bile yeterli olabilmektedir (Bardaker ve Yenidünya, 2010). PCR yönteminin duyarlılığı ve seçiciliği oldukça yüksektir ve parazitin tanısına, rekombinant teknoloji ile aşı geliştirilmesine, immünoloji ve konak-parazit etkilerinin araştırılmasına, sekans analizlerine olanak sağlamaktadır.

2.2.11. Tedavi

Trichomaniasiste eşlerin birlikte tedavi edilmesi gerekmektedir. Nitroimidazol türevi ilaçlar trichomaniasis tedavisinde kullanılan en etkili ilaç grubudur. Günümüzde parazitin tedavisine yönelik standart, 7 gün boyunca metranidazol uygulanması şeklinde olmaktadır. Metranidazol parazite diffüzyon yoluyla penetre olmakta ve hücre içinde serbest radikallere dönüşerek hücre DNA'sına bağlanmaktadır. DNA replikasyonu ilaç sayesinde duracağından hücre ölümleri meydana gelmektedir. Metranidazolün yanı sıra tedavide seknidazol, tinidazol, ornidazol ve warfarinde kullanılmaktadır. Amfoterisin B türevi olan ve Hindistan'da kullanılan hamisin adı verilen organik bir bileşiğin metronidazol dirençli olgularda etkili olduğu bildirilmektedir (Aksoy ve Özkoç, 2005). Tedavi gerçekleştikten 3 ay sonra hastalar tekrar kontrole çağrılarak reenfeksiyon açısından incelenmelidir (WEB3, 2018).

Trikomoniyaz olgularında, 1962'den beri metronidazole direnç gelişimi bildirilmektedir (Poppe, 2001). *T. vaginalis* izolatlarının %2,5-5'inin metronidazole karşı değişen derecelerde direncin olduğu rapor edilmiştir (Schwebke ve Burgess, 2004).

2.3. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının su varlığında parçalanmasını katalize eden enzimlerdir. Proteazlar uzun amino asit dizilerini fragmentlere ayırarak bütün proteinlerin sentezinde, büyüklüklerinin kontrolünde, kompozisyonlarında, şekillerinde, döngülerinde ve son yıkılımları için gerekli olan fizyolojik süreçte rol oynarlar (Seife, 1997). Proteinlerin dönüşümü sentezini ve aktivasyonunu kontrol eden proteazlar; organizmaların doğumundan ölümüne tüm fizyolojik süreçlerinde görev alırlar (Poorman ve ark, 1991).

Proteazların canlıların yaşamları boyunca düzenleyici rollere sahip olmasından dolayı hastalıklara karşı geliştirilen terapötik ajanlar için potansiyel bir hedef olmuştur. Proteazlar, metabolik süreçlerde görev aldıkları gibi endüstride de yaygın olarak kullanılmakta tüm enzim satışlarının %60' ını oluşturmaktadırlar (Gupta ve ark, 2002).

2.3.1. Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, katalizledikleri reaksiyon tipi, katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve yapılarıyla ilgili evrimsel ilişkilerine göre 3 ana kriterle sınıflandırılmaktadır.

1. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre:

1.1. Ekzopeptidazlar

1.1.1. Aminopeptidazlar

1.1.2. Karboksipeptidazlar

1.1.2.1. Serin tipi

1.1.2.2. Sistein tipi

1.1.2.3. Metallo tipi

1.2. Endopeptidazlar

1.2.1. Serin proteazlar

1.2.2. Sistein proteazlar

1.2.3. Aspartil proteazlar

1.2.4. Metallo proteazlar

2. Aktif bölgedeki fonksiyonel gruplara göre:

2.1. Serin proteazlar

2.2. Sistein proteazlar

2.3. Aspartil proteazlar

2.4. Metallo proteazlar

3. Kaynağına göre

3.1. Bitkisel proteazlar

3.2. Hayvansal proteazlar

3.3. Mikrobiyal proteazlar

2.3.1.1. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar

Proteazlar etki yerlerine göre; substratın amino yada karboksil ucuna yakın peptid bağlarını ayıran ekzopeptidazlar ve peptid zincirinin N- ve C- uçları dışında zincirin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki eden endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.3.1.1.1.Ekzopeptidazlar

Substrat karbonil ucunu katalizleyen karboksipeptidazlar ve amino ucunu katalizleyen aminopeptidazlar olmak üzere iki grupta incelenmektedirler.

A) Aminopeptidazlar; Sindirim, protein bağlanması, sinyal iletimi, peptid hormonlarının regülasyonu gibi fizyolojik ve patofizyolojik işlevlere sahiptirler. Genellikle nötral pH' larda aktif olup, optimal çalışma sıcaklıkları 37-50 C° arasında değişmektedir (Raksakulthai ve Hard;2003).

B) Karboksipeptidazlar: Polipeptid zincirinin karboksil ucunda bulunan son peptid bağından bir önceki peptid bağına hidroliz ederler. Karboksipeptidazlar (CP) kendi aralarında serin tip, metalloproteaz, sistein tip, dipeptidil dipeptidaz ve dipeptidaz olarak alt sınıflara ayrılmaktadır (Duran ve ark,2007).

2.3.1.1.2. Endopeptidazlar

Amino ve karboksil uçlarından uzak polipeptid zincirinin daha iç bölgelerinin peptid bağlarındaki işlevleriyle karakterize edilirler. Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına göre serin proteaz, aspartik proteaz, sistein proteaz, metalloproteaz olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır (Rao ve ark,1998).

2.3.1.2. Aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar

2.3.1.2.1. Serin proteazlar

Serin proteazlar, aktif merkezlerindeki serin grubunun varlığıyla karakterize edilirler ve tüm organizmalarda bulunurlar.

2.3.1.2.2. Aspartil proteazlar

Asidik proteazlar olarak bilinen aspartil proteazların katalitik aktiviteleri aspartik asit kalıntılarına bağlıdır. Bitki, bitki virüsleri ve retrovirüslerde bulunurlar. Asidik proteazların doğada bulunabilirlik oranları serin proteazlara göre daha azdır.

2.3.1.2.3. Metallo proteazlar

Metallo proteazlar katalitik tür yönünden proteazların en farklısidir. Diğer proteazlardan protein dizilimleri ve yapılarıyla ayrılmalarının yanı sıra aktiviteleri için çinko iyonuna gereksinim duymalarıyla karakterize edilirler. Bazı durumlarda, çinko, kobalt veya nikel gibi metallerle aktivitesini kaybetmeden yer değiştirebilirler (Salleh ve Basri, 2006).

2.3.1.2.4. Sistein proteazlar

Ökaryot ve prokaryotlarda bulunan sistein proteazlar 20 alt sınıfa ayrılırlar. Aktiviteleri histidin ve sistein içeren katalitik triada bağlıdır. Sistein ve histidin kalıntılarının sırası (Cys-His veya His-Cys) familyalar arasında farklılık gösterir. Genelde sistein proteazlar HCN veya sistein gibi indirgeyici ajanların varlığında aktiftir Papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik asite özgü olanlar ve diğerleri olmak üzere yan zincirlerine göre 4' e ayrılırlar. Papain sistein proteazların en bilinenidir.

Sistein proteazların en uygun çalışması nötral pH'da olmaktadır (Rao ve ark,1998). Papain benzeri birçok sistein proteazlar molekül ağırlığı 20–35 kDa olan bağlı olarak küçük proteinlerdir.

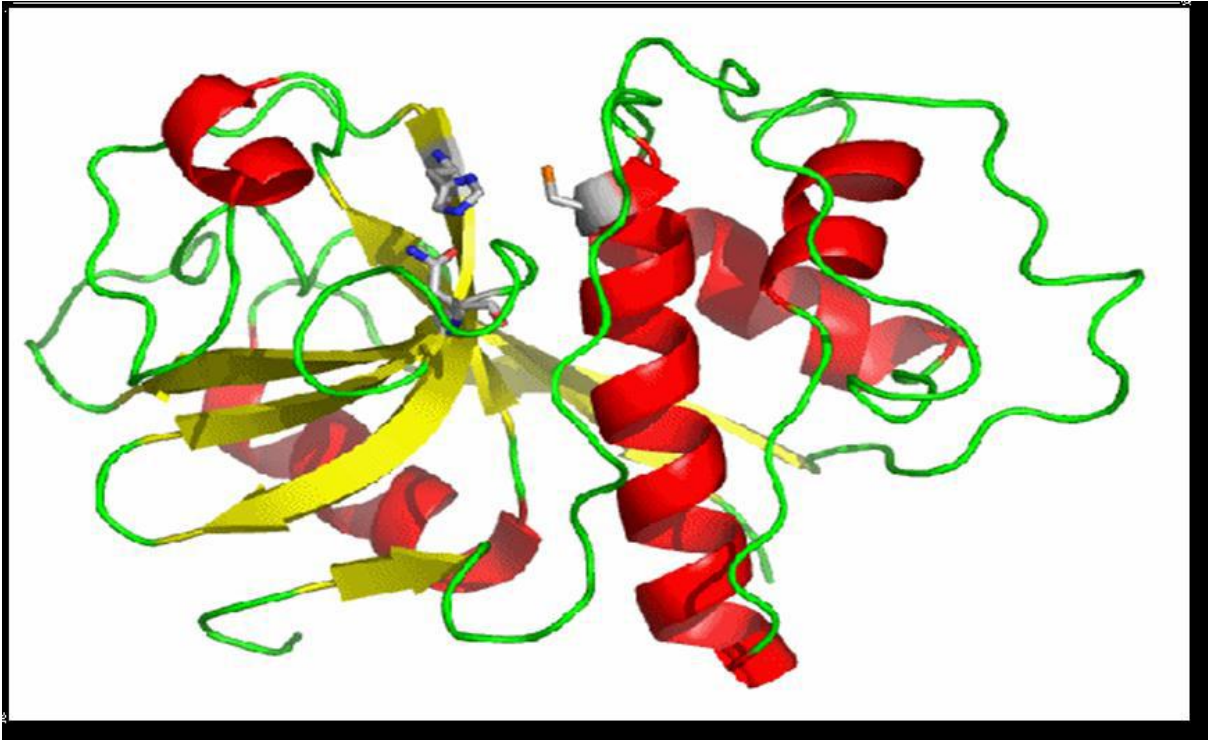
2.3.1.3. Kaynağına göre proteazlar

Proteazlar, farklı fizyolojik fonksiyonları yerine getirirler ve bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilirler (Rani ve ark, 2012).

2.3.1.3.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar

Bitki proteazları; kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve, tohum, reçine ve lateks gibi bitkinin hemen hemen her yerinde bulunmaktadır. Bitkilerde sistein ve serin endoproteazları yaygın

olarak bulunmakta aspartik proteaz ve aminopeptidaz ise nadiren bulunmaktadır (Mahajan ve Badgujar, 2010). Bitkisel proteazlar arasında en çok bilineni *Carica papaya* lateksinden elde edilen papaindir. Resim 2’de papain enziminin 3 boyutlu yapısının gösterimi yer almaktadır.



Resim 2. Papain enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi (WEB4,2019).

2.3.1.3.2. Hayvansal kaynaklı proteazlar

Hayvansal kaynaklı proteazların en yaygın olanları ve en bilinenleri pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennindir (Kooi ve Sokol, 1996). Sadece arjinin ve lizin tarafından karboksil gruplarıyla sarılan protein moleküllerindeki peptid bağlarına karşı aktif olan tripsin üç temel sindirim enzimlerinden biridir. (Rani ve ark, 2012). Kimotripsin memelilerin bağırsaklarında aktif olan proteolitik bir enzim iken, pepsin hemen hemen tüm omurgalıların midesinde bulunan asidik bir enzimdir (Binnie ve ark,1995; Rao ve ark, 1998).

2.3.1.3.3. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar

Dünya enzim gereksinimlerinin yaklaşık üçte ikisi mikrobiyal proteazlardan karşılanmaktadır (Kumar ve Takagi, 1999; Mahajan ve Badgujar, 2010).

Mikroorganizmalar proteazları hücre içi ve/veya hücre dışı olarak üretebilmektedir. Hücre içi proteazlar sporlanma ve farklılaşma, enzimler ve hormonların olgunlaşması gibi çeşitli hücrel ve metabolik süreçler için önemlidir. Hücre dışı proteazlar hidrolitik ürünlerden yararlanmak ve hücre çevresindeki proteinlerin hidrolizi için önemlidir. Aynı zamanda çeşitli endüstriyel işlemlerde protein yıkımına yardımcı olması açısından da önemlidir (Kumar ve Takagi, 1999).

Proteazlar, hemen hemen her biyolojik süreçte anahtar rol oynayan geniş, çeşitli ve her yerde bulunan enzim gruplarıdır. Proteazların pek çok kullanım alanının olmasının yanı sıra çoğu hastalık içinde tedavi edici ajan olarak kullanılma potansiyelleri vardır (Stoch ve Wagner, 2008).

2.3.2. Parazitik Protozoonlarda Bulunan Sistein Proteazlar

Patojenik protozoonlarda bulunan sistein proteazlar, genellikle Clan CA sınıfının C1A ailesinde (papain süperailisi) yer alırlar ve bu organizmalarda ana virulans faktörleri veya potansiyel ilaç hedefleri olarak görülürler (McKerrow ve ark, 2008)

Proteazların canlı hücre metabolizmasındaki esas fonksiyonu, hidrolizi gerçekleştirmeleridir. Proteazlar basitçe bozucu enzimler olarak adlandırılmaktadırlar. Çoğu proteaz belirli bir hücre ya da organizmada spesifik fonksiyonları yerine getirir ve organizma için gereklidir. Proteazlar ile daha ayrıntılı çalışmaların yapılması sonucunda, aktivitelerini düzenleyen kontrol mekanizmaları olduğu da saptanmıştır (McKerrow ve ark, 2008)

2.3.2.1. *Cryptosporidium parvum*' da sistein proteazlar

Sistein proteazların (SP'ler) klan CA (papain benzeri) ailesi, *Apikompleksan* ve *Kinetoplastidler* de dahil olmak üzere birçok protozoon parazit için önemli bir enzim ailesidir. Sistein proteazlar hücre invazyonunu, konak proteinlerin besleyici degradasyonunu ve yaşam döngüsünün çeşitli safhalarında parazit proteinlerinin modifikasyonunu kolaylaştırırlar (McKerrow ve ark, 1993, 2006).

MEROPS' ta klan CA ' ya ait tanımlanan *C. parvum* parazite ait 20 farklı proteaz bulunmaktadır ve bu proteinlerin deneysel olarak karakterizasyonu tam olarak yapılmamıştır Cryptopainler, *C.parvum* genomunda tanımlanan katepsin-L benzeri klan CA (alternatif bir terminolojiye göre CpaCATL olarak adlandırılır) ailesinde yer alan ve sporozoit safhada eksprese olan proteazlardır (Abrahamsen ve ark, 2004; Caffrey ve Steverding; 2009; Na ve

ark, 2009). Cryptopain 1 CryptoDB veritabanında cgd6_4880 olarak bulunmaktadır. Bunun yanı sıra cryptopain 2 ve 3 olarak adlandırılan diğer iki cathepsin L benzeri enzim ise sırasıyla cgd3_680 ve cgd7_2850 olarak bulunmaktadır (Heiges ve ark, 2006). *C. parvum*'daki sistein proteaz aktiviteleri parazitin birkaç gelişim evresinde tanımlanmıştır. Bu enzimlerin biyolojik ve biyokimyasal özellikleri tam olarak bilinmemesine rağmen, parazitin eksistasyon ve konak hücre istilasıyla ilişkili olabileceği varsayılmaktadır (Nesterenko ve ark, 1995). *Cryptosporidium* sistein proteazlarının karakterizasyonunun tam olarak yapılması parazit biyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı gibi kriptosporidiosis tedavisinde de kemoterapötik hedefler olarak daha ayrıntılı incelenmesi için gereklidir (Na ve ark, 2008).

Cryptopain-1 401 amino asit tarafından kodlanan 1206 bp'lik bir diziden oluşmaktadır. Kathepsin L benzeri sistein proteazlarının karakteristiği olan modifiye edilmiş ERFNIN ve GNFD motifleri, enzimin pro-domaininde tanımlanmıştır. Tiyolatimidazolyum'un stabilizasyonu için çok önemli olan Q(glutamin), C(sistein), H(histidin), N (asparajin)ve W(triptofan) kalıntıları, iyon çifti veya geçiş halleri iyi korunmuştur. Buna ek olarak üçüncül yapının olması için kritik, disülfür köprüleri oluşturan 6 sistein kalıntısı da iyi korunmuştur (Na ve ark, 2008).

Cryptopain-1 , maksimum pH 6.5'te geniş bir pH aralığında (pH 5.5 - 7.0) aktivite göstermektedir. Enzim, nötr pH'larda nispeten daha kararlı iken, asidik koşullarda nispeten kararsızdır. (Na ve ark,2008). Cryptopain-1'in substrat özgülüğü birkaç florojenik peptid substratı ile karakterize edilmiştir. Cryptopain-1 katepsin substratı olan Z-FR-MCA ve Z-LR-MCA'yı hidrolize ederken Z-RR-MCA'ya karşı aktivite göstermemiştir.

Cryptopain-1'in biyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir ancak *C. parvum*'un sporozitlerinde cryptopain-1'in muhtemel rolünü tespit etmek için immunofloresans analizleri yapılmaktadır. Cryptopain-1; parazitin sporozoit, merozoit ve ookist formlarında bulunmakta, ancak trofozoit formunda bulunmamaktadır. Konak hücre dışı matriks unsurları olan, fibronektin ve kollajeni hidrolize etmekte olduğu Western blot analizi ile ortaya konmuştur. Cryptopain-1' in bu özellikleri ; konak hücre invazyonunda önemli bir enzim olabileceğinin kanıtıdır (Na ve ark, 2008).

Proteazlar, tüm organizmalardaki çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır, ancak faaliyetlerinin sıkı düzenlenmesi de esastır. Proteaz aktivitesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesinden spesifik inhibitörlerin sentezine kadar uzanan çeşitli seviyelerde düzenlenebilmektedir. Proteolitik enzimlerin endojen protein inhibitörleri, organizmalardaki normal fizyolojik proseslerin hassas regülasyonunda endojen proteazların aktivitelerini düzenleyerek ve organizmaları eksojen proteazların zararlı etkilerinden

koruyarak önemli rol oynamaktadır (Laskowski ve Kato, 1980; Kang ve ark, 2012). Chagasın benzeri ailenin (MEROPS ailesi I42) sistein proteaz inhibitörleri (SPİler) son zamanlarda 11-15 kDa'lık düşük molekül ağırlıklı küçük proteinler olarak tanımlanmaktadır (Monteiro ve ark, 2001; Rigden ve ark, 2002). SPİ'ler birbiriyle oldukça düşük sekans özdeşlikleri sergilemekte ve sistatinler, tiyropinler ya da daha önce tanımlanmış herhangi bir başka sistein proteaz inhibitörü ile önemli bir dizi benzerliği göstermemektedirler (Rigden ve ark, 2002).

İlk tanımlanan SPİ, *T. cruzi*'de bulunan cruzipain inhibitörüdür. Bu SPİ, cruzipain'e sıkıca bağlanmakta, parazit farklılaşmasında ve memeli konak hücrelere invazyon için gerekli olan cruzipain'in endojen aktivitesini düzenlemektedir (Monteiro ve ark, 2001; Santos ve ark, 2005, 2006). Bu proteinlerin biyolojik fonksiyonları tam olarak anlaşılacakla birlikte, kendi endojen sistein proteazlarının yanı sıra, konak-parazit etkileşiminde olası rollerini öne süren papain ve memeli katepsin B ve kathepsin L'yi etkili bir şekilde inhibe ettikleri düşünülmektedir.

C. parvum'da bulunan sistein proteaz inhibitörü cryptostatin olarak adlandırılmıştır. Cryptostatin 173 amino asidi kodlayan 537 bp uzunluğunda ve 19,7 kDa büyüklüğünde ki küçük bir moleküldür. Dizi karşılaştırma algoritması (Sinyal P) kullanılarak, *Cryptostatin* 'in tipik bir N terminal sinyal peptid sekansının olduğu ve chagasıninkinden çok daha uzun bir N-terminal bölümü içerdiği saptanmıştır (Kang ve ark, 2012). Cryptostatinde chagasın ailesinde bulunan sistein proteaz inhibitörlerinde muhafaza edilen (NPTTG, GXGG ve RPW / F motifleri) ve chagasın bağlanma bölgelerinde (sırasıyla 2, 4 ve 6 döngüleri) bulunan hedef enzimlerin oluşması için gerekli olan üç karakteristik motif bulunmuştur. Diğer apikompleksan parazitlerden olan *Toxoplasma gondii* (toxostatin-1 ve -2) ve *Plasmodium falciparum* (falstatin) 'da tipik NPTTG motifi bulunmamakta bunun yerine GXGYXW (F / L) motifi bulunmaktadır (Pandey ve ark,2006, Huang ve ark,2009). Cryptostatin ile diğer chagasın-ailesi sistein proteaz inhibitörleri arasındaki benzerlik % 14.5-21.4 kadardır (Kang ve ark, 2012) (Şekil 7).

C. parvum : MNKTI FRL FFFATYIMIGISNASDMTSSGSLKASNNLEKVKLVNLDLC : 49
E. histolytica : MKQFI EFA LCTSTYAAI : 18
T. brucei : M : 1
T. cruzi : M : 1
L. major : M : 1
P. aeruginosa : MSFSPSRL LPLSIAVLAS : 20

Loop 2

C. parvum : NSKEAIIINVQDISSSDSIYFIVKPGTEITVNIKENPTGYS--QQMI : 96
E. histolytica : -----HILTEKEDHATLHISFNDLKIQLRTNFGAWNIEYP : 57
T. brucei : --SHNL--FTEEDNNKT---RMVIGETFIELKSNPTGYS--TWLRSGL : 42
T. cruzi : --SHKVTKA---HNGATL---TVAVGELVEIQLPSNPTGFAWFFEGG : 41
L. major : --QPKMTAPLTMKDNKCL---SVRVGSTLEIHLEGNPTGYS--TWTRVGF : 45
P. aeruginosa : AGQQKPVVSLDLADDCSPL---KLTQQQLVLTLPSPPTGFRW----- : 61

Loop 4

C. parvum : IIPNDISIVKVIDAEPSSYVDEHPEG-----MVGYGKYTEFRFSAVGS : 138
E. histolytica : TDTFSLSQDTIKAE-----EHESG-----MVGFPISIREIQLKPLKV : 93
T. brucei : AGTE-LSDCTFAIQSKFNNRAPHDNHKNHRLLVAGGCTMVLEVKLKP : 90
T. cruzi : TRES-PNESMFTVENKYFEPDSK-----LLCAGGTEHFHVTVKVA : 80
L. major : VGKEMLSDEHLEVTSKYTEKVSQS-----MVGAGGSYVVFVKPLRK : 87
P. aeruginosa : ----ELRNFAAGVLRRLGEEVYSNPDDNG---LVGSGGESTWRFRFAAS : 103

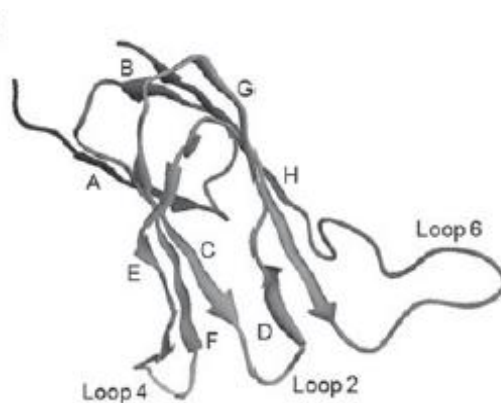
Loop 6

		Identity (%)
<i>C. parvum</i>	GSTVSTIEIARYFEREPKCFKTEIQKVIDLPCEEIIEKE : 178	-
<i>E. histolytica</i>	GTTIKLGYSRPWEKKGKE----PLRSLTY----SVVIR- : 123	18.7
<i>T. brucei</i>	GKHTLSLAYGRPWVGFNA---AAKRYNI----HVEATA : 121	15.7
<i>T. cruzi</i>	GTHAVNLTVMRPWAGESH---DSERFIV----YLVKAN- : 110	14.5
<i>L. major</i>	GQHAVQLVYRPEEGEKFP---DNERYTL----HLNVE- : 117	21.4
<i>P. aeruginosa</i>	GDDRLELVRRPWEKLAEE---FAESISC----AIQVR- : 133	19.5

*

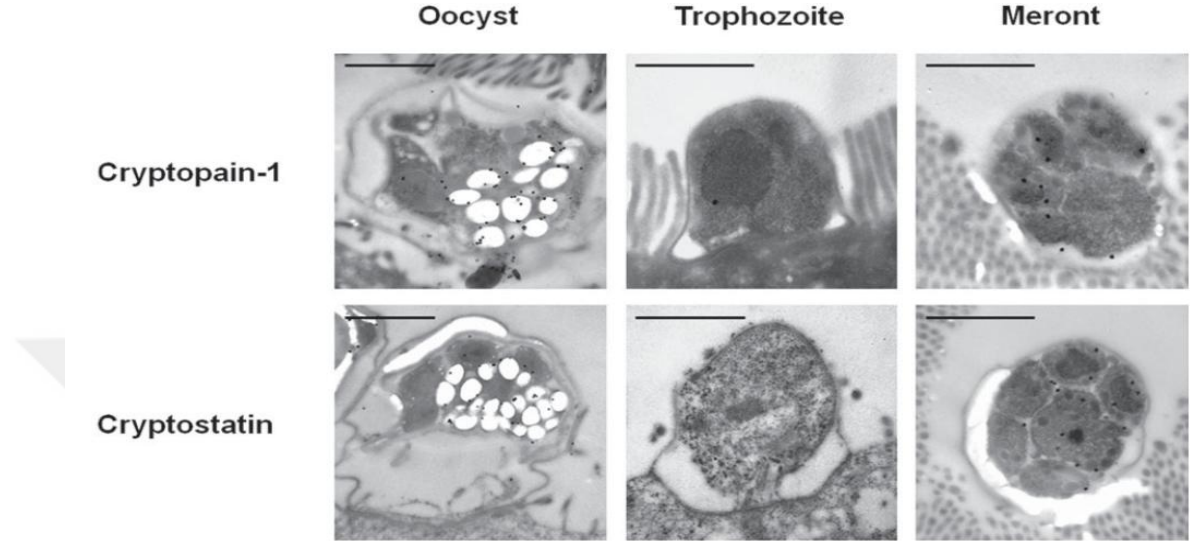
Şekil 6. Çoklu dizi hizalaması yapılarak *Cryptosporidium* ve diğer türlerin karşılaştırılması (Kang ve ark, 2012)

Chagasin ve chagasin benzeri ailenin sistein proteaz inhibitörlerine benzer şekilde, Cryptostatin 'in sekonder yapısı α -heliks yapısından yoksundur ve çoğunlukla β -ipliklerinden oluşmuştur (Şekil 8) (Kang ve ark, 2012).



Şekil 7. Cryptostatin 'nin *Entamoeba histolytica* EhSPI2'nin (pdb: 3M86) Kristal Yapısına Dayandırılarak Yapılan Homoloji modellemesi (Kang ve ark, 2012)

Cryptostatin; *Cryptosporidium*'un hayat döngüsünde meront ve ookist evrelerinde görülmektedir. Hücre içi organellerde ya da membranlarda tam bir lokalizasyon olmadan dağılmış halde bulunmaktadır Şekil 9'da Cryptostatin ve Cryptopain-1'in lokalizasyonu yer almaktadır(Kang ve ark, 2012).



Şekil 8. İmmungold Elektron Mikroskobu Yöntemiyle Cryptostatin ve Cryptopain-1'in Lokalizasyonunun Gösterilmesi (Kang ve ark, 2012)

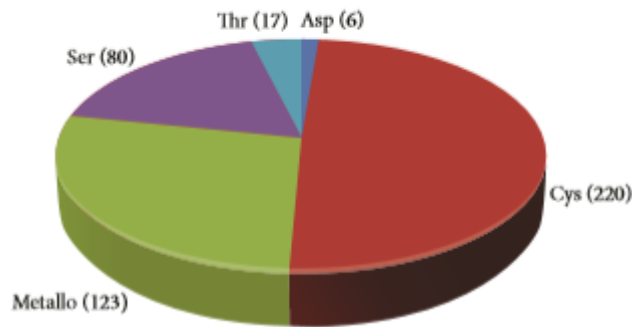
İmmunogold elektron mikroskobu analizi, anti-cryptostatin veya anti-cryptopain-1 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diffüz paternli reaksiyona giren altın parçacıkları esas olarak ookistler ve merontlar içerisinde tanımlanırken, trofozoitler içinde belirgin değildir. Ölçek çubukları = 1 µm (Kang ve ark, 2012).

Cryptostatin; parazitin kendi sistein proteazı olan Cryptopain-1'e, ayrıca papain, insan katepsin B'ye ve insan katepsin L'ye karşı inhibe edici aktivite göstermektedir (Kang ve ark, 2012) Tüm chagasin ailesi sistein proteaz inhibitörleri gibi cryptostatinde, kaynatma sonrasında bile inhibe edici özelliğini koruyabilmektedir (Monteiro ve ark, 2001; Santos ve ark, 2005).

Cryptostatin ve cryptopain, *Cryptosporidium* türlerine karşı potansiyel ilaç hedefi olarak tanımlanmıştır. *C. parvum*'un yaşam döngüsü içinde kilit rol oynayan proteazların ve proteaz inhibitörlerinin biyokimyasal özelliklerini ve biyolojik işlevlerini aydınlatmaya yönelik kapsamlı çalışmalar, parazitin fizyolojisinin anlaşılmasını ve anti-cryptosporidial ilaçların geliştirilmesi sağlayacaktır (Dou ve Carruthers, 2011; Teixeira ve ark, 2011).

2.3.2.2. *Trichomonas vaginalis*' te bulunan sistein proteazlar

T. vaginalis' in tüm genom sekansına bakıldığında 400'den fazla proteinaz kodlayan gene rastlanılmaktadır. Bunların 220'si sistein tipte olup, yalnızca 23'ünün bugüne kadar, substrat jel elektroforezi (zimogram) yapılarak iki boyutlu yapısı aydınlatılabilmiş (Neale ve Alderete,1990; Carlton ve ark, 2007) ve kütle spektrometrisi ile 9 farklı gen ile bağlantılı oldukları bulunmuştur (Ram'on-Luing ve ark, 2011). *T. vaginalis* bulunan sistein proteazlar; CA, CD, CE, CF,CO ve CP klanlarında bulunmaktadır (Carlton ve ark, 2007). CA ve CD klanlarına ait olan sistein proteazlar; parazitte yüksek oranda ifade edilebilmeleri ile proteomik çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Neale ve Alderete, 1990; Huang ve ark, 2009). KlanCA' da bulunan sistein proteazlar *Carica papaya* ' dan izole edilen proteinaz ile yüksek sekans homolojisine sahip oldukları için "papain benzeri" olarak adlandırılır.Bugüne kadar karakterize edilen papain benzeri sistein proteazların tümü katepsin L benzeri C1 ailesinde bulunmaktadır. *T. vaginalis*' te bulunan sistein proteazların bir diğer önemli klanı olan Klan CD ise *Canavalia ensiformis* bitkisinden izole edilen sistein proteazlara benzer ve legümein benzeri olarak adlandırılır. Bu grupta bulunan sistein proteazlar C13 ailesine dahildir (Huang ve ark, 2009; Ram'on-Luing ve ark, 2010).



Şekil 9. *T. vaginalis* genom sekansında sınıflandırılan 440 proteinazın daire grafiğinde gösterimi (Ram'on-Luing ve ark, 2010)

T. vaginalis' te bulunan papain benzeri sistein proteazların katalitik bölgeleri büyük ölçüde korunmuştur ve Cys25 (sistein), His159(histidin) ve Asn175 (asparajin) den oluşan katalitik üçlüden oluşmaktadır. Katalitik triadda Cys ve His kalıntıları ile Asn arasında bir hidrojen bağıyla stabilize edilmiş bir iyon çifti oluşturulur (Arroyo ve Alderete, 1995).

T. vaginalis' te TvCP1, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP4 benzeri, TvCP12, TvCP25, TvCP39 ve TvCP65 olmak üzere katepsin L benzeri 9 sistein proteaz, parazite ait virulans

faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Ram' on Luing ve ark, 2010; Figueroa-Angulo ve ark,2012). Her biri benzer yapıya ve motife sahip olan bu Katepsin L benzeri sistein proteazlar, C1 ailesinde yer almakta ve prodomain ile katalitik domain olmak üzere 2 bölgeden oluşan zimojenler olarak ifade edilmektedirler. TvCP2, TvCP3 ve TvCP4 ayrıca bir sinyal peptidi dizisine sahiptir. TvCP3 dışında, tüm katepsin L benzeri sistein proteazlar aralarında 3 disülfit bağı oluşturan korunmuş 6 sistein kalıntısı ile ERFNIN motifine sahiptir (Carlton ve ark, 2007; Solano- Gonzalez ve ark, 2007) .

Bugüne kadar, *T. vaginalis*'de klan C13 ve CD ailesinde yer alan TvLEGU-1 ve TvLEGU-2 olmak üzere iki sistein proteaz tanımlanmıştır (Leon – Felix ve ark, 2004). Baklagillerden olan *Canavalia ensiformis*' te bulunan sistein proteazlara benzedikleri için legümeın benzeri olarak adlandırılmaktadırlar. Bu sistein proteazlarda da bir propeptid ve katalitik bölge vardır, ancak Klan CA' da bulunan sistein proteazların aksine, propeptit katalitik bölgenin karboksi ucunda bulunmaktadır.

Bazı sistein proteazlar demir tarafından farklı bir şekilde düzenlenirler. Sistein proteazlar, sitoaderens, sitotoksisite, hemoliz, kompleman direnci, immün sistemden korunma ve insan hücrelerinin apoptoziside dahil olmak üzere *T. vaginalis*'in pek çok virulans özelliğinde kritik rol oynarlar (Ramon – Luing ve ark, 2010; Figueroa-Angulo ve ark, 2012). Buna ek olarak, trimonad sistein proteazları, trichomoniasisli hastaların vajinal sekresyonlarında bulunur ve bazıları immünojeniktir (Hernandez ve ark,2004; Figueroa-Angulo ve ark,2012) Alderete ve Provenzano' ya göre sistein proteazların salınımı enfeksiyon sırasında ki çevresel şartlara bağılı olarak düzenlenir (Alderete ve Provenzano, 1997).

Tablo 12. *T. vaginalis*' te bulunan sistein proteazların virulans özellikleri (Arroyo ve ark,2015)

Proteinaz	Virulans Özelliği	Demirle düzenlenme	Düzenlenme tipi
CP (30kDa)	Hücre iskeletinde bozulma	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
TvCP4	Hemoliz	+	Posttranskripsiyonel aşama
TvCP12	Sitotoksosite	-	Posttranskripsiyonel aşama
	Sitoaderens		
TvCP30	Protein degradasyonu	-	Tanımlanmamış
TvCP39	Sitotoksosite	-	Posttranskripsiyonel aşama
	İmmunoglobulin degradasyonu		Posttranslasyonel aşama
TvCP62	Sitoaderens	+	Tanımlanmamış
TvCP65	Sitotoksosite	-	Posttranskripsiyonel aşama
			Posttranslasyonel aşama
			Transkripsiyonel aşama
CP2, CP3, CP4 ve CPT	Konak hücre apoptozisinin indüklenmesi	-	Tanımlanmamış
CP1	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış	Transkripsiyonel aşama
TvLEGU-1	Sitoaderens	+	Posttranslasyonel aşama
			Transkripsiyonel aşama

T. vaginalis' te bulunan proteolitik enzimlerin bir çoğu asidik özelliğe sahiptir. Bu özellik *T. vaginalis*' in bulunduğu mikro ortama ve adet döngüsü boyunca değişen demir konsantrasyonuna adaptasyonunun bir sonucu olarak gösterilebilir (de Jesus ve ark, 2007; Cuervo ve ark, 2008; Huang ve ark, 2009).

Bazı sistein proteazlar, *T. vaginalis*' in amoeboid formunda, ovoid formundan daha fazla bulunmaktadır. Bu, *T. vaginalis* izolatlarının sistein proteaz profillerinin, yüksek ve düşük virülans fenotipleri sergilediğini göstermektedir. Sistein proteaz ifadesindeki

farklılıklar, bu parazitin oluşturduğu hücrel hasarı sağlayan ana faktörlerden biri olduğunu ortaya koymaktadır (de Jesus ve ark, 2007; Cuervo ve ark, 2008; Huang ve ark, 2012).

T. vaginalis' te bulunan 43 kDa büyüklüğünde ki proteaz, CP65, CP30 ve CP39 parazit yüzeyinde bulunmaktadır (Neale ve Alderete, 1990; Alvarez- Sanchez ve ark, 2000, Mendoza- Lopez ve ark,2000). Bu sistein proteazlar konak hücre yüzeyiyle bağlantı sağlar, sitotoksosite ve sitoaderensten sorumlu olup, trichomaniasis hastalarında immunojenik özellik gösterir ve hastalık süresince oluşan çevre koşullarına karşı paraziti korur (Hernandez- Gutierrez ve ark, 2003).

T. vaginalis' te bulunan 39 kDa büyüklüğünde ki CP39; 4-50 C° aralıkta ki sıcaklıklarda ve 3,6- 9 arasında ki pH' da etkinlik gösterebilir. CP39' un optimum çalışma koşulları ise 37 C ° sıcaklık ve pH:7'dir. Yapılan çalışmalarda CP 39'un insan kollajen I ,III ,IV ve V, fibronektin, immunoglobulin A ve G' yi degrade edebildiği saptanmıştır (Hernandez- Gutierrez ve ark, 2003).

Sistatinler, papain benzeri sistein proteazların geri döndürülebilir inhibitörleridir ve stefinler, sistatinler ve kininojenler olmak üzere üç aileye bölünmüş homolog proteinlerden oluşan bir üst aile oluştururlar. Sistatinlerin temel fonksiyonları, istenmeyen proteolizi kontrol etmek ve böylece hücreleri korumaktır (Turk ve ark, 2002). *T. vaginalis*, sistein proteaz inhibitör benzeri protozoon inhibitörlerinden ziyade daha kompleks organizmalara karakteristik olan sistatin benzeri inhibitörlere sahiptir. *T. vaginalis*'teki sistatinleri kodlayan üç genin varlığı, çok sayıda CP'ye sahip organizmalarda, CP'lerin uygun düzenlenmesinin ve sürdürülmesinin önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, belirli noktadaki ve belirli çevresel koşullardaki CP'ler ile ayrı trichocystatins arasındaki proteine protein etkileşimlerinin, *T. vaginalis*'de tarif edilenlere ek olarak, translasyon sonrası seviyede başka bir virülans düzeyi seviyesi olabileceği önerilmektedir (Figueroa-Angulo ve ark, 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon örnekleri

Çalışmamızda koleksiyonumuzda bulunan ve Nisan 2016- Kasım 2017 tarihleri arasında, Burdur/Yeşilova ve Aydın/ Koçarlı ilçelerindeki 14 farklı işletmedeki inek ve buzağılardan toplam 88 farklı dışkı örneği ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan toplamda 28 farklı *Trichomonas vaginalis* DNA örneği kullanılmıştır.

3.1.2. Klonlama vektörleri ve kompetan hücre

Klonlamada kullanılmak üzere pET28a klonlama vektörleri ile kompetan hücre olarak kullanılacak olan *Escherichia coli* BL21 örnekleri ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

3. 1. 3. 1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar.....40 g

Distile su.....1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanmış, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içine %7 oranında steril koyun kanı ilave edildi.

3. 1. 3. 2. Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (OxoidCM 0225)

BHIB.....3,7 g

Distile su.....100 ml

Karışımın pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi.

3. 1. 3. 3. Trypton Soy Broth (TSB) (Oxoid CM 129)

TSB.....10 g

Distile su.....1000 ml

Karışımın pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi.

3. 1. 3. 4. Kanamisin İçeren Seçici Besiyerinin Hazırlanması

BHIA (Brain Heart Infusion Agar).....49 g

Distile su.....1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanmış, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, petriyer içine 1 mL steril distile su dağıtılmıştır. Bu suyun üzerine 50mg/mL' lik kanamisin solüsyonu eklenmiştir. Bunun üzerine 19 mL BHI Agar dökülüp hafifçe karıştırılmış ve oluşan hava kabarcıkları alev geçirilerek patlatıldı.

3.1.3. 5. Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi için seçici besiyerinin hazırlanması

TSB.....10 g

Distile su.....100ml

Karışım hazırlandıktan sonra % 3 Jelatin (Sigma) ilave edilip, 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

3. 1. 3. 6. Skim Milk Powder (Oxoid-LP0031)

Distile su içerisinde %10'luk karışım hazırlandı ve karışım 121 C°de 5 dk otoklav edildi.

3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar ve Ayraçlar

3.1.4.1. EDTA (0,5 M)

Disodium EDTA-2 H₂O.....186,1 g

EDTA 800 mL distile suda manyetik karıştırıcıda çalkalanarak eritilip, NaOH ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

3.1.4.2. %10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Stok Solüsyonu

SDS.....100g

SDS 1000 mL distile suda eritilip, 68 °C' ye ısıtılır ve pH:6,6' ya ayarlandı.

3.1.4.3. %1,5 Amonyum Persülfat (APS)

APS.....75mg

Distile su.....5mL

3. 1. 4. 4. Tris (1M)

Tris Base.....121 g

Tris Base 800 mL distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,4'e ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

3. 1. 4. 5. NaCl (5M)

NaCl146,1 g

Distile Su.....450 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hazim 500 ml' ye tamamlanır.

3. 1. 4. 6. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base.....121,1 g

Borik Asit.....61,83 g

EDTA.....5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8,0 ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE.....50 ml

Distile su.....950 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

3. 1. 4. 7. Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol mavisi.....	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O.....	10 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlandı.

3. 1. 4. 8. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M).....	10 ml
EDTA(0,5 M).....	2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlandı.

3. 1. 4. 9. Sarkozin (%10)

Sarkozin.....	5 gr
Distile su.....	50 ml

3. 1. 4. 10. Kanamisin Stok Solüsyonu

Kanamisin (Sigma).....	50 mg
Distile su.....	1 ml

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra 0.22µm por çaplı filtreden süzülerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

3. 1. 4. 11. IPTG Stok Solüsyonu (0.1M)

1.2 g IPTG (izopropil – β-D-1 tiyogalakpiranosid) tartılarak üzerine son hacim 50 mL olana kadar distile su ilave edilir. Karışım tamamen çözündürüldükten sonra 0.22µm por çaplı filtreden süzülerek, 4°C de saklanır.

3.1.4.12. 1M CaCl₂ Stok Solüsyonunun Hazırlanması

CaCl₂ .2H₂O(Sigma)..... 58.8 g

Distile su..... 400 ml

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra, 121 °C’de 15 dk otoklav edilir.

0,1 M CaCl₂ Solüsyonunun Hazırlanması

1M CaCl₂ 100 ml

Distile su.....900 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanır.

3.1.4.13. 1M MgCl₂ Stok Solüsyonunun Hazırlanması

MgCl₂ .6H₂O(Sigma)..... 101,65 g

Distile su..... 500 ml

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra, 121 °C’de 15 dk otoklav edilir.

0,1 M MgCl₂ Solüsyonunun Hazırlanması

1M MgCl₂100 ml

Distile su.....900 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanır.

3.1.4.14. %10 Gliserol İçeren Solüsyonun Hazırlanması

Gliserol100 ml

Distile su.....900 ml

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra, 121 °C’de 15 dk otoklav edilir.

3.1.4.15. Sodyum deoksikloat (%10)

Sodyum deoksikloat..... 10 g

Distile su.....80 ml

Karışımın çözünmesi sağlandıktan sonra, son hacim 100 ml’ ye tamamlanır.

3.1.4.16. RIPA Buffer Hazırlama

1M Tris-HCl pH:7,4.....	5 ml
5M NaCl.....	3 ml
0,5M EDTA.....	1 ml
NP-40.....	1 ml
%10 Sodyum Deoksikloat.....	5 ml
%10 SDS.....	1 ml
Distile su.....	84 ml

3.1.4.17. Separasyon Buffer Hazırlanması

Tris Base.....	18,25 g
----------------	---------

Tris Base, 40 ml dH₂O içerisinde çözüldü. pH HCl ile 8,8' e ayarlanarak, son hacim 50 ml' ye tamamlandı.

3.1.4.18. Stacking Buffer Hazırlanması

Tris Base.....	3 g
----------------	-----

10 ml dH₂O içerisinde çözülür. pH HCl ile 6,8' e ayarlanır. Son hacim 50 ml' ye tamamlanır.

3.1.4.19. Sample Buffer Hazırlama

0,6 M Tris-HCl pH:6,8.....	5 ml
SDS.....	,5 g
Sükroz.....	5 g
β- merkaptoetanol.....	0,25 ml
%0,5 Bromfenol Blue.....	5 ml

Yukarıda verilen maddeler karıştırıldıktan sonra son hacim 50 ml' ye tamamlandı.

3.1.4.20. Running Buffer Hazırlama

Tris Base.....	30,3 g
Glisin.....	28,8 g

SDS.....10 g

Tris Base ve glisin 500 ml dH₂O içerisinde çözüldü. Son hacim 1000 ml' ye tamamlandı.

3.1.4.21. Destaining Solüsyon Hazırlanması

Distile Su.....75 ml

Metanol.....15 ml

Asetik Asit.....10 ml

Yukarıda verilen oranlarda maddeler eklenerek karışım hazırlandı.

3.1.4.22. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

Coomassie Brilliant Blue.....0,25 g

Metanol.....50 ml

Distile Su.....40 ml

Glasiyel Asetik Asit.....10 ml

Yukarıda verilen oranlarda maddeler eklenerek karışım hazırlandı.

3.1.5. Genotipik Çalışmalar

3.1.5.1. 10X Taq Buffer, dNTP, Taq DNA Polimeraz

10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl , pH 8,3, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂), 100 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq DNA Polimeraz (5U) (Fermentas) kullanıldı.

3.1.5.2. Primerler

Cryptosporidium spp.' nin moleküler olarak doğrulanması için; Tablo 13' de verilen primer çiftleri kullanılmıştır.

Tablo 13. *Cryptosporidium spp.*' nin moleküler olarak doğrulanması için gerekli olan cins özgülü 18s rRNA primer çiftleri

Primer	Dizi (5'-3')	Ürün Uzunluğu(bp)	Tm	Referans
XF1F	TTCTAGAGCTAATACATGCG	325	56	Xiou ve ark,1999
XR1R	CCCATTTCCCTTCGAAACAGGA		67	
XF2F	GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT	830	55	Park ve ark, 2006
XR2R	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA		60	

Cryptosporidium parvum sistein proteaz geni *Cryptopain* ve sistein proteaz inhibitörü *Cryptostatin* ile *Trichomonas vaginalis* sistein proteaz geni *Cp39*' un taranmasında ve klonlanmasında dizayn edilen primer çiftleri Tablo 14 de verilmiştir.

Tablo 14. Kullanılan Primerler

Primer	Dizi (5'-3')	Hedef Gen	Ürün Uzunluğu(bp)	Tm
TvCP39ECO	AAAGAATTCATGTTTCGTTCAACAACATGA	Cp39	987 bp	59
TvCP39XHO	AAACTCGAGTTTGTCTGTTGGGATGCAAG			61
CpFECO	CTGGAATTCATGGACATAGGAAACAACG	Cryptopain	1281 bp	58
CpRXHO	CTGCTCGAGATTGAATTGATTAATCACTGG			56
CsFECO	CGTGAATTCATGAATAAGACAATTTTTAG	Cryptostatin	537 bp	49
CsRXHO	CGTCTCGAGTTCCTTTATTATTCTTCG			51

Bu primerlerin dizaynı için *C. parvum*' a ait olan *cryptopain* ve *cryptostatin* genleri ile *T. vaginalis*' e ait olan *CP39* genine ait olan dizilerin üzerinde başlangıç ve stop kodonları işaretlendi. Dizayn edilen primerlerde bu bölgelerin de dahil olmasına dikkat edildi. Klonlama işlemini sağlamak amacıyla dizayn edilen primerlere restriksiyon kesim bölgeleri eklendi. Eklenen kesim bölgelerinin genin içinde olmamasına dikkat edildi.

1 *Cryptosporidium parvum* cryptopain precursor, gene, complete cds

GenBank: AF091366.1

LOCUS AF091366 1663 bp DNA linear INV 07-JUL-1999
DEFINITION *Cryptosporidium parvum* cryptopain precursor, gene, complete cds.
ACCESSION AF091366
VERSION AF091366.1
KEYWORDS .
SOURCE *Cryptosporidium parvum*

ORGANISM [Cryptosporidium parvum](#)
 Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Conoidasida; Coccidia;
 Eucoccidiorida; Eimeriorina; Cryptosporidiidae;
 Cryptosporidium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1663)
 AUTHORS Petersen,C. and Huang,J.-X.
 TITLE Characterization and expression of the gene for cryptopain, a
 Cryptosporidium parvum cysteine proteinase homologue
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1663)
 AUTHORS Petersen,C. and Huang,J.-X.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (09-SEP-1998) Medicine, University of California San
 Francisco - San Francisco General Hospital, Bldg 30, Rm 405,
 1001
 Potrero Avenue, San Francisco, CA 94110, USA

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1663
 /organism="Cryptosporidium parvum"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="NINC"
 /db_xref="taxon:[5807](#)"
[CDS](#) 259..1464
 /note="similar to cathepsin L"
 /codon_start=1
 /product="cryptopain precursor"
 /protein_id="[AAD42940.1](#)"
 /translation="MDIGNNVEEHQEYISGPYIALINGTNOQREPNKKLKNIIATLI
 AIFIVLVVTVSLYITNNTSDKIDDFVPGDYVDPATREYRKSFEFEEKKYHKVYSSMEE
 ENQRFEIYKQNMNFIKTTNSQGFSYVLEMNEFGDLSKEEFMARFTGYIKDSKDDERVF
 KSSRVSASESEEEFVPPNSINWVEAGCVNPIRNQKNCGSCWAFSAVAALLEGATCAQTN
 RGLPSLSEQQFVDCSKQNGNFGCDGGTMGLAFQYAIKNKYLCNDYDYPYFAEEKTCMD
 SFCENYIEIPVKAYKYVFPNINALKTALAKYGPISVAIQADQTPFQFYKSGVFDAPC
 GTKVNHGVVLVEYDMDDEDTNKEYWLVNRNSWGEAWGEKGYIKLALHSGKKGTGILVEP
 VYPVINQSI"
[sig peptide](#) 259..783
[mat peptide](#) 784..1461
 /product="cryptopain"

ORIGIN

```
1 caaaacttcc taatttctca atgtattact aattaataga aagtttgttt tattttcatg
61 tggataaatg aattattttc tctataccgg catttgcag caattttgta tgactaaaaa
121 gtaaataatt atttgcatgc aattatgtgg gcatgtcata gtttttcaag aataataata
181 agatgacatg acaagatatt caaaaaaatt tgatgattat atggtgaagt taattgaact
241 aaaaagtaat taagtaaaat ggacatagga aacaacgtgg aagaacatca ggaatatatt
301 tctggaccat acattgcatt aattaatggc actaatcaac aaaggggaacc gaataaaaag
361 ttgaaaaaca taataattgc aacgttgatt gcaatcttta tagttttggt tgttactgta
421 tctttgtata ttactaataa caccagtgc aaaattgacg atttcgtacc tgggtgattat
481 gttgatccag caactagggg gtatagaaag agttttgagg agttcaaaaa gaaataccac
541 aaagtatata gctctatgga ggaggaaaat caaagatttg aaatttataa gcaaaatatg
601 aactttatta aaacaacaaa tagccaagga ttcagttatg tgttagaaat gaatgaattt
661 ggtgatttgt cgaaagaaga gtttatggca agattcacag gatataaaa agattccaaa
721 gatgatgaaa gggatattta gtcaagtaga gtctcagcaa gcgaatcaga agaggaattt
781 gttcccccaa attctattaa ttgggtggaa gctggatgcg tgaaccaat aagaaatcaa
841 aagaattgtg ggtcatgttg ggctttctct gctggtgcag ctttgagggg agcaacgtgt
901 gctcaaacia accgaggatt accaagcttg agtgaacagc aatttgttga ttgcagtaaa
961 caaaatggca actttggatg tgatggagga acaatgggat tggcttttca gtatgcaatt
1021 aagaacaaat atttatgtac taatgatgat tacccttact ttgctgagga aaaaacatgt
1081 atggattcat tttgcgagaa ttatatagag attcctgtaa aagcctacia atatgtattt
1141 ccgagaaata ttaatgcatt aaagactgct ttggctaagt atggaccaat ttcagttgca
1201 attcaggccg atcaaaccoc tttccagttt tataaaaagt gagtattcga tgctccttgt
1261 ggaaccaagg ttaatcatgg agttgttcta gttgaatatg atatggatga agatactaat
1321 aaagaatatt ggctagtaag aaatagctgg ggtgaagcgt ggggagagaa aggatacatc
1381 aaactagctc ttcattctgg aaagaaggga acatgtggta tattggttga gccagtgtat
1441 ccagtgatta atcaatcaat ataagcattt cagtgtttga ctaagtaatt ctaatatatt
1501 tcagcattct cagagataat tttagttcaa atgaacaatc tattcatata tataagcatt
1561 ccatacttaa ttatttattg attttaataa aatgtttggc taagaaagc aatcaagata
1621 atttatggac gttctattgt tcttacttca ataataatcc ttt
```

2 *Cryptosporidium parvum* cysteine protease inhibitor gene, complete cds

GenBank: GU433606.1

LOCUS GU433606 537 bp DNA linear INV 17-SEP-2012

DEFINITION *Cryptosporidium parvum* cysteine protease inhibitor gene, complete

cds.

ACCESSION GU433606

VERSION GU433606.1

KEYWORDS .

SOURCE *Cryptosporidium parvum*

ORGANISM [Cryptosporidium parvum](#)

Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Conoidasida; Coccidia;

Eucoccidiorida; Eimeriorina; Cryptosporidiidae;
Cryptosporidium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 537)
AUTHORS Kang, J.M, Ju, H.L, Yu, J.R, Sohn, W.M. and Na, B.K.
TITLE Cryptostatin, a chagasin-family cysteine protease inhibitor of
Cryptosporidium parvum
JOURNAL Parasitology 139 (8), 1029-1037 (2012)
PUBMED [22444160](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 537)
AUTHORS Na, B.-K. and Kang, J.-M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JAN-2010) Parasitology, Gyeongsang National
University School of Medicine, 90 Chilam-dong, Jinju, Gyeongnam
660-751, Korea

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..537
/organism="Cryptosporidium parvum"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[5807](#)"
[mRNA](#) <1..>537
/product="cysteine protease inhibitor"
[CDS](#) 1..537
/codon_start=1
/product="cysteine protease inhibitor"
/protein_id="ADU20409.1"
/translation="MNKTIFRLFFFAIYIMIGISNASDMTSSGSLKASNNLEKVKLV
NLDLCSKEAIINVQDISSSDSIIYFITVKPGTEITVNIKGNPTTGYSQQMIKPNDS
IVKVIDAEPYVDPDPHPEGMVGYGGKYTFRFSAVGSGSTVSTIEYARYFERPPKCIFK
TEIQFKVIDLPCEEIIKE"

ORIGIN

```

1 atgaataaga caatttttag acttttattt tttttcgcaa tttatataat gattggcatt
61 tcaaacgcct ctgatatgac atctagtggg agcttgaagg catccaaca ccttgaaaaa
121 gttaaactcg taaatttggg tttgtgtaac tcgaaagaag caattatcaa tgttcaagac
181 ataagtagct ctgattccat aatatatttc attactgtta agcctggaac ggaaattact
241 gtgaatataa agggcaatcc cacgacaggg tatagccaac agatgattat taaaccgaat
301 gattcaattg taaaagtatt cgacgctgag ccaagttacg ttccagatcc acaccagaa
361 ggtatggttg gatatggtgg caagtatact ttcaggttct cggcagttgg atccggatca
421 acagtttcga ctattgaata tgcaagatac tttgaaaggc cgccaaaatg tttttttaag
481 acagaaattc aattcaaagt tatcgatcta cctgccaag aaataataaa ggaatag

```

3 *Trichomonas vaginalis* cytotoxic cysteine proteinase (cp39) gene, complete cds

GenBank: EU141965.1

LOCUS EU141965 918 bp DNA linear INV 13-OCT-2011

DEFINITION *Trichomonas vaginalis* cytotoxic cysteine proteinase (cp39) gene,
complete cds.

ACCESSION EU141965

VERSION EU141965.1

KEYWORDS .

SOURCE *Trichomonas vaginalis*
ORGANISM [Trichomonas vaginalis](#)
Eukaryota; Parabasalia; Trichomonadida; Trichomonadidae; Trichomonas.

REFERENCE 1 (bases 1 to 918)
AUTHORS Ramon-Luing Lde,L, Rendon-Gandarilla,F.J, Puente-Rivera,J, Avila-Gonzalez,L. and Arroyo,R.
TITLE Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*
JOURNAL Int. J. Biochem. Cell Biol. 43 (10), 1500-1511 (2011)
PUBMED [21777690](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 918)
AUTHORS Ramon-Luing,L.A. and Arroyo,R.
TITLE Identification of the 39-kDa cysteine proteinase, cp39, involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 918)
AUTHORS Ramon-Luing,L.A. and Arroyo,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-SEP-2007) Experimental Pathology, Cinvestav-Ipn, Av. Ipn 2508, Mexico City, D.F. 07360, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..918
/organism="Trichomonas vaginalis"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="CNCD147"
/db_xref="taxon:[5722](#)"
[gene](#) 1..918
/gene="cp39"
[CDS](#) 1..918
/gene="cp39"
/note="clan CA papain-like cysteine proteinase; 39 kDa;
involved in host cellular damage"
/codon_start=1
/product="cytotoxic cysteine proteinase"
/protein_id="[ABX56032.1](#)"
/translation="MFVQQHEQKAFLSWMRETGNMFTGEEYQTRLGIWLSNKRLVQEH

NRANLGFTVALNKLAHLTPAEYKSLGFRMNKAERKAVKSNAIANDDCDWRKHNVVNG
IKDQGQCGSCWAFSTIQAESQYAITTGTLSLSEQNLVDCVTTTCYGCNGGLMDAAAYD
YVVKHQGGKFMTEADYPYTAQDGSCKFSAAGTISKVTGYVNVVEGDEKDLATKVSTLG
PAAIAIDASAWSFQLYSSGIYDESACSSYNLDHGVGCVGYGTEGSKNYWIVRNSWGTS
WGEKGYIRMIKDKNNQCGEATMACIPTDK"

ORIGIN

```
1 atgttcgttc aacaacatga gcagaaagcc ttcctcagct ggatgcgcga gacaggcaac
61 atgttcacag gcgaagagta ccagacacgc cttggcatct ggctctccaa caagcgcctt
121 gtccaggagc acaaccgtgc taacctcggc ttcacagtcg ctcttaacaa gctcgcaccac
181 cttacaccag ctgaatacaa gtccctcctt ggtttcgcga tgaacaaggc cgagcgcgaag
241 gctgtcaagt ccaacgctat cgctaatgat gattgcgact ggcgtaagca taatgtcgtc
301 aacggcatca aggatcaggg ccagtgcggc tcctgctggg ctttctctac aatccaggct
361 caggaatccc agtatgctat cacaacaggc accctccaat ccctctctga acagaacctt
421 gttgactgcg ttacaacatg ctatggctgc aatgggtggtc tcatggatgc tgcttacgac
481 tatgttgctca agcaccaggg cggcaagtgc atgacagaag ctgactacct atacacagct
541 caggatggct cctgcaagtt ctctgctgct aagggcacat caaaggttac aggctacgct
601 aacggtggtg aaggcgatga gaaggatcct gctacaaagg tttccacctt cggcccagct
661 gctatcgcta tcgatgcttc tgcttggtca ttccagcttt actcctctgg catctatgat
721 gaatccgctt gctcctctta caacctcgac cacgggtgtg gctgcggttg ctacggcaca
781 gaaggttcca agaactactg gatcgctcgt aactcctggg gcacatcttg gggtgaaaag
841 ggctacatcc gcatgatcaa ggacaagaac aaccagtgcg gtgaagctac aatggcttgc
901 atcccaacag acaaaataa
```

Gen bankasından alınmış olan genlere ait dizileri gösteren kısımlar yukarıda belirtilmiştir. Start kodonu olan ATG yeşil renk ile , stop kodonu TAA ve TAG kırmızı renk ile ve dizayn edilen primerler mavi renk ile gösterilmiştir.

3.1.5.3.Kullanılan Cihazlar

PCR 96 örnek kapasiteli LongGene A300 (Çin) kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi Thermo marka, 80 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında ve görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

3.1.5.4. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 1,0 veya 1.5 g
TBE (0,5X)..... 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Üzerine UV altında

görüntülenmeyi sağlayacak olan ve ticari olarak satın alınan 5µl SafeView (ABM, Canada) solüsyonu eklenerek karıştırıldı. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

3.1.5.5. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) ve PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı (Fermentas) kullanıldı.

PstI Enzimi ile Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı:

30 µl λ DNA (Fermentas)

30 µl 10X Buffer

4 µl PstI enzimi (Fermentas)

236 µl enjeksiyonluk distile su

Bir saat 37 °C'de bekledikten sonra 30 µl loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 µl kullanıldı (Anderesson 2009).

3.1.6. Protein Analizi

3.1.6.1. Seperasyon Jelinin Hazırlanması

Hazırlanacak Jel	20.0%	17.5%	15.0%	12.5%	10.0%	7.5%	5.0%
%30 Acrylamide/Bis Solution	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Seperasyon Buffer	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
10% SDS	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
1.5% Ammonium Persulphate	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
DD su	4.45	6.95	9.45	11.95	14.45	16.95	19.45
TEMED	15µl	15µl	15 µl	15 µl	15µl	15 µl	15 µl

3.1.6.2. Stacking Jelinin Hazırlanması

Bis- akrilamid solüsyonu.....	0,25ml
Stacking Jel Buffer.....	0,5 ml
%10 SDS.....	0,2ml
%1,5 Amonyum Persülfat.....	0,1 ml
TEMED.....	1,5 µl
Distile Su.....	1,13 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. *Cryptosporidium spp.* şüpheli dışkı örneklerinden ookist çoklaştırması

Çoklaştırma Mini Parasep ® hazır kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için; bezelye büyüklüğündeki dışkı örneği kit içerisinde bulunan koleksiyon tüpüne konulmuş, üzerine 0,9 ml asetat ilave edilerek karıştırılmış ve kitte bulunan filtreli kapak yerleştirilmiştir. Ardından 1000 rcf' de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işleminin ardından tek hamlede üst sıvı kısım atılmıştır.

3.2.2. *Cryptosporidium spp.* tayini için Kinyoun Asit-Fast Boyama (Özcel ve ark,2009)

- 1)Lam üzerine çoklaştırılan örnek yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- 2) Lam saf metanol içerisinde 1 dakika tutularak, fikse edilmiş ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.
- 3) Kinyoun karbol-fuksin içeren şalede 5 dakika tutulmuştur.
- 4) Lamlar, %50 alkol içeren şaleye batırılarak 1-2 saniye çalkalanmış ve yıkanmıştır.
- 5) Dekolorizasyon ajanı olarak kullanılan %1 sülfirik asit içerisinde 2 dakika bekletilen lamlar, akar su altında yıkanmıştır.
- 6) Lamlar en son olarak Loeffler'in metilen mavisi içerisinde 1 dakika bekletilerek yıkanmış ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

7) Kuruyan preparatlar 100X büyütme ışık mikroskopunda immersiyon yağı yardımıyla görüntülenmiştir.

3.2.3. *Cryptosporidium spp.* tayini için İmmunfloresan Antikor Testi

Kinyoun asit fast boyaması sonrasında pozitif olarak değerlendirilen bir adet örnek İmmunfloresan Antikor Testine tabii tutulmuştur. Bu amaç için *Crypto/Giardia* Cel® ticari kiti kullanılmıştır.

- 1) 20 µl dışkı örneği lamın üzerine konularak lam kurutulmuştur.
- 2) Lamlar 5 dakika aseton içerisinde fikse edilmiş ve kurumaya beklenmiştir.
- 3) 25 µl *reagent* fikse edilen örneklerin ve pozitif kontrol örneğinin üzerine konulmuş ve 37 C° ' lik nem küvetinde 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 4) İnkübasyonun ardından lamlar, Fosfat Buffer Salin (PBS) dolu küvette nazikçe yıkanmıştır.
- 5) Lamlar süzölmüş ve kurumaya bırakılmıştır.
- 6) Kit içerisinde bulunan "mounting fluid" solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır.
- 7) Hazırlanan preparat floresan mikroskopunda X1000' lik büyültmede incelenmiştir.

3.2.4. Mikroskopi sonrası *Cryptosporidium spp.* pozitif bulunan örneklerden DNA izolasyonu

Bu amaç için , Qiagene Stool Kit ® kullanılmıştır.

- 1) Bezelye büyüklüğündeki dışkı eppendorfa alındı.
- 2) 1,4 ml Buffer ASL eklenir ve vortekslenir.
- 3) Örnekler 95 C° de 10 dakika inkübasyona bırakıldı..
- 4) İnkübasyonun ardından örnekler 15 saniye yüksek hızda vortekslenmiş ve 1 dakika maksimum hızda santrifüj işlemine tabii tutulmuştur.
- 5) Santrifüj işleminin ardından, süpernatant kısmı 2 ml' lik yeni eppendorfa alınmış üzerine kit içerisinde bulunan İnhibitex tablet eklendikten sonra hemen vortekslenmiştir ve 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.

6) İnkübasyonun ardından 3 dakika maksimum hızda santrifüj işlemi gerçekleştiriliş ve süpernatant kısmı 1,5 ml' lik yeni bir ependorfa alınmıştır.

7) 15µl proteinaz K enzimi 1,5 ml' lik yeni ependorfa ilave edilmiş ve bunun üzerine 200 µl bir önceki işlemde elde edilen süpernatant eklenmiştir.

8) İçerisinde süpernatant ve proteinaz K karışımı bulunan ependorfa 200 µl Buffer AL eklendikten sonra 15 saniye vortekslenmiş ve 70 C° lik termal blokta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

9) İnkübasyonun ardından 200 µl soğuk %96' lık etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir.

10) Kit içerisinde bulunan 2 ml' lik koleksiyon tüpüne karışım aktarılmış ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır.

11) Koleksiyon tüpünün filtreli kısmı yeni bir ependorfa koyulmuş ardından, filtreli kısmın üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenmiş ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır.

12) Koleksiyon tüpünün filtreli kısmı yeni bir ependorfa koyulmuş ardından, filtreli kısmın üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenmiş ve maksimum hızda 3 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Filtreli kısım yeni bir ependorfa alındıktan sonra maksimum hızda 1 dakika daha santrifüj işlemi yapılmıştır.

13) Üst filtreli kısım yeni ependorfa alınıp üzerine 100 µl Buffer AE eklenerek, 1 dakika oda ısısında bekletilmiş ve maksimum hızda 1 dakika daha santrifüj işlemi yapılmıştır.

14) Santrifüj işleminin ardından filtreli kısım atılarak ependorfta kalan kısım DNA kaynağı olarak kullanılmak üzere -20 C° de saklanmıştır.

3.2.5. PCR

3.2.5.1 PCR miksinin hazırlanması

Master Mikslerin Hazırlanışı: PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 0,3 µl/50 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Tablo. 15' de belirtilmiştir.

Tablo 15. Mastermiksın hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek için alınan miktar (µl)
% 1,5 MgCl ₂ Buffer (10X)	1x	5
dNTP (10 mM)	0,2 mM	1
Primer-F (100 pmol)	0,4 pmol	0,2
Primer-R (100 pmol)	0,4 pmol	0,2
Taq Polimeraz (5 U)	0,3 µl/50 µl	0,3
DNA		2
dH ₂ O		41,3
TOPLAM		50

Amplifikasyon için PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnek adedi kadar numaralandırılan eppendorf tüpleri içine 50' şer µl ilave edildi. Daha sonra üzerine 2 ' şer µl izole edilen DNA' dan konularak tüplerin ağzı kapatıldı. Hazırlanan tüpler termal döngüleme cihazlarına yüklenip programlandı. 18s rRNA, cryptospain, cryptostatin ve cp39 genlerinin ısı döngü ve süre diyagramı sırası ile Tablo 16, Tablo. 17, Tablo. 18. ve Tablo. 19. ' da verilmiştir

Tablo 16. *Cryptosporium spp.* spesifik 18s rRNA PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	5 dk
Denatürasyon	35	94	45 sn
Bağlanma	35	60	45 sn
Uzama	35	72	60 sn
Son Uzama	1	72	7 dk

Tablo 17. Cryptopain geninin amplifikasyonundaki ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma	35	54	30 sn
Uzama	35	72	60 sn
Son Uzama	1	72	6 dk

Tablo 18. Cryptostatin geninin amplifikasyonundaki ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma	35	50	30 sn
Uzama	35	72	60 sn
Son Uzama	1	72	6 dk

Tablo 19. CP39 geninin amplifikasyonundaki ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma	35	57	30 sn
Uzama	35	72	60 sn
Son Uzama	1	72	6 dk

Her bir gen için PCR işleminden sonra elde edilen pozitif bir ampikon sekans analizi için özel bir firmaya gönderildi.

3.2.5.2. Ampikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipet yardımıyla alınıp her bir örnek için 1 µl kadar dağıtıldı, daha sonra elde edilen 5 µl PCR ürünleriyle loading dye karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 6 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

3.2.5.3. Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100V 400A akımda 30 dakika yürütüldü.

3.2.5.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Otuz dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde içerisinde %1'lik etidyum-bromür olan tanka koyuldu. Burada 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce belirtildiği şekilde elektroforez işlemi yapılarak gerçekleştirildi. *Cryptosporidium* spp.'nin moleküler olarak tanımlanmasında kullanılan X1 ve X2 primerlerinde sırasıyla 325bp ve 830 bp uzunluğunda, *Cryptosporidium* sistein proteazı cryptopain ile sistein proteaz inhibitörü cryptostatin primerlerinde 1281bp ve 537 bp uzunluğunda bant oluşumu beklenirken, *T. vaginalis*'te bulunan ve immunojenik etkisi bilinen sistein proteaz CP39' da; 987 bp uzunluğunda bant oluşumu gözlemlenmiştir.

Cryptopain, *cryptostatin* ve *CP39* genlerine ait pozitif amplikonlar klonlama işlemi için -20 C° de muhafaza edildi.

3.2.6. Klonlama

3.2.6.1. pET28a İçeren *Escherichia coli* BL21 Suşundan Plazmit Ekstraksiyonu

PCR ile çoğaltılan genlerin klonlanması amacıyla ekspresyon vektörü olan pET28a seçilmiştir. *E. coli* BL21 içerisinde yer alan pET28a plazmidi ticari bir kit (Plazmid Miniprep Kit) kullanılarak üreticinin belirttiği protokol uygulanarak aşağıdaki gibi elde edildi.

- 1) Bakteri BHIB'a ekildikten sonra 37 C° de bir gece inkübasyona bırakıldı
- 2) Tüplerde gelişme gözlemlendikten sonra plazmid izolasyonu için mikrosantrifüj tüpüne alınarak 5 dakika 14000 rpm' de santrifüj edildi.
- 3) Üst sıvı atılarak pellet 250 µl Solution I (Süspansiyon Solüsyonu) ile homojen hale getirildi.
- 4) 250 µl Solution II (Lizis Solüsyonu) eklenerek 4-5 kez alt-üst edilerek karıştırıldı.
- 5) 350 µl Solution III (Nötralizasyon Solüsyonu) eklenip aynı şekilde 4-5 kez alt-üst edilerek karıştırıldı, 12000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi.
- 6) Oluşan beyaz pellete zarar vermeden sıvı kısım GeneMark Spin kolonuna aktarıldı ve 1 dakika santrifüj edildi.
- 7) Toplayıcı tüpteki (Collection Tube) sıvı boşaltılıp, kolona 600 µl Washing Solution eklenerek tekrar 1 dakika santrifüj edildi. Toplayıcı tüpteki sıvı atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
- 8) Toplayıcı tüpteki sıvı atılarak spin kolon boş olarak tekrar santrifüj edildi.
- 9) Spin kolon yeni bir ependorf içerisine alınarak etanolu uzaklaştırmak için 5 dakika 37 °C'de bekletildi
- 10) Spin kolon üzerindeki filtrelili membran kısma dokunmadan üzerine 50 µl Elution Buffer eklenip 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletildi ardından 2 dk 14000 rpm hızda santrifüj edilerek kolon atıldı. Eppendorf'ta kalan kısım plazmid kaynağı olarak -20 °C'de saklandı.

3.2.6.2. pET28a Plazmidi ile Klonlanacak Genleri İçeren Amplikonların Restriksiyonu

İzolasyonu yapılan pET28a plazmid DNA' sını ile restriksiyon kesim yerleri eklenmiş modifiye primer ile çoğaltılan *cryptopain*, *cryptostatin* ve *CP39* genleri *EcoRI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilmiştir. Bu amaç için; Tablo 20'de yer alan maddeler ve miktarlar kullanıldı.

Tablo 20. pET28a plazmid DNA'sının *EcoRI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu

İçerik	Alınan Miktar (µl)
pET28a plazmid DNA' sını	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
<i>XhoI</i>	1 µl
Deionize Su	6 µl
Toplam	20 µl

Tablo 21. Hedef Bölgeye Ait Amplikonların (*Cryptopain*, *Cryptostatin* ve *CP39*) *EcoRI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu

İçerik	Alınan Miktar (µl)
Hedef Bölgeye Ait Amplikon	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
<i>XhoI</i>	1 µl
Deionize Su	6 µl
Toplam	20 µl

Kesim reaksiyonları 37 °C' de yaklaşık olarak 30 dakika inkübe edildikten sonra 5' er µl' leri alınarak %1 w/v'lik agaroz jelde incelendi. Geriye kalan 15'er µl reaksiyon ürünü presipitasyon işlemi için kullanıldı.

3.2.6.3. Presipitasyon

- 1)Kalan 15 µl kesilmiş ampliconlara ve plazmide 85 µl distile su eklendi.
- 2) 100 µl Fenol:Kloroform:İzoamilalkol eklenip karıştırılarak 10.000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 3)Üst fazlar yeni bir ependorfa alınır. (hedef gene ait amplicon ve plazmid bu aşamada birleştirildi.)
- 4) 1/10volüm 3 M Na Asetat (pH:5.2) eklenip karıştırıldıktan sonra v/v isopropanol eklenerek karıştırıldı. 20 dakika -20 °C'de bekletildi.
- 5) 30 dakika +4 °C'sıcaklıkta ki cihazda maksimum hızda santrifüj işlemi yapıldı.
- 6) Üst sıvı atılarak pellet üzerine 300 µl %70'lik etanol eklendi ve +4 °C'sıcaklıkta ki cihazda maksimum hızda 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
- 7) Üst sıvı atılarak pelletin tamamen kuruması için 37 °C'sıcaklıkta ki etüvde yeterli süre bekletildi.
- 8) Pellet tamamen kuruduktan sonra üzerine 17 µl steril distile su eklenerek çözülmesi sağlandı.

3.2.6.4. pET28a Plazmidi ve Klonlanacak Genleri İçeren (*cryptopain*, *cryptostatin* ve *CP39*) Ampliconların Ligasyonu

Presipitasyon aşamasında hedef bölge ve pET28a vektörü birleştirilerek, ligasyona hazır hale getirilmiştir. Genlere ait ampliconlar ve pET28a vektörü için ligasyon reaksiyonu Tablo 22' de verilmiştir.

Tablo 22. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar (µl)
pET28a plazmidi+ Hedef gene ait amplicon	17 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam	20 µl

Elde edilen ligasyon ürünü karışımları 1 saat oda ısısında bekletildikten sonra, 22 °C'sıcaklıkta ki ısı bloğunda 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından ligasyon ürünleri enzim ve diğer kimyasal inhibitörlerden saflaştırılmak için, presipitasyon işlemi yinelenmiştir. Presipitasyon işleminin ardından kompetan hücreye aktarma yapabilmek için

tamamen kurutulmuş pellet 10 µl deiyonize su ile sulandırılmış ve transformasyona kadar -20 °C’ de saklanmıştır.

3.2.6.5. Kimyasal Transformasyon Yolu ile *E.coli* BL21 Hücrelerinin Hazırlanması

1) Tek koloniden bakteri alınarak 5 ml BHI Broth içerisine ekim yapıldı ve 37 °C’ sıcaklıkta ki etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2) Steril bir tüpe 50 ml BHI Broth alınarak içerisine 1 ml gecelik kültürden inoküle edilerek, 37 °C’ sıcaklıkta ki etüvde yaklaşık 3 saat OD600 değeri 0.4-0.6 olana kadar inkübe edildi.

3) İnkübasyonun ardından hücreler buz içerisinde 20 dakika bekletildi ve ardından +4 °C ’ sıcaklıkta ki santrifüj cihazında 5000 rpm hızda 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı.

4) Üst sıvı uzaklaştırılarak pellet üzerine 10 ml soğuk distile su eklendi. +4 °C ’ sıcaklıkta ki santrifüj cihazında 5000 rpm hızda 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı atılarak pellet tekrar 10 ml soğuk distile su ile yıkandı ve santrifüj işlemi yinelenildi.

5) Üst sıvı atılarak pellet 10 ml %10 gliserol içeren su ile homojenize edildi ve +4 °C ’ sıcaklıkta ki santrifüj cihazında 5000 rpm hızda 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant atıldı.

6) Pellet üzerine soğuk 80 mM MgCl₂- 20 mM CaCl₂ solüsyonundan 30 ml eklenerek homojenize edildikten sonra +4 °C ’ sıcaklıkta ki santrifüj cihazında 5000 rpm hızda 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant atıldı.

7) Pellet üzerine yaklaşık 2 ml 0,1 M CaCl₂ solüsyonundan ilave edilerek homojenize edildi ve steril pipet yardımıyla 100’ er µl buz içerisindeki eppendorflara dağıtıldı.

3.2.6.6. Kimyasal Transformasyon

1) Hazırlanan 100 µl kimyasal kompetent hücre içerisine 10 µl rekombinant plazmid eklenerek dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve 20-30 dakika buzda inkübe edildi.

2) 42 °C ‘ye ayarlanmış su banyosu veya heat block içerisine transfer edildi 2 dakika ısı şoku uygulandı.

3) Süre bitiminde tüp derhal buz içerisine alınarak 2 dakika bekletildi.

4) Üzerine 900 µl TSB eklenerek 1 saat 37 °C ‘de inkübe edildi.

5) İnkübasyonun ardından her bir transformant seçici kanamisin içeren besiyerlerine 50 ve 200 µl' lik hacimlerde alınarak yayma ekim yapıldı. 37 °C sıcaklıktaki etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı.

6) Ertesi gün seçici besiyerinde üreyen koloniler değerlendirmeye alındı.

3.2.6.7. İnsert Alan Rekombinant Plazmidleri İçeren Kolonilerin Seçimi ve Doğrulanması

Seçici kanamisinli besiyeri plaklarında üreyen pET28a plazmidini içerisine hedef DNA fragmanlarının (*Cryptopain*, *Cryptostatin* ve *CP39* genleri) eklendiği düşünülen koloniler seçildi ve klonlama için kullanılan primerler ile PCR işlemi yapılarak kontrol edildi. PCR sonucunda pozitif olan koloniler 50 µg/ ml kanamisin içeren seçici sıvı besiyerlerine inoküle edildi. İnoküle edilen ve üreyen transformantlardan plazmid ekstraksiyonu yapılarak, EcoRI ve XhoI endonükleaz enzimleri ile kesildi. Elektroforez işlemi yapılarak, plazmid ve insert incelemesi yapıldı. Her iki yöntemle de doğrulanmış transformantlardan 50 µg/ ml kanamisin içeren seçici besiyerlerine geçilerek, ileri çalışmalar için stoğa alındı.

3.2.6.8. Sekans Analizi

Seçici besiyerinde seçilen klonların doğrulanması yapıldıktan sonra elde edilen kolondan klonlama primerleri ile PCR yapıldı ve sekans analizi için özel bir firmaya gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben sekans analizini gerçekleştirdi. Fasta formatında tarafımıza gönderilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırıldı. Bunun için nucleotid- protein BLAST programı kullanıldı.

3.2.7. SDS

3.2.7.1. Kısmi Protein Saflaştırması

1) Klonlanarak rekombinant üretimi gerçekleştirilmiş olan *cryptopain*, *cryptostatin* ve *CP39* genlerini içeren *E.coli* hücreleri ile kontrol amacıyla kullanılacak olan pET28a içeren BL21 50 mg/ml kanamisin içeren 12 ml TSB (tryptic soy broth) sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37 °C'de gecelik kültüre bırakılmıştır.

2) Ertesi gün 50 mg/ml Kanamisin içeren 150 ml TSB besiyeri bulunduran cam şişeye, 5 ml gecelik kültürden inoküle edilmiş ve 37 °C’de yaklaşık 6 saat inkübe edilerek OD600 ‘deki absorbans değeri OD 0.6-0.8 oluncaya kadar inkübe edildi.

3) Bu sıvı besiyerine 1mM IPTG eklenerek bir gece boyunca 37 °C’de çalkalanarak kültüre bırakıldı.

4) Absorbansı 0.6-0.8’e erişen 150 ml bakteri kültürünü 50 ml’lik falkonlara (3 tüp) aktarılıp 5000 rpm’de 20 dakika +4 °C’de santrifüj edildi. Bundan sonraki işlemler buz içerisinde gerçekleştirilmiştir.

5) Her üç falkondaki süpernatant atılarak dipteki bakteri pelleti üzerine 10 ml RIPA lysis buffer konularak pipetaj yapılarak homojenize edildi.

6) Bu homojenizatlar 1.5 ml’lik ependorflara dağıtılmıştır ve 10 000 rpm de 10 dakika +4 °C’de santrifüj edilerek yıkandı ve süpernatant kısmı atıldı. Homojenizat aynı falkonlar içerisinde tekrar 5000 rpm’de 20 dakika +4 °C’de santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı.

7) Dipteki pelletlerin üzerine 1ml RIPA lysis buffer solüsyonundan konularak pipetaj yardımıyla homojenize edilmiştir. Bu homojenizatlardan 500’lik tüplere 300 µl konularak dağıtılmıştır. Daha sonra her bir tüp içerisine en küçük ölçü kaşığı ile bir kaşık Zirconium Oxide Beads (ZrOB05 0.5 mm diameter) homojenizasyon boncuğu eklenmiştir.

8) Bu tüpler homojenizatör cihazına (Tehtnica Millmix 20) yerleştirilerek 25 frekansta 30 sn 10 kez (aralarda 1 dk bekleme süresiyle) işleme tabi tutuldu. İçerisinde boncuklar bulunan parçalanmış hücreler 1.5 ml lik ependorflara aktarılarak 10 000 rpm de 5 dakika +4 °C’de santrifüj edildi.

9) Tüplerdeki süpernatant yeni bir ependorfa alınarak protein ekstraktı olarak kullanılmıştır (- 20 °C de saklanmalıdır).

3.2.7.2. SDS Jelinin Hazırlanması

Proteinlerin görüntülenmesi için SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Örnekler yüklenerek proteinler jelde dikey elektroforez cihazıyla yürütülmüştür. Daha sonra jel boyanarak proteinler görüntülenmiştir.

Camlar (düz cam ve kesik cam) alkolle iyice temizlenip, her iki seperatör sağlı sollu kenarlara yerleştirilip ve poşetinin içine konup jel dökme aparatına kesik camlı kısım size bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Aparatın dengesi ayarlanmıştır. *Trichomonas vaginalis*’ e ait sitotoksik etkili sistein proteaz CP39; 39 kDa, *Cryptosporidium spp.*’ e ait sistein proteaz olan cryptopain; 45, 47 kDa ve sistein proteaz inhibitörü olan cryptostatin; 19,79 kDa ağırlığa

sahip olduğu için %15 lik separasyon jeli hazırlanmıştır. Bu amaç için; Tablo 23' de yer alan oranlar ve malzemeler kullanılmıştır.

Tablo 23. %15' lik Separasyon Jeli Hazırlamak İçin Gerekli Kimyasallar ve Miktarları

İçerik	% 15'lik jel için gerekli miktar
%30 Acrylamide/Bis Solution	5 ml
Seperasyon Buffer	1,25ml
10% SDS	0,1ml
1.5% Ammonium Persulphate	0,5ml
Distile su	3,15 ml
TEMED	5 µl

TEMED ve Amonyum persülfat polimerizasyon işlemini başlattığı için en son ilave edildi ve hiç bekletilmeden hemen cam levhaların aralarına bir pipet yardımıyla aktarılmıştır. Jel cam levhalar üzerine aktarıldıktan sonra , üzeri etanol ile kaplanarak pürüzsüz bir yüzeyin elde edilmesi sağlanmıştır. Yaklaşık 30-40 dakika separasyon jelinin donması için beklenildi. Ayrımı sağlayacak olan Separasyon jelinin donmasının ardından üzerine örneklerin yüklenmesi için gerekli olan Stacking Jel Tablo 24' deki malzemeler kullanılarak tabloda belirtilen oranlarda hazırlanmıştır.

Tablo 24. *Stacking* Jeli Hazırlamak İçin Gerekli Kimyasallar ve Miktarları

İçerik	% 15'lik jel için gerekli miktar
Acrylamide Bis Solution	0.25 ml
Stacking Gel Buffer	0.5 ml
%10 SDS	0.2 ml
1.5% Ammonium Persulphate (APS)	0.1 ml
TEMED	1.5 µl
Distile su	1.13 ml

TEMED ve amonyum persulfat polimerizasyon işlemini başlattığı için en son ilave edilmiş ve hiç bekletilmeden separasyon jeline bir pipet yardımıyla dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir.

3.2.7.3. Örneklerin Hazırlanması

Her bir kuyucuğa yaklaşık 30 µl örnek ve sample buffer karışımı ilave edilmiştir. Örnekler hazırlanırken 15 µl örnek 15 µl sample buffer bir eppendorf içerisine konulmuş ve 100 °C deki thermal blokta 5-10 dakika denatüre edilip, spin yapılarak buharı toplanmıştır.

3.2.7.4. Örneklerin Jelde Yürütülmesi:

Donmuş olan jel naylon poşetinden çıkarılıp ve çeşme suyu altında kenarlarındaki jel partikülleri temizlenip ve tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Kuyucuklardaki su silkelenerek boşaltılıp dikey elektroforez cihazına kesik cam arkada kalacak şekilde yerleştirilip vidalarla hafifçe sıkıştırılmıştır. Running Buffer camların üst çizgisine gelecek ve tanktaki elektroforez tellerini geçecek şekilde doldurulmuştur (250 ml). Hazırlanan örnekler ve marker'lar pipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Enerji kaynağıyla bağlantısı yapılan tankın elektrik düzeyleri 110V da boya en alt çizgiye gelene kadar elektroforez işlemi (2 h) gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.5. Jel Boyama

Jelde yürüyen proteinleri görüntülemek için, jel dikkatlice boyama yapılacak küvete alınmıştır. Stacking jel kısmı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra su ile jel yıkanmıştır. Jeli boyamak için, commasie blue boyası kullanılmıştır. *Commasie blue* boyası jeli kapatacak şekilde kap içerisinde ki jel üzerine dökülmüş, kabın kapağı yarım kapatılarak, 1 dakika mikrodalga fırında yüksek derecede ısıya tabi tutulmuştur. Daha sonra 15-20 dakika shaker'da yavaşça inkübe edilmiştir. Boya geri toplanıp ve destain solüsyonu jelin üstüne dökülmüştür ve mikrodalgada 1 dakika ısıtılıp sonra 20-30 dakika karıştırıcıda yavaşça inkübe edilmiştir. Bu son işlem bantlar net görünene kadar tekrar edilmiştir.

3.2.8. Rekombinant Olarak Üretilen Proteinlerin Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Sistein proteaz enzimlerinin substratları arasında jelatin, kollajen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks elemanları bulunmaktadır. Çalışmamızda rekombinant olarak ürettiğimiz sistein proteazların (CP39, cryptopain) ve sistein proteaz inhibitörünün (cryptostatin) işlevsel olup olmadığının belirlenmesi için jelatini parçalama aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu amaç için;

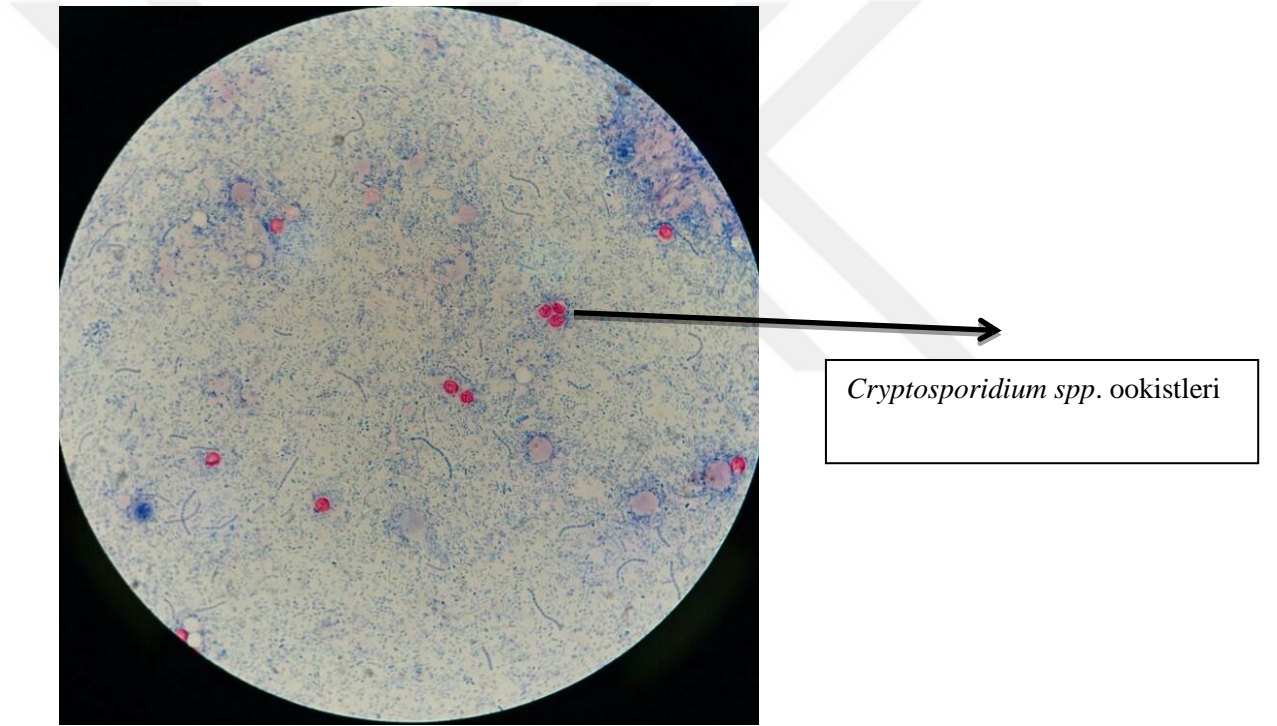
1) Klonlanarak rekombinant üretimi gerçekleştirilmiş olan *cryptopain*, *cryptostatin* ve *CP39* genlerini içeren *E.coli* hücreleri ile kontrol amacıyla kullanılacak olan pET28a içeren BL21 50 mg/ml kanamisin içeren 12 ml TSB (tryptic soy broth) sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37 °C’de gecelik kültüre bırakılmıştır.

2) Ertesi gün %3 jelatin içeren 4 ayrı seçici TSB içerisine, pET28a, cryptopain, cryptostatin ve CP39 ayrı ayrı inoküle edilmiş ve 37 °C’ sıcaklıkta ki etüvde inkübe edilmiştir. Bunun yanı sıra cryptostatin içeren ve kontrol amaçlı pet28a içeren *E.coli* hücreleri birinci günün ardından enzim inaktivasyonu sağlayıp sağlayamamasını değerlendirmek amacıyla, içerisinde cryptopain içeren *E.coli* bulunan TSB içerisinde inoküle edilmiştir.

3) İnkübasyonun ardından besiyerleri buzdolabına konularak jelatinaz aktivitesi, besi yerinde katılma olup olmamasına göre değerlendirilmiştir.

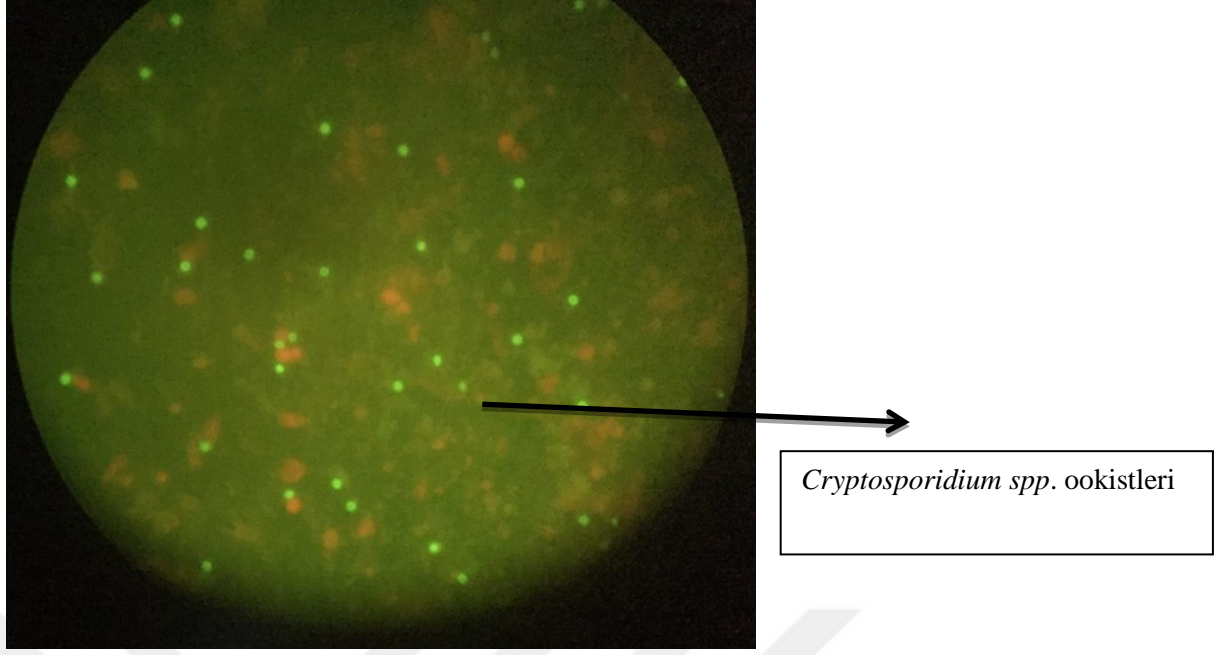
4. BULGULAR

Çalışmamızda koleksiyonumuzda bulunan ve Nisan 2016- Kasım 2017 tarihleri arasında, Burdur/Yeşilova ve Aydın/ Koçarlı ilçelerindeki 14 farklı işletmedeki inek ve buzağılardan toplam 88 farklı dışkı örneğinden ookist çoklaştırma işlemi yapılmıştır. Bunun ardından, Kinyoun asit fast boyama yöntemi ile örnekler değerlendirilmiştir. Boyama sonrası mavi zemin üzerinde pembe ookistlerin görülmesi dışkıda *Cryptosporidium* olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Resim 3' de pozitif olarak değerlendirilen bir adet örneğe ait mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Resim 3. *Cryptosporidium* Ookistlerinin Kinyoun Asit Fast Boyama Yöntemi ile Gösterilmesi

Pozitif olarak değerlendirilen bir adet örnek Crypto-Giardia İmmunfloresan Antikor Testi ile değerlendirilmiştir. Resim 4' de pozitif olarak değerlendirilen bir adet örneğe ait floresans mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Resim 4. Crypto-Giardia İmmunfloresan Antikor Testi ile Değerlendirme Sonrası Floresans Mikroskopisi Görüntüsü

Kinyoun asit fast boyaması sonrasında *Cryptosporidium* açısından pozitif olarak değerlendirilen örneklerden DNA izolasyonu yapılmış ve *Cryptosporidium* spp. ‘ ye spesifik enzimlerle PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR açısından pozitif olarak değerlendirilen bir adet örnek sekansa gönderilerek doğrulanmıştır. Tablo 25. ‘ de örneğin alındığı yer, çiftlik, ookist varlığı ve PCR işlemi sonrasında ki bulgular verilmiştir.

Tablo 25. *Cryptosporidium* Şüpheli Dışkı Örneğinin Alındığı Yer, Çiftlik Numarası, Ookist Varlığı ile *Cryptosporidium* Spesifik PCR Sonuçları

Örnek No	Alınan Köy	Çiftlik No	Ookist Varlığı	18s Rrna Per
no:1	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:2	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:3	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:4	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 2	POZİTİF	POZİTİF
no:5	Bayındır/Yeşilova/Burdur	çiftlik 3	POZİTİF	POZİTİF
no:6	Bayındır/Yeşilova/Burdur	çiftlik 3	NEGATİF	D.Y.
no:7	Beyköy/ Yeşilova/Burdur	çiftlik 4	NEGATİF	D.Y.
no:8	Beyköy/ Yeşilova/Burdur	çiftlik 4	POZİTİF	POZİTİF
no:9	Beyköy/ Yeşilova/Burdur	çiftlik 4	POZİTİF	POZİTİF
no:10	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 2	NEGATİF	D.Y.
no:11	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:12	Büyükya/Yeşilova/Burdur	çiftlik 5	POZİTİF	POZİTİF
no:13	Büyükya/Yeşilova/Burdur	çiftlik 5	NEGATİF	D.Y.

ÖRNEK NO	ALINAN KÖY	ÇİFTLİK NO	OOKİST VARLIĞI	18s rRNA PCR
no:14	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 6	POZİTİF	POZİTİF
no:15	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 7	POZİTİF	POZİTİF
no:16	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 7	POZİTİF	POZİTİF
no:17	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 2	NEGATİF	D.Y.
no:18	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 2	POZİTİF	POZİTİF
no:19	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:20	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:21	Çardak/ Yeşilova/Burdur	çiftlik 8	NEGATİF	D.Y.
no:22	Kavacık/ Yeşilova/Burdur	çiftlik 9	NEGATİF	D.Y.
no:23	Kavacık/ Yeşilova/Burdur	çiftlik 9	NEGATİF	D.Y.
no:24	Gökçeyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 10	POZİTİF	POZİTİF
no:25	Gökçeyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 10	POZİTİF	POZİTİF
no:26	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:27	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:28	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 7	POZİTİF	POZİTİF
no:29	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 11	NEGATİF	D.Y.
no:30	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 11	POZİTİF	POZİTİF
no:31	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 12	NEGATİF	D.Y.
no:32	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 12	POZİTİF	POZİTİF
no:33	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 13	POZİTİF	POZİTİF
no:34	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 13	NEGATİF	D.Y.
no:35	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 13	POZİTİF	POZİTİF
no:36	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:37	Alanköy/Yeşilova/Burdur	çiftlik 1	POZİTİF	POZİTİF
no:38	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 5	POZİTİF	POZİTİF
no:39	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 5	NEGATİF	D.Y.
no:40	Büyükyaka/Yeşilova/Burdur	çiftlik 12	POZİTİF	POZİTİF
no:41	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:42	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:43	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:44	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:45	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:46	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:47	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:48	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:49	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:50	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:51	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:52	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:53	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:54	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	NEGATİF
no:55	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:56	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	NEGATİF

ÖRNEK NO	ALINAN KÖY	ÇİFTLİK NO	OOKİST VARLIĞI	18s rRNA PCR
No:57	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:58	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:59	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:60	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:61	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:62	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:63	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:64	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:65	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:66	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:67	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:68	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:69	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:70	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:71	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:72	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:73	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:74	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:75	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:76	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:77	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:78	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:79	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:80	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:81	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:82	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	NEGATİF	D.Y.
no:83	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:84	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:85	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:86	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:87	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF
no:88	Dedeköy/Koçarlı/Aydın	çiftlik 14	POZİTİF	POZİTİF

D.Y. Değerlendirme Yapılmayan

İncelenen 88 örneğin 63'ünde (%72) kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium*' a ait ookist saptanmıştır. Kinyoun asit fast ile pozitif sonuç alınan 63 örneğin 61'i (%97) ise *Cryptosporidium* spesifik primerler ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dedeköy/Koçarlı/Aydın' dan alınan 54 ve 56 numaralı örnekler hariç tüm örneklerde kinyoun asit fast boyama yöntemi ve *Cryptosporidium* spesifik primerleri ile yapılan PCR arasında paralellik bulunmuştur

Cryptosporidium spesifik primerler PCR sonucu pozitif çıkan bir adet örnek doğrulama amacıyla sekans analizi için özel bir firmaya gönderilmiştir. Fasta formatında tarafımıza gönderilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırıldı. Bunun için nucleotid- nucleotid BLAST programı kullanıldı. Resim 5’de sekans sonrası değerlendirme sonucu verilmektedir.

Job Title: Nucleotide Sequence
RID: 13SYEFED01R Search expires on 01-06 20:25 pm Download All
Program: BLASTN Citation
Database: nt See details
Query ID: lcl|Query_17175
Description: None
Molecule type: dna
Query Length: 1746
Other reports: Distance tree of results MSA viewer

Filter Results
Organism: only top 20 will appear exclude
Type common name, binomial, taxid or group name
+ Add organism
Percent Identity: to
E value: to
Query Coverage: to
Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

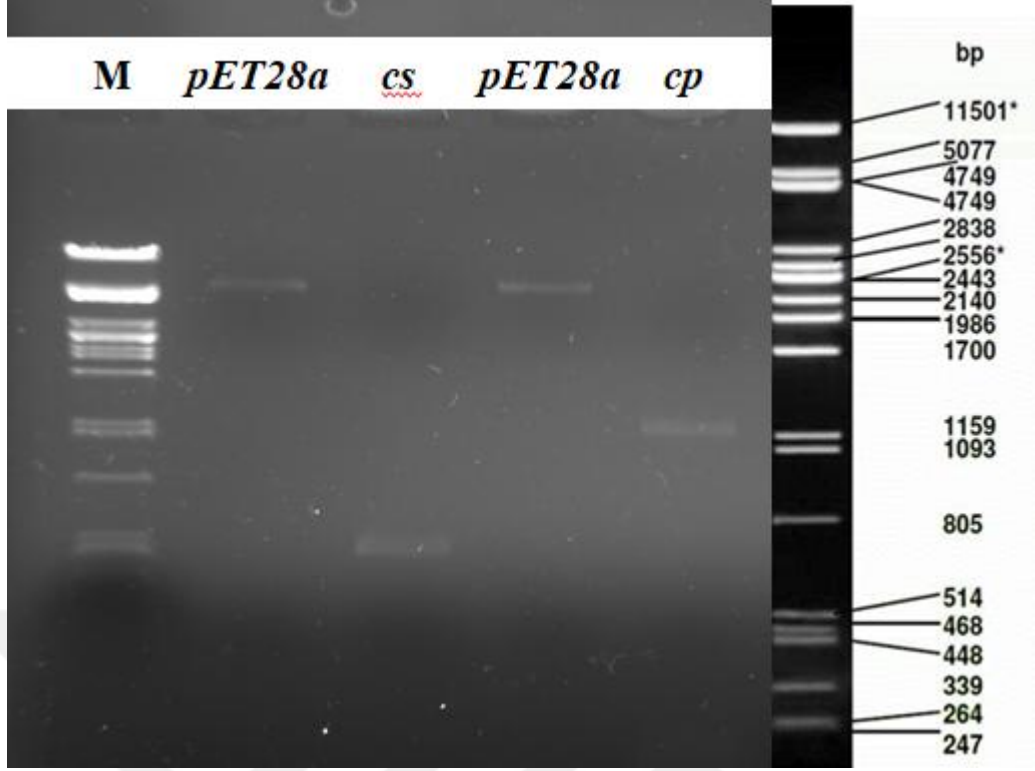
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Cryptosporidium parvum gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, isolate, Sakha109	3225	3225	100%	0.0	100.00%	AB513864.1
Cryptosporidium parvum gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, isolate, Sakha211	3223	3223	99%	0.0	100.00%	AB513880.1

Resim 5 . Sekans sonrası değerlendirme sonucu.

Değerlendirme sonucunda gönderilen örneğin, *Cryptosporidium parvum* 18s ribozomal RNA ile %100 uyumlu olduğu görülmüştür.

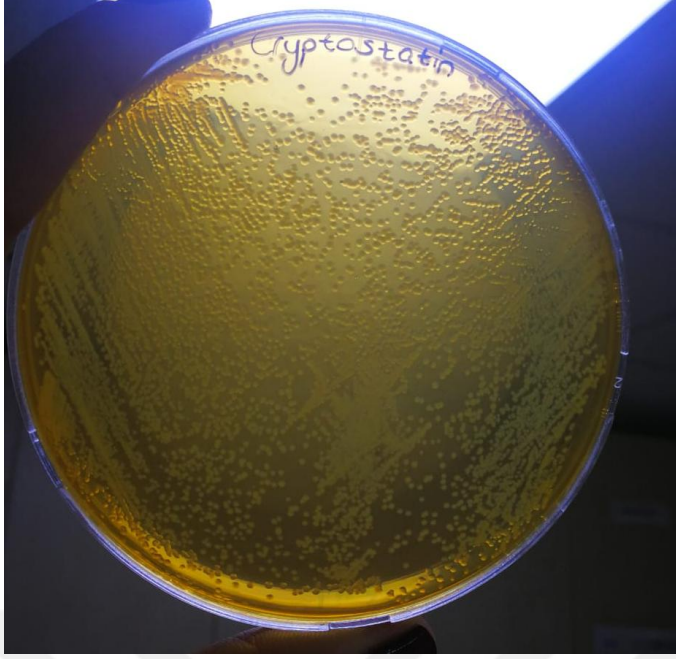
Kinyoun asit fast ile pozitif sonuç alınan 63 örnek cryptostatin ve cryptopain geni açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu 63 örneğin 22 tanesinde (%35) her iki gen açısından (cryptopain ve cryptostatin) da pozitiflik saptanmıştır.

Her bir gen için pozitif olarak belirlenen bir adet PCR ürünü ve pET28a vektörü klonlama yapılmak üzere *EcoRI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiş, sirküler form linear hale getirilmiştir. Resim 6.’ da *cryptostatin* ve *pET28a*’nın ile *cryptopain* ve *pET28a*’nın *EcoRI* ve *XhoI* ile endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü yer almaktadır.

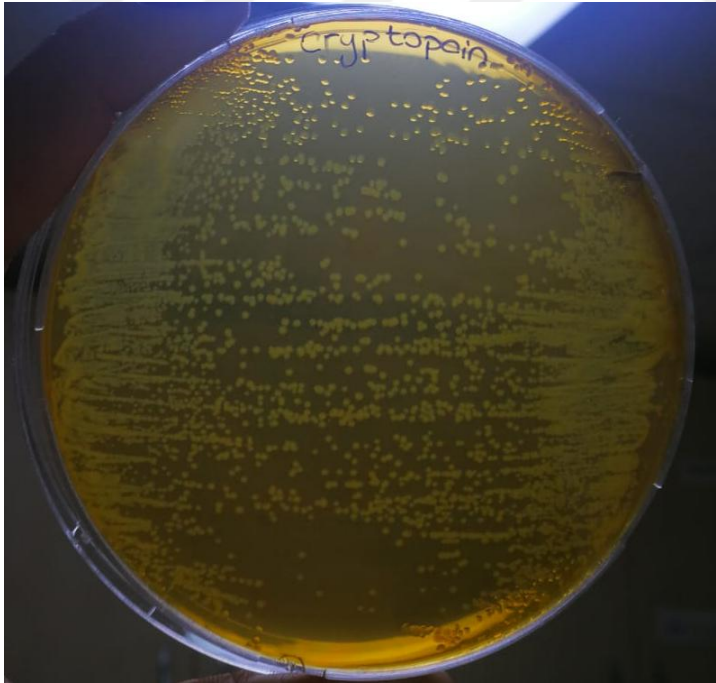


Resim 6. *cryptostatin* ve *pET28a* ile *cryptopain* ve *pET28a*'nın *EcoRI* ve *XhoI* ile endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü M: Marker. Marker olarak Lambda-PstI kullanılmıştır.

Restriksiyonu takiben presipitasyon, ligasyon ve transformasyon işlemleri yapılmıştır. Transformasyonun ardından kanamisin içeren seçici besi yerlerine ekşimler gerçekleştirilmiştir. Resim 7'de *cryptostatin*'in klonlama sonrası seçici besi yerindeki görüntüsü Resim 8'de ise *cryptopain*'in klonlama sonrası seçici besi yerindeki görüntüsü yer almaktadır.

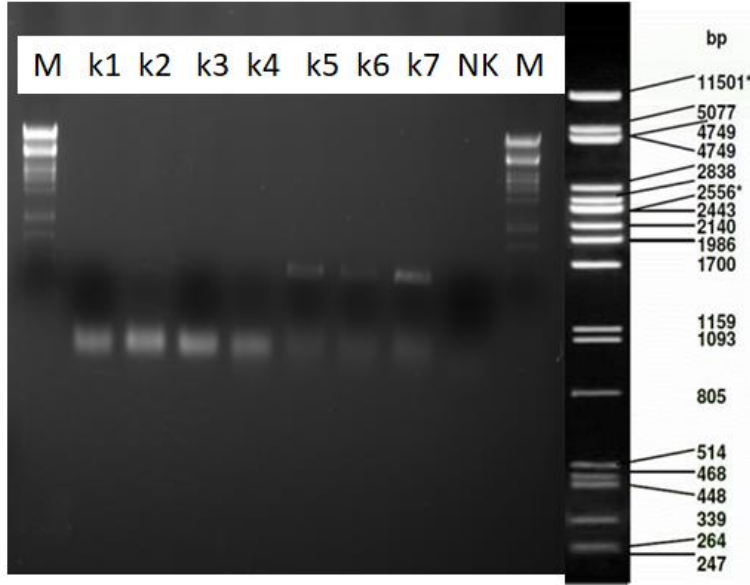


Resim 7. *Cryptostatin*'nin pET28a'ya transformasyonu sonrası seçici besiyerindeki görünümü

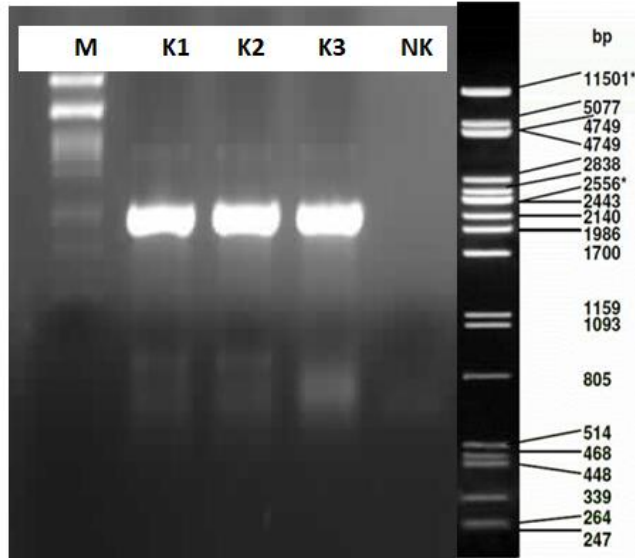


Resim 8. *Cryptopain*'in pET28a'ya transformasyonu sonrası seçici besiyerindeki görünümü

Rekombinant olan yani klonlamanın gerçekleştiği kolonilerden birkaç farklı koloni seçilmiştir. Seçilen koloniler, gene spesifik olarak tasarladığımız primerler yardımıyla koloni PCR yapılarak değerlendirilmiştir. Resim 9’da *cryptostatin* Resim 10’da *cryptopain*’e ait koloni PCR sonrası elektroforez görüntüleri yer almaktadır.

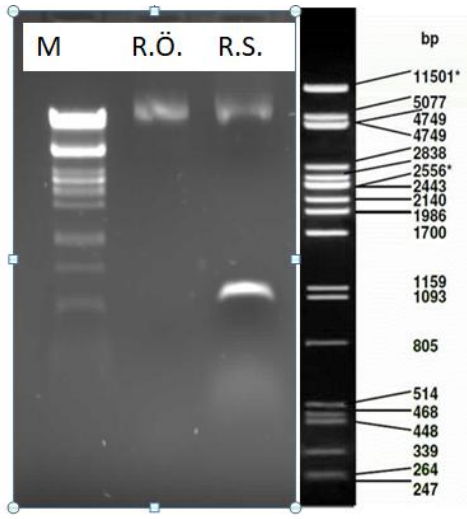


Resim 9. *Cryptostatin*’ e ait Koloni PCR Sonrası Elektroforez Görüntüsü M: Marker. Marker olarak Lambda-PstI kullanılmıştır. K1..K7 : seçici besiyerlerinden seçilen koloniler. NK: Negatif Kontrol

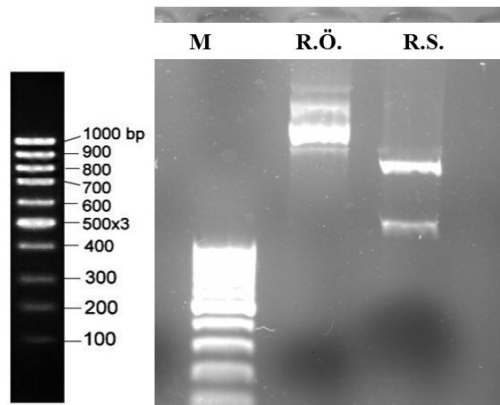


Resim 10. *Cryptopain*’e Koloni PCR Sonrası Elektroforez Görüntüsü M: Marker. Marker olarak Lambda-PstI kullanılmıştır. K1..K3 : seçici besiyerlerinden seçilen koloniler. NK: Negatif Kontrol

Pozitif olarak değerlendirilen kolonilerden genlere ait birer adet koloni seçici besi yerine ekilmiştir. Ertesi gün seçici sıvı kültüre alınarak gerekli üreme sağlandıktan sonra, bu örneklerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak, *EcoRI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesime tabii tutulmuştur. Resim 9’da cryptostatin insertini almış cs7 klonunun restriksiyon analizi ve Resim 11’de cryptopain insertini almış cp3 klonunun restriksiyon analizi yer almaktadır.



Resim 11. cryptostatin İnsertini Almış cs7 Klonunun Restriksiyon Analizi **M:** Marker. Marker olarak Lambda-PstI kullanılmıştır. R.Ö. : Restriksiyon öncesi içine insert aldığı düşünülen plazmid. R.S. Restriksiyon sonrası pET28a içerisinde cryptostatin insertini almış olduğu görüntü

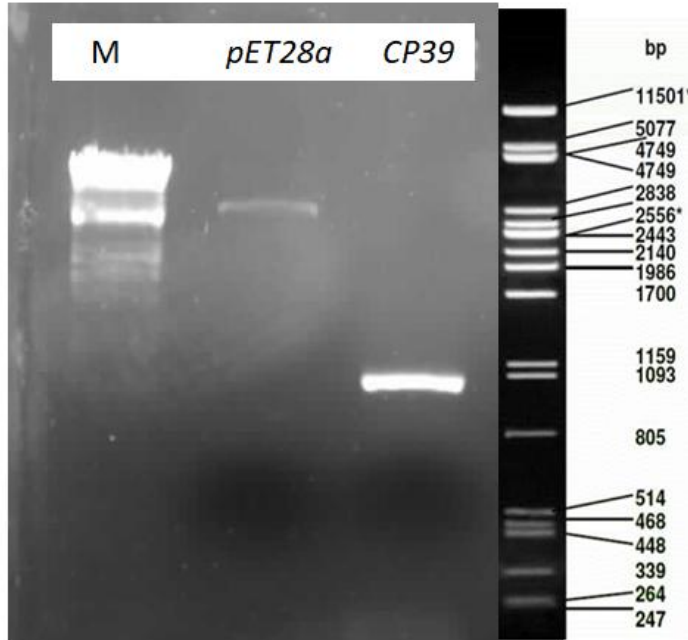


Resim 12. cryptopain İnsertini Almış cp3 Klonunun Restriksiyon Analizi

M: Marker. Marker olarak ticari 1000bp lik marker kullanılmıştır. R.Ö. : Restriksiyon öncesi içine insert aldığı düşünülen plazmid. R.S. Restriksiyon sonrası pET28a içerisinde cryptopain insertini almış olduğu görüntü

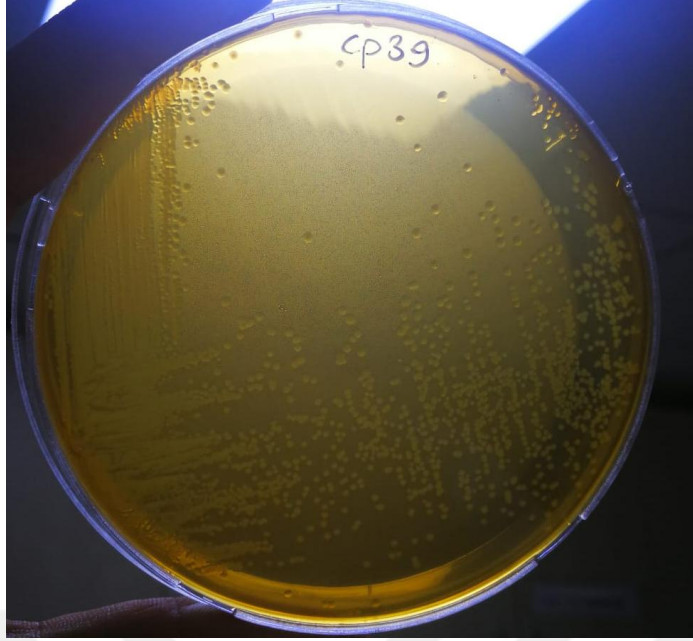
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan toplamda 28 farklı *Trichomonas vaginalis* DNA örneğinde sitotoksik etkili sistein proteaz olan *CP39* geni taraması yapılmış olup 19 (%68) örnekte pozitiflik saptanmıştır.

CP39 geni için pozitif olarak belirlenen bir adet PCR ürünü ve pET28a vektörü klonlama yapılmak üzere *EcoRI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiş, sirküler form linear hale getirilmiştir. Resim 13’ de *CP39* ve *pET28a*’nın *EcoRI* ve *XhoI* ile endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü yer almaktadır.



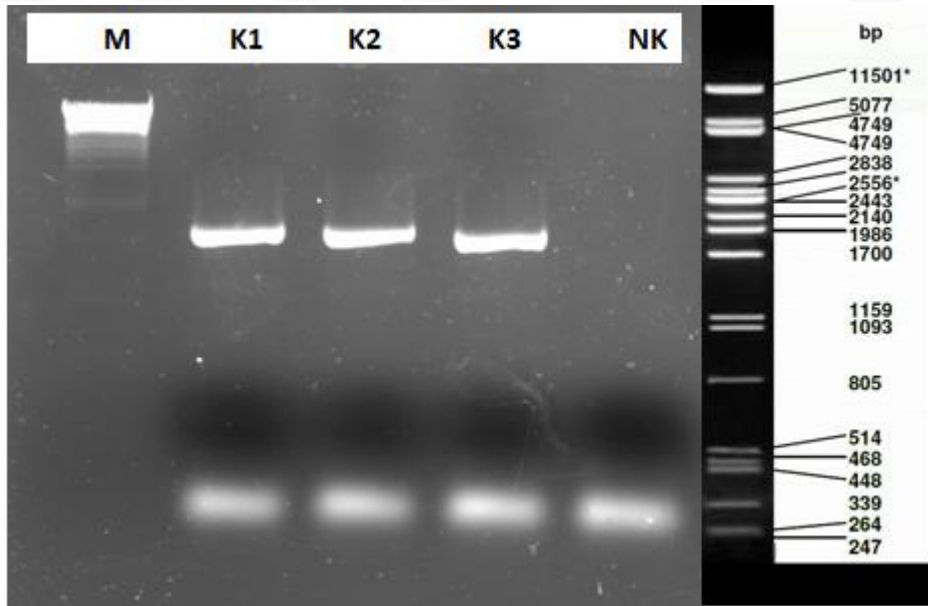
Resim 13. *CP39* ve *pET28a*’nın *EcoRI* ve *XhoI* ile endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü M: Marker Marker olarak Lambda PstI kullanılmıştır

Restriksiyonu takiben presipitasyon, ligasyon ve transformasyon işlemleri yapılmıştır. Transformasyonun ardından kanamisin içeren seçici besi yerlerine ekşimler gerçekleştirilmiştir. Resim 14 ‘de *CP39*’ un klonlama sonrası seçici besi yerindeki görüntüsü yer almaktadır.



Resim 14. CP39' un Klonlama Sonrası Seçici Besi Yerindeki Görüntüsü

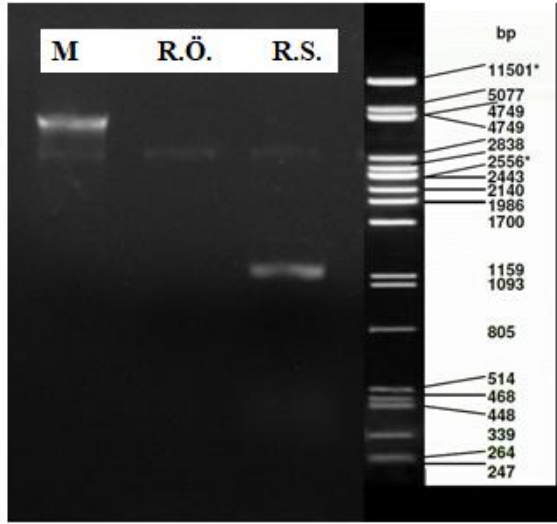
Rekombinant olan yani klonlamanın gerçekleştiği kolonilerden birkaç farklı koloni seçilmiştir. Seçilen koloniler, gene spesifik olarak tasarladığımız primerler yardımıyla koloni PCR yapılarak değerlendirilmiştir. Resim 15' de CP39'a ait koloni PCR sonrası elektroforez görüntüsü yer almaktadır.



Resim 15. CP39 'a ait koloni PCR sonrası elektroforez görüntüsü

M: Marker. Marker olarak Lambda-PstI kullanılmıştır. K1..K3 : seçici besiyerlerinden seçilen koloniler. NK: Negatif Kontrol

Pozitif olarak değerlendirilen kolonilerden gene ait 1 koloni seçici besi yerine ekilmiştir. Ertesi gün seçici sıvı kültüre alınarak gerekli üreme sağlandıktan sonra, bu örneklerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak, *EcoRI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesime tabii tutulmuştur. Resim 16’ da *CP39* insertini almış ts1 klonunun restriksiyon analizi yer almaktadır.



Resim 16. *CP39* insertini almış ts1 klonunun restriksiyon analizi M: Marker. Marker olarak Lambda-PstI kullanılmıştır. R.Ö. : Restriksiyon öncesi içine insert aldığı düşünülen plazmid. R.S. Restriksiyon sonrası pET28a içerisinde *CP39* insertini almış olduğu görüntü

Koloni PCR ve restriksiyon analizleri ile konfirmasyonu sağlanmış olan genlere ait birer adet ampikon doğrulama amacıyla ticari bir firmaya sekans analizi için gönderildi. Fasta formatında tarafımıza gönderilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırıldı. Bunun için nucleotid- protein BLAST programı kullanıldı. Resim 17, 18. ve 19 da sırasıyla rekombinant olarak üretilen cryptostatin, cryptopain ve *CP39*'a ait sekans sonrası değerlendirme sonuçları yer almaktadır.

Program BLASTX [Citation](#) ▼

Database nr [See details](#) ▼

Query ID lc|Query_60296

Description None

Molecule type dna

Query Length 537

Other reports [?](#)

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Manage Columns ▼ Show 100 ▼ [?](#)

select all 100 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein [Cryptosporidium parvum Iowa II]	342	342	99%	1e-118	100.00%	XP_627553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Proteinase inhibitor I42 chagasin [Cryptosporidium tyzzeri]	328	328	99%	9e-113	94.94%	TRY51214.1

Resim 17. Rekombinant *cryptostatin*' e Ait Sekans Sonrası Değerlendirme Sonucu

Distribution of the top 7 Blast Hits on 7 subject sequences [?](#)

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40 40-50 50-80 80-200 >=200

Query

1 250 500 750 1000 1250

[Alignments](#) [Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [?](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Cryptosporidium parvum Iowa II cryptopain - cysteine proteinase secreted, possible transmembrane domain near N-terminus (cdq6_4880) mRNA, complete cds	876	876	39%	0.0	99%	XM_627814.1
<input type="checkbox"/> Cryptosporidium parvum chromosome 6, complete sequence, segment 4/4	876	876	39%	0.0	99%	BX638353.1

Resim 18. Rekombinant *cryptopain*' e Ait Sekans Sonrası Değerlendirme Sonucu

Distribution of the top 18 Blast Hits on 17 subject sequences [?](#)

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40 40-50 50-80 80-200 >=200

Query

1 150 300 450 600 750 900

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

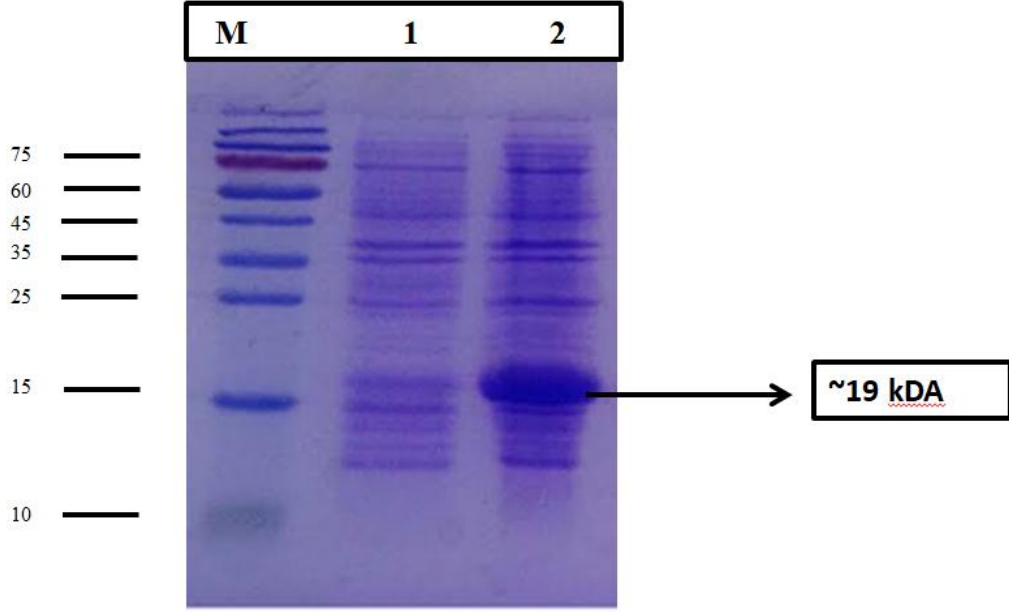
[Alignments](#) [Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [?](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Trichomonas vaginalis cytotoxic cysteine proteinase (cp39) gene, complete cds	1445	1445	92%	0.0	97%	EU141955.1

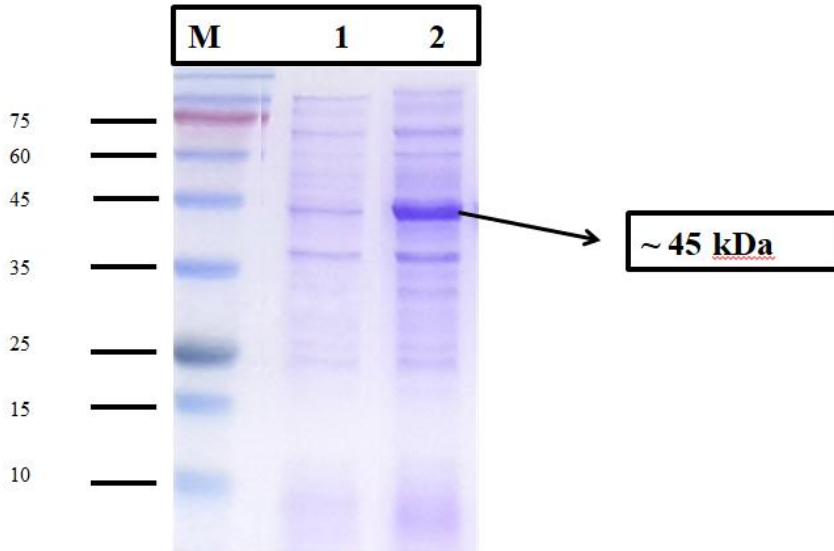
Resim 19. Rekombinant CP39 'a Ait Sekans Sonrası Değerlendirme Sonucu

Sekans analizi sonuçları ile doğrulanan koloniler ileri çalışmalar için Skim milk içeren besiyerinde – 20 C° de ve %10 gliserol içeren besiyerinde -80 C° de saklanmıştır. SDS Page analizi için her bir gene ait koloniler, ayrı ayrı seçici besi yerlerine ekilmiştir. Üremenin ardından

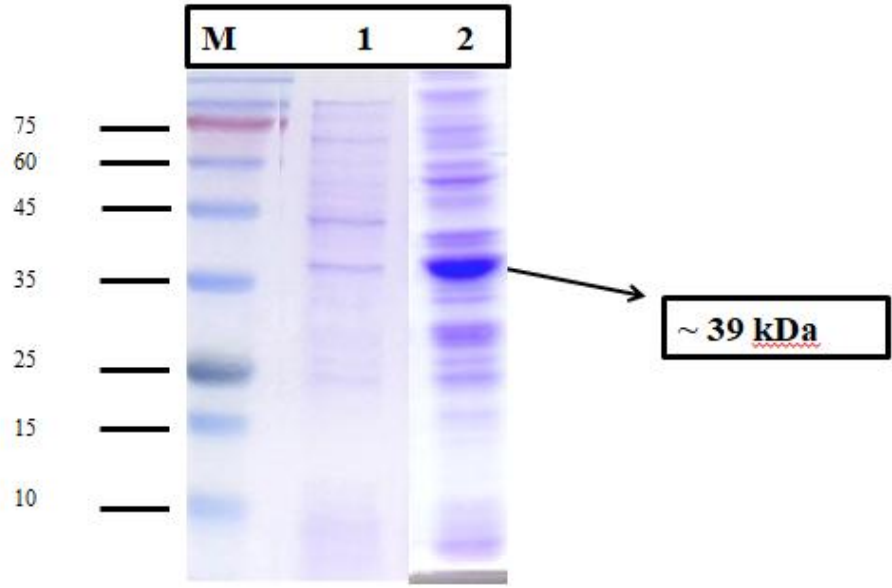
IPTG indüklemesi yapılmış ve kısmi protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Resim 20,21 ve 22’de cryptostatin, cryptopain ve cp39’ ait SDS Page görüntüleri yer almaktadır.



Resim 20. pET28a +cryptostatin içeren BL21 total proteini **M:** Marker **1:** pET28a içeren BL21 **2:** pET28a+cryptostatin içeren BL21



Resim 21. pET28a +cryptopain içeren BL21 total proteini **M:** Marker **1:** pET28a içeren BL21 **2:** pET28a+cryptopain içeren BL21



Resim 22. pET28a +CP39 içeren BL21 total proteini **M:** Marker **1:** pET28a içeren BL21 **2:** pET28a+CP39 içeren BL21

SDS page analiz yönteminin sonucuna göre; elde edilen rekombinant proteinlerin doğru boyutlarda görüntü vermesi seçilen klonların protein olarak ifade olduğunu göstermektedir.

SDS page analiz yöntemiyle de doğrulamayı sağlanan rekombinant proteinlerin jelatinaz aktivitesi %3 jelatin içeren TSB ile değerlendirilmiştir. Resim 21'de jelatinaz aktivitesinin değerlendirme görüntüsü yer almaktadır.



Resim 23. Üretilen Rekombinant Proteinlerin ve pET28a içeren BL21' in Jelatinaz Aktivitesi

Buna göre sistein proteaz olan cryptopain ve CP39'da jelatinaz aktivitesi saptanırken sistein proteaz inhibitörü olan cryptostatin ve kontrol olarak kullanılan pET28a içeren BL21 örneğinde jelatinaz aktivitesi saptanmamıştır. Aynı zamanda rekombinant olarak ürettiğimiz cryptostatinin, cryptopainin aktivitesini inhibe ettiği jelatinaz aktivitesi ile belirlenmiştir. Sistein proteaz olan cryptopain başlangıçta jelatinaz aktivitesi gösterirken, cryptostatin eklendiğinde bu etkinin ortadan kalktığı gözlenmiş ancak kontrol grubunda pet28a eklenen cryptopainin jelatinaz aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

5. TARTIŞMA

Cryptosporidium spp.'in tam ve etkin bir tedavisi yoktur. *Trichomonas vaginalis*'in tedavisinde metranidazol türevi ilaçlar kullanılmaktadır ancak bu antibiyotiklere direnç gelişimi görülmektedir. Her iki tür içinde etkin ve yeni ilaçlara gereksinim duyulmaktadır. Bunun yanı sıra her iki tür için kullanılabilir ticari bir aşıda mevcut değildir.

Cryptosporidium spp. intrasellüler ve extrasitoplazmik bir protozondur. İnsanları da kapsayan çok sayıda omurgalı türünde gastrointestinal mikrovilluslarda hasara neden olan apikompleksa şubesinde yer alan parazitlerdir.

Klinik tablo enfekte konağa, immun durumuna ve yaşına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda ve immunsupresif hastalarda günlük 20 litreye varabilen dışkı atılımıyla kolera benzeri diyareye neden olup, hayatı tehdit edici bir tablo oluşturabilmektedir. CDC tarafından biyoterörizm ajanı olarak tanımlanmıştır ve kategori B'de yer alan tek parazit türüdür (CDC, 2019).

Zoonotik tür olarak da öne çıkan *C. parvum* dünyada oldukça yaygın olarak bulunmakta, gelişmiş ülkeler de uygulanan mücadele programlarına rağmen hastalıktan önemli düzeyde etkilenmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). ABD'de yıllık 15 milyon insanın ishal şikayeti ile kliniklere başvurduğu, bunun yaklaşık 300.000 kadarına kriptosporidiozis teşhisi konduğu ve bu düzeyin gıdaya bağlı ishal olgularından 45 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Fayer ve ark, 2000). Baldursson ve Karanis'in 2011 yılında yaptıkları çalışmaya göre dünyada 2004-2010 yılları arasında bildirilen, su kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının %60,3'ünde *Cryptosporidium* etmeni saptanmıştır (Baldursson ve Karanis, 2011). Su kaynaklı epidemiyi nedenleri arasında parazit kaynaklı sularındaki prevalansının yüksek olması, içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, klora dirençli olması ve çok az sayıda parazitin dahi enfeksiyona neden olabilmesi gösterilmektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve kriptosporidiozis vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından kaynaklanan salgın şeklinde olduğu bildirilmiştir (Ungar 1995; Topçu ve ark, 2002).

Cryptosporidium parvum için etkene yönelik spesifik bir tedavi henüz geliştirilmemiştir (Zhu ve Fritzler, 2012). Geniş spektrumlu antiparazitik ve geniş spektrumlu bir antiviral olan Nitozoksanid'in *C. parvum* ve *C. hominis* enfeksiyonlarında da kullanılması

“Amerika Gıda ve İlaç Dairesi” (FDA) tarafından kabul görmüştür. Aşı çalışmaları olmasına karşın henüz ticarileşmiş bir aşısı bulunmamaktadır.

Cryptosporidium özellikle veteriner sahada neonatal hayvanlarda ishal etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Yaptığımız çalışmada incelenen ishallerli hayvanlardan alınan 88 dışkı örneğinin 63’ü (%72) kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium*’a ait ookist saptanmıştır. Kinyoun asit fast ile pozitif sonuç alınan 63 örneğin 61’i (%97) ise *Cryptosporidium* spesifik primerler ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. Türkiye’de ve dünyada *Cryptosporidium spp.*’in sığırlardaki prevalansının % 0-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (Sarı ve ark,2008). Buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansını etkileyen faktörler arasında sürü büyüklüğü, doğum zamanı, süten kesilme zamanları, yaş aralıkları, yetiştirme tipi, ahırlarda su tankı bulunması ve buldukları bölgedeki durgun göl ve göletlerin kontaminasyon durumu yer almaktadır. Bunun yanı sıra örneğin alındığı mevsim ve bölge de prevalansı etkileyebilmektedir. Dünyada buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansına yönelik çalışmalar sonucunda farklı pozitiflik oranları tespit edilmiştir; Estonya’da %23 (Santoro ve ark, 2018), Arjantin’ de %26,3 (Lombardelli ve ark,2019), Çin’ de %11,9 (Gong ve ark,2017), Nijerya’ da %16 -%78 (Maikai ve ark,2011), Japonya’ da % 20 (Murakoshi ve ark,2012), Fransa’da %41,5 (Delafosse ve ark, 2015) İngiltere’de %10,2 (Smith ve ark,2014), Etiyopya’ da %25,2- %17,3 (Wegayehu ve ark.2016, Ayele ve ark,2018), Mısır’da %6,9 (Mahfouz ve ark, 2014), İran’da %22,3- %31 (Mirzai ve ark,2014, Ranjbar ve Fattahi,2017) Irak’ta %7,3 (Al-Robaiee ve Al-Farwachi,2014) Vietnam’da %43,3(Nguyen, ve ark,2007), Hindistan’da %37,25(Joute ve ark,2016) ve Myanmar’da %82 (Khin, 2007) olarak bulunmuştur. Türkiye’ de ise *Cryptosporidium spp*’ nin buzağılarda ki prevalansı % 3,8–93 arasında değişmektedir (Sarı ve ark,2008; Yıldırım ve ark, 2012). Çalışmamız da elde ettiğimiz %72’lik oran Türkiye ve dünya ortalamasının üzerinde yer almaktadır.

Cryptosporidium parvum için aşı çalışmaları immunojenik potansiyeli olan, konak hücreye bağlanmayı sağlayan ve invazyondan sorumlu CSL, gp900, gp40, gp15/17, Cp 15/60, Cp23/27, Cp12 ve Muc4 üzerine yoğunlaşmıştır. Gp900, gp40, gp15/17 ve Cp23/27 antijenlerinin hayvan ve insanlarda hücreyel immun yanıt oluşturduğunu bulunmuştur (Boulter-Bitzer ve ark, 2007, Mead; 2014). *Cryptosporidium*’ un DNA bazlı aşı adayları olarak ise P2, Cp12, Cp15/60, Cp23, Cp21 ve COWP olabileceği, bunlardan Cp15 ve Cp23’ antijenlerinden elde edilen divalent aşının farelerde ki koruyuculuğunun daha fazla olduğu bulunmuştur (Liu ve ark, 2010; Yu ve ark, 2010, Benitez ve ark, 2011).

Dünya da birçok ülkede cinsel yollarla bulaşan hastalık olan trichomoniasis bildirimini zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. *T. vaginalis* enfeksiyonları kozmopolit bir dağılıma sahiptir ve tüm ırksal ve sosyoekonomik gruplarda tespit edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre her yıl yaklaşık 250 milyon yeni *T. vaginalis* enfeksiyonu saptanmakta ve bunun da yarısından fazlasının erkeklerde görüldüğü bildirilmektedir (WHO; 2019). Buna karşılık, yaygın *T. vaginalis* vakalarının %89'u kadınlar arasında bulunmaktadır (WHO, 2019). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, kullanılan yöntemlerin farklılığına bağlı olarak *T. vaginalis* görülme sıklığı %3-72,3 arasında değişmektedir (Aksoy ve Özkoç, 2005).

Trichomonas vaginalis'te kullanılabilir ticari bir aşı olmamasına karşın aşı adayı olarak sunulan antijenler mevcuttur. *T. vaginalis*'te α - aktinin geninin rekombinant olarak üretilmesiyle elde edilen antijenin 1 ay süreyle %100 koruyucu olabildiği, rekombinant antijenle aşılanan farelerde IgG, IFN- γ , IL-6, IL-17A ve IL-10 düzeyinde önemli ölçüde bir artış olduğu saptanmıştır (Xie ve ark, 2017). Yapılan bir diğer çalışmada rekombinant olarak ütilen ve kalsiyum taşınmasında önemli rol oynayan TvTRPV (*Transient Receptor Potential of T. vaginalis*)'nin farelerde deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlarda koruyucu etkisinin olduğu saptanmıştır (Mendoza-Oliveros ve ark, 2019). Bunun yanı sıra rekombinant olarak üretilen homosistein alfa gama-liyaz, elimine edici beta liyaz, adohikaz, prolin bakımından zengin P65'in *T. vaginalis* enfeksiyonlarına karşı aşı adayı antijenler olarak kullanılma potansiyelleri vardır (WEB-5, 2020).

Sistein proteazlar, papain ailesinde bulunurlar ve bu enzimlerin ana fonksiyonları proteinlerin parçalanmasını sağlamaktır. En bilinen sistein proteaz olan ve *Carica papaya*'dan izole edilen papainin sağlıktan gıda ve kimya endüstrisine kadar çok geniş bir kullanım alanı mevcuttur (Khaparde ve Singhal,2001). *Bromeliaceae* bitki ailesinin üyesi olan ananas bitkisinden izole edilen bromelainde sistein proteaz türevi olup sağlık alanında geniş kullanım alanına sahiptir. İlk kez 1957 yılında terapötik destek olarak kullanılabileceği bildirilmiş olan enzim, vücuttaki proteinleri ayrıştırıcı sindirici özelliğinden dolayı sağlık alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir (WEB-6, 2019). Sistein proteazlar aynı zamanda laminin, kollajen, fibronektin ve jelatin gibi bağ dokunun yapısal proteinlerini degrade ederler ve bu özelliklerinden dolayı debridman olarak kullanılma potansiyelleri de mevcuttur (Na ve ark, 2009). Çalışmamızda sistein proteaz olarak bilinen *cryptopain* ve TvCp39' un jelatin parçalama aktivitesinin olduğu saptanmıştır. *Cryptosporidium* parazite ait sistein proteaz inhibitörü olan cryptostatinin, cryptopainin jelatin parçalama aktivitesini inhibe edebildiği yine çalışmamızda gösterilmiştir.

Dünya genelinde parazitlere ait olan sistein proteazların rekombinant üretimi ve etkilerinin değerlendirilme çalışmaları oldukça azdır. Mevcut çalışmaların birçoğunda sistein proteazların biyokimyasal yapı ve özellikleri üzerine durulmuş olup, bu enzimlerin olası kematerapotik ajanlar olabileceği hususuna değinilmiştir. Bununla birlikte *Leishmania* parazitine karşı geliştirilen bir aşıda sistein proteazlar aşı antijeni olarak kullanılmaktadır (Shahbazi ve ark, 2015)

Papain benzeri proteazlar kanser yayılımında, artirit, osteoporoz ve mikrobiyal enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadırlar. Sistein proteaz inhibitörlerinin kullanılması ile hepait C, osteoporoz, osteoarthritis, sedef hastalığı, kanser yayılımının önlenmesi, bronşektazi ve nörolojik ağrıların giderilmesi gibi pek çok sağlık problemine çözüm bulunabileceği vurgulanmaktadır (Vizovisek ve ark,2020)

Patojenik protozoalarda bulunan sistein proteazlar, genellikle Klan CA sınıfının C1A ailesinde (papain süperailesi) yer alırlar ve bu organizmalarda ana virulans faktörleri olarak bulunurlar. Bugüne kadar parazitik protozoalarda karakterize edilen ve işlevi tanımlanan , *E. histolytica* (altı), *Leishmania spp.* (altı), *Plasmodium spp.* (beş), *T. gondii* (beş), *T. cruzi* (üç), *T. brucei* (iki) ve *Cryptosporidium spp.* (iki) olmak üzere toplamda 29 tane sistein proteaz vardır (Siqueira-Neto ve ark, 2018). Sistein proteazlar, parazitik türlerdeki en önemli işlevi parazitin konak hücre içine girebilme, konak hücre içerisinde hayatta kalabilmesidir. Bunun yanı sıra makrofaj proinflatuar yanıtın oluşturulması, konak hücre dışı matriksinin bozulması, parazitte ki yaşam döngüsü aşamalarının (enkistasyon- eksistasyon) gerçekleştirilmesi, parazit metabolizmasının modülasyonu ve otofajide sistein proteazların görevleri arasında yer almaktadır. Bazı protozoalarda ise, IgA, IgG ve hemoglobin degradasyonu, kan-beyin bariyerinin geçilmesinin sağlanması, ookist üretiminin artırılması, sporozoitlerin kan hücrelerine invazyonu, apikoplast gelişimi ve sitosolik proteinlerin sindirimi gibi spesifik görevleri mevcuttur (Abaza, 2019).

Sistein proteazlar hastalık prognozunda etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Sistein protezlara sahip olan parazitlerde prognoz daha ağır seyretmektedir. Örneğin amebik karaciğer hastalığı olan kişilerden izole edilen *Entamoeba* türlerinde yüksek oranda sistein proteaz ifadesi mevcuttur ve sistein proteaz inhibitörlerinin verilmesiyle hastalık sağaltımı sağlanmıştır (Keene ve ark, 1990; Stanley ve ark, 1995). Buna ek olarak sistein proteazların, bağırsak enflamasyonuna, kolitte doku hasarına ve bağırsak dışı enfeksiyonlarada neden olduğu saptanmıştır (Zhang ve ark, 2000; Lejeune ve ark, 2009). İnvaziv *E. histolytica*'ın klinik izolatları , kültür ortamında üretilen noninvaziv *E. dispar*'dan 10-1000 kat daha fazla sistein proteaz aktivitesine sahiptir (Reed ve ark, 1989). *Leishmania* parazitinin neden olduğu

lezyon büyüklüğünün de sistein proteazlarla ilişkili olduğu sistein proteazların inhibisyonu ile lezyonları küçüldüğü saptanmıştır (Mottram ve ark, 1996). Yaptığımız çalışmada da *Cryptosporidium spp.* şüpheli dışkı örneklerinde sistein proteaz enzimine sahip olanlarda hastalık seyrinin ağır olduğu ve alınan örneklerden 13'ünün hastalık nedeniyle öldüğü diğer vakalarda ise ölüm olmadığı saptanmıştır.

Sistein proteazlar parazitin yaşam döngüsünde ki tüm evrelerde eksprese olmazlar. Genellikle parazitin daha aktif olduğu dönemlerde eksprese olurlar. Örneğin; Cryptostatin ve cryptopain *Cryptosporidium* 'un hayat döngüsünde merozoit ve ookist evrelerinde eksprese olurlar (Na ve ark, 2008). *Leishmania* türlerinde bulunan sistein proteazlar memeli amastigot evresinde böceklerde geçirilen promastigot evresinden daha fazla eksprese olurlar. Bunun nedeninin konak hücreye girişte sistein proteazların ana virulans faktörü olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Mottram ve ark, 1992).

Sistein proteazlar parazitik organizmalar için ana virulans faktörü olmasına rağmen çalışmamızda incelediğimiz tüm örneklerde sistein proteaz saptanamamıştır. Bunun nedeninin;

1)Sistein proteazların parazitlerin belli bölgelerinde lokalize olabilmeleri: *Entamoeba histolytica*'da bulunan sistein proteazlardan EhCP1 intrasellüler veziküllerde, EhCP2 iç ve dış hücre membranlarında, EhCP5 ise hücrenin yüzeyinde bulunur (Siqueira-Neto ve ark, 2018).

2) Sistein proteaz ekspresyon mekanizmasını düzenleyen çeşitli etkenlerin mevcut olması: *T. vaginalis*' te bulunan çoğu sistein proteaz demirle düzenlenmektedir (Arroyo ve ark,2015). Sistein proteazların salınımı enfeksiyon sırasında ki çevresel şartlara bağlı olarakta düzenlenebilmektedir (Alderete ve Provenzano, 1997). *Trichomonas vaginalis*'te bulunan sistein proteazların eksprese olmalarında TVV dsRNA virüslerinde etkili olabildikleri söylenmektedir. *Leishmania major*'de bulunan papain benzeri sistein proteaz olan kalpaine kalsiyum ile düzenlenmektedir (Branquinha ve ark, 2013) olabileceği düşünülmektedir.

Sistein proteazlar parazitik organizmalar için aşı olabilme potansiyeline sahip iken, proteaz inhibitörleri de söz konusu bu organizmalar için etkili kemoterapitik ajanlar olarak ön plana çıkmaktadır.

Trypanosoma parazitine duyarlı olan sığırlara antijen olarak verilen sistein proteazlar, sığırlarda kısmi koruma sağlamaktadır (Playfair ve ark, 1990) Sistein proteaz inhibitörü olarak kullanılan K11777, WRR-483, Cz007, Cz008 ve tetra-floro-fenoksi-metil ketonların *Trypanosoma* parazitinin neden olduğu chagas hastalığının tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Abaza, 2019).

Leishmania türlerinde bulunan Katepsin L ve B benzeri sistein proteazlar parazit için olası aşı potansiyelleri olarak görülürken, bu enzimlerin inhibitörleri kemoterapatik ilaç olarak kullanılmaktadırlar. 1999 yılında Selzer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ZLIII43A, ZLIII115A ve K11002 adlarında ki sistein proteaz inhibitörlerini deneysel olarak *Leishmania* ile enfekte edilen farelerde denemişlerdir. İnhibitör uygulanan farelerde *Leishmania* lezyonlarının küçüldüğünü ve tedavi sürecinin hızlandığını saptamışlardır (Selzer ve ark,1999).

2013 yılında Branquinha ve arkadaşlarının ve 2017 yılında Chavez-Fumagalli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda *Leishmania* türlerinde bulunan kalsiyum bağımlı sistein proteaz türevi calpain'nin insanda *Leishmania* türlerine karşı potansiyel ilaç ve aşı hedefi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Branquinha ve ark,2013; Chavez-Fumagalli ve ark, 2017).

Shahbazi ve arkadaşlarının İran Pasteur Enstitüsünde yaptıkları çalışmada; köpek visseral leishmaniasise karşı; sistein proteaz ve A2 geni kullanılarak aşı geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada; *Leishmania donovani*' nin A2 geni ve sistein proteaz genleri (CPA ve CPB CTE) rekombinant *Leishmania tarentolae*' ye eksprese edilmiş ve *L. infantum*'a karşı immünojenikliği ile koruyucu bağışıklığı değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda aşılanan hayvanlar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında; önemli ölçüde IgG2 yükselişi saptanırken, IL-10 düzeyi düşük seviyede kalmış IgG1,IFN- γ ve TNF- α düzeylerinde artış gözlenmemiştir. Aşılanan köpeklerde yüksek DTH yanıtı oluşmuş ve düşük parazit yükü görülmüştür (Shahbazi ve ark, 2015).

Musyoka ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada hemoglobin bozunma sürecini katalize eden *Plasmodium falciparum*'un falcipainlerini (falcipain-2 ve falcipain-3), onaylanmış ilaç hedefleri olarak sunmuşlardır. Çalışmalarında *Plasmodium* türlerinde bulunan falcipainler ve bunların homologlarına karşı potansiyel peptid önleyici ilaçları belirlemeyi amaçlamışlardır. 11 farklı peptid önleyici faktörle çalışma yapmış, bu bileşiklerin kolesterol benzeri çekirdekleri olduğu için insanda iyi tolere edilebileceğini saptamışlardır (Musyoka ve ark, 2016).

Sistein proteaz inhibitörü olarak kullanılan gallinamide A ve symprostatin-4' ün *P. falciparum* etkeninin neden olduğu sıtmanın tedavisinde kullanılabilme potansiyellerinin olduğu vurgulanmaktadır (Abaza, 2019)

Kumari ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada *P. falciparum*' da bulunan bir çeşit sistein proteaz olan metakaspaz-2 in inhibisyonu ile apoptozis benzeri parazit ölümünün gerçekleştiği ve parazitin yaşam döngüsünü tamamlayamadığı saptanmıştır.

İnhibisyonu sağlayan maddelerin anti- malaryal ilaç olarak kullanılabilceği vurgulanmıştır. (Kumari ve ark, 2020).

Zhao ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada *Toxoplasma gondii*'de bulunan sistein proteazlar olan TgCPB/TgCPL' nin immünejenik etkisi BALB-c türü farelerde test edilmiştir. Yapılan bu çalışmada TgCPB/TgCPL'nin ayrı ayrı verildiği durumlarda IFN- γ ve IgG seviyesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Antijen birlikteliğine dayalı divalent uygulamada ise IFN- γ ve IgG seviyesinde ki artış antijenlerin ayrı ayrı verildiği duruma göre yaklaşık iki katı şeklindedir (Zhao ve ark, 2013)

Ndao ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada; *Cryptosporidium parvum*' da bulunan papain benzeri sistein proteaz olan cryptopain inhibitörü olan N-methyl piperazine-Phe-homoPhe-vinylsulfone phenyl (K11777)' yi fare modellerinde kullanarak cryptosporidiosis'e karşı potansiyel ilaç olma potansiyelini araştırmışlardır. K11777 in vivo ve in vitro ortamlarda herhangi bir toksik etki göstermemiş buna ek olarak, ookist sayısında belirgin bir azalma sağlanmıştır.(Ndao ve ark, 2013). Buna ek olarak K11777' in Chagas hastalığının tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılabilceği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Engel ve ark, 1998; Barr ve ark, 2005).

Trichomonas vaginalis'te bulunan sistein proteazların immünejenik etkisinin araştırılmasına yönelik pek çok çalışma mevcuttur. Hernandez ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada 62 kDa boyutunda ki sistein proteazın parazitin konak hücre yüzeyine penetrasyonu önemli ölçüde azalttığı ve özellikle kolera toksinin adjuvan olarak kullanılmasıyla deneysel enfekte farelerde enfeksiyonun %5'lere kadar gerilediği saptamışlardır (Hernandez ve ark, 2004). Jia ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada rekombinant olarak üretilen TvCP3 ve TvCP3C'nin deneysel enfekte farelere verilmesiyle yüksek düzeyde antikor oluşumuna neden olduğu saptanmıştır (Jia ve ark, 2009). Carvajal-Gamez ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada putresin adı verilen kimyasal bir maddenin sitotoksik etkili sistein proteaz olan TvCP39' un etkinliğini %80 oranında azalttığını, bu sistein proteazın proteolitik aktivitesini ve hücre lokalizasyonunu düzenlediğini saptamışlardır (Carvajal-Gamez ve ark, 2014). Puente Rivera ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada sistein proteaz inhibitörü olan Trichocystatin-2' nin HeLa hücre hattında sistein proteazların neden olduğu sitotoksik etkiyi azalttığı saptanmıştır (Puente- Rivera ve ark, 2014).

Jimenez ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada parazite ait sistein proteaz içeren ekstretevar- sekretevar proteinler deneysel enfekte BALB-c türü farelere verilerek immunizasyon sağlanmış ve konakta humoral ve hücreyel immun yanıtın değerlendirilmesi

yapılmıştır. Bu çalışmada aşılanan farelerde yüksek düzeyde IgG ve IgE tespit edilmiş bunun yanı sıra IL-4, IL-5 ve IL-10 miktarlarında da önemli düzeyde bir artış meydana gelmiştir. Söz konusu proteinler ısı ve sistein proteaz inhibitörü olan E64 ile muamele edilip uygulandığında çok daha düşük IgG, IgE, IL-4, IL-5 ve IL-10 seviyeleri tespit edilmiştir. Çalışmada E64 uygulanması ile yalnızca sistein proteazlar inhibe olduğu için immunizasyonu sağlayan ana faktörün sistein proteazlar olabileceği vurgulanmıştır (Jimenez ve ark, 2009). Enkistasyon ve ekskistasyon süreçlerini belirleyen ve bu süreçlerde aktif rol oynayan sistein proteazlar, çoğu parazitte olduğu gibi *Giardia* türlerinde de potansiyel tedavi yöntemleri olarak öne çıkmaktadır. Parazite ait sistein proteaz olan EHCP (katepsin- C benzeri enkistasyon spesifik sistein proteaz) parazitin kist duvarının oluşumunda görev almaktadır. *Giardia*' da tanımlanan sistein proteazların (SP) bir diğeri ise ekskistasyondan sorumlu olan GICP2'dir. Her iki sistein proteazın da inhibasyonu ile enkistasyon ve ekskistasyon süreçleri engellenmiştir. Bu parazitin yaşam döngüsünü tamamlayamamasına neden olduğu için bu inhibitörler *Giardia* için potansiyel terapötik hedefler olarak gösterilmektedirler (Tian ve ark, 2010).

Melendez- Lopez ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada sistein proteaz inhibitörleri olan K11777 ve WRR483, rekombinant EhSP1'e karşı insan kolon hücre hattında denemişlerdir. Her iki inhibitörde güçlü enzim inhibisyonu sağlamış ve bu sayede kolonda parazit yükünün önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Melendez-Lopez ve ark,2007). Cornick ve Shadee' nin 2017 yılında yaptıkları derlemede; *Entamoeba histolytica* ' da bulunan sistein proteazlar olan EhSP'lerin konak hücre adezyonunda, konak immun sisteminden kaçışta, mukus bariyerinin parçalanmasında kısacası parazitin konak hücre adaptasyonu ve patogenez tablosunda kilit rol oynadığı gösterilmiştir. (Cornick ve Chadee, 2017).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Cryptosporidium ve *Trichomonas vaginalis*' te bulunan sistein proteazların klonlandığı ve rekombinant üretildiği bu çalışmada;

1) Sistein proteazların *Cryptosporidium* ve *Trichomonas vaginalis*' teki yaygınlığında belirlenmiştir. Sistein proteazların parazitlerin patogenezinde ki önemli olduğu klinikle ilişkilendirilerek saptanmaya çalışılmıştır. Parazitlerde bulunan diğer virulans faktörlerin de taranmasıyla çok daha sağlıklı veriler elde edilebileceği öngörülmektedir.

2) Sistein proteazların diğer pek çok parazitte olduğu gibi aşı çalışmalarında kullanılabileceği, bunun için *Cryptopain* ve *TvCp39* genlerinin rekombinant üretiminin aşı çalışmalarının ilk basamağı olabileceği düşünülmektedir.

3) Enfektif hücre kültürü yardımıyla rekombinant olarak üretilen *Cryptostatin* ve *Cryptopain* geninin *Cryptosporidium* parazitinin hücre invazyonunda nasıl görev aldığı saptanabileceği ön görülmektedir.

4) *TvCp39* geninin hücre kültüründe kontrollü çalışmalarının yapılarak sitotoksik etkilerinin gözlemlenebilmesi sağlanabilir.

5) Söz konusu genlerin parazitlerin hızlı tanı kitleri için kullanılabilme potansiyellerinin olduğu varsayılmaktadır.

6) Rekombinant olarak üretilen sistein proteazların fibronektin, kollajen gibi dokunun yapısal proteinlerini degrade edebilme özelliklerinden yararlanılarak, hasarlı dokuda debridman olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abaza SM.** Expression of cysteine proteinases and cystatins in parasites and use of cysteine roteinase inhibitors in parasitic diseases. *Part III: Protozoa* 2019, 12(1), 8-17
- Abe N, Sawano Y, Yamada K, Kimata I, Iseki M.** *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. *Vet. Parasitol.* 2002, 108, 185-193.
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V.** Complete genome sequence of the apicomplexan. *Cryptosporidium parvum* 2004, 304, 441-445.
- Adal KA, Sterling CR, Guerrant RL.** *Cryptosporidium* and Related Species. In: Infections of the Gastrointestinal Tract. Eds, M.J Blaser, P.D Smith, J.I Ravdin, H.B Greenberg, R.L Guerrant. New York: Raven Press, 1995, 1107-1128.
- Akarsu GA.** Nonspesifik vaginal akıntı şikayeti olan poliklinik hastalarında *Trichomonas vaginalis* araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2006, 30, 19-21.
- Akdemir C, Keskin N, Çoksüer H.** Kütahya'da vajinal akıntılı olgularda *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığının klasik mikroskopi ve DNA hibridizasyon yöntemleriyle araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2010, 6(4), 161-166.
- Aksoy Ü, Özkoç S.** Barsak ve genital protozoon hastalıklarında tedavi. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed. Akısü Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayınları, No:20, İzmir, 2005, 33-51.
- Al-Braiken FA, Amin A, Beeching NJ, Hommel M, Hart CA.** Detection of *Cryptosporidium* among diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Suudi Arabia. *Ann Trop Med Parasitol* 2003, 97, 505-510.
- Al-Robaiee I. and Al-Farwachi M.** Direct ELISA aided coprological diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection in diarrheic neonatal calves in Mosul city, Iraq. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2014, 1(1), 8-10.

Al-Qubaji M. Diyareli çocuk dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* oocyst'lerinin araştırılması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2005.

Alderete JF, Provenzano D. The vagina has reducing environment sufficient for activation of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases. *Sexually Transmitted Infections* 1997, 73(4), 291–296.

Alvarez- Sanchez ME, Avila- Gonzalez L, Becerril- Garcia C, Fattel-Facenda IV, Ortega Lopez J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb. Pathog* 2000, 28, 193-202.

Alvarez- Sanchez ME, Avila- Gonzalez L, Becerril- Garcia C, Fattel- Facenda V, Ortega-Lopez J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (Cp65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity, *Microb. Pathog.* 2000, 28, 193-202.

Alvarez- Sanchez ME, Carvajal Gomez BI, Solano-Gomez E, Martinez- Benitez M, Garcia AF, Alderete JF, Arroyo R. Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2008,40, 2442-2451.

Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji. Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları, 2002, 170-172.

Amadi B, Mwiya M, Musuku J. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002, 360, 1375– 1380.

Amadi B, Mwiya M, Sianongo S. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infect Dis.* 2009, 9, 195.

Anderesson MD. DNA 6X Loading Dye. Cancer Center. <http://www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html>. (02.06.2019).

Arrowood MJ. Diagnosis. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer (ed). Crc pressus 1997, 43-64.

Arroyo R, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cell. *Infect. Immun* 1989, 57, 2991-2997.

Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 1992, 6(7), 853-862.

Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF. Signaling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 1993,7, 299–309.

Arroyo R, Alderete JF. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinase bind to host epithelial cell and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.* 1995, 26, 279-285.

Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE , Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, and Ortega-López J. *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *Bio Med Research International* 2015, 1-25.

Ataş AD. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2006-2018 Yılları Arasında Saptanan Patojenik Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Türkiye Parazit Derg* 2020, 44(1), 25-30.

Aurrecoechea C, Barreto A, Brestelli J. EuPathDB: the eukaryotic pathogen database. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, 684–691.

Ayele A, Seyoum Z, Leta S. *Cryptosporidium* infection in bovine calves: Prevalence and potential risk factors in Northwest Ethiopia. *BMC Res. Notes* 2018, 11(1), 105.

Baiomy AMS, Al-Hamid K A M, Ghannam M A M , Shahat SAA , Al-Saadawy Ahmed SK. Opportunistic Parasitic Infections Among Immunocompromised Egyptian Patients. *J Egypt Soc Parasitol* 2010, 40(3),797-808

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites:review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. *Water Res.* 2011,45, 6603–6614.

Bannai H, Nishikawa Y, Seo J, Nakamura C, Zhang S, Kimata I, Takash MAY, LI J, Igarashi I, Xuan X. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay

using recombinant p23 for the detection of antibodies to *Cryptosporidium parvum* in cattle. *J. protozool. Res.* 2006,16, 9-15

Bardaker F, Yenidünya AF. Moleküler biyoloji teknikleri I: nükleik asit analiz teknikleri. Moleküler Biyoloji. 2. Baskı. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. (eds). Nobel Yayınları No:1170, Ankara, 2010, 521-555.

Barnes DA, Bonnin A, Huang JX, Gousset L, Wu J, Gut J, Doyle P, Dubremetz JF, Ward H, Petersen C. A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Mol. Biochem. Parasitol* 1998, 96, 93–110.

Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(12), 5160–5161.

Barry JD, Ginger ML, Burton P, and McCulloch R. Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *International Journal for Parasitology* 2003; 33(1), 29–45.

Bayramoğlu Ö, Pekmezci D, Başarı F. Adana İli gıda çalışanlarında *Giardia* ve *Cryptosporidium* varlığının farklı şekilde araştırılması, 2012.

Benchimol M, Monteiro SP, Chang TH, Alderete JF. Virus in *Trichomonas* an ultrastructural study. *Parasitology International* 2002, 51(3), 293- 298.

Benitez A, Priest JW, Ehigiator HN, McNair N, Mead JR. Evaluation of DNA encoding acidic ribosomal protein P2 of *Cryptosporidium parvum* as a potential vaccine candidate for cryptosporidiosis. *Vaccine* 2011, 29(49), 9239–9245.

Bednarska M, Jankowska I, Pawelas A, Piwczyńska K, Bajer A, Wolska-Kuśnierz B, Welc-Falęciak R. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitology Research* 2018, 117(9), 2869–2879.

Berahmat R, Spotin A, Ahmadpour E, Mahami-Oskouei M, Rezamand A, Aminisani N, Mikaeili-Galeh T. Human cryptosporidiosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology Research* 2017, 116(4), 1111–1128.

- Birdal AF, Beyhan YE.** Distribution of Intestinal Parasites in Patients Hospitalized in Child Intensive Care Unit. *Turkiye Parazitol Derg* 2018, 42,113-117.
- Binnie C, Aphale JS, Bourgault R, Krygsman P, Liano L, Walezyk E, Malek LT.** Isolation and characterization of 2 genes encoding protease associated with the mycelium of *Streptomyces lividans* 66. *Journal of Bacteriology* 1995, 177, 6033-6040
- Bonnin A, Ojcius DM, Souque P, Barnes DA, Doyle PS, Gut J, Nelson RG, Petersen C, Dubremetz JF.** Characterization of a monoclonal antibody reacting with antigen-4 domain of gp900 in *Cryptosporidium parvum* invasive stages. *Parasitol. Res.* 2001, 87, 589–592.
- Boulter Bitzer JI, Lee H, Trevors JT.** Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnol Adv.* 2007, 25(1), 13–44.
- Bouzid M, Tyler KM, Christen R, Chalmers RM, Elwin K, Hunter PR.** Multi-locus analysis of human infective *Cryptosporidium* species and subtypes using ten novel genetic loci. *BMC Microbiol.* 2010,10,213.
- Bouzid M, Hunter PR, Chalmers R. M, Tyler KM.** *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence Clinical. *Microbiology Reviews* 2013,26,115–134
- Branquinha MH, Marinho FA, Sangenito LS, Oliveira SSC, Gonçalves KC, Ennes-Vidal V, d'Avila-Levy CM. and Santos ALS.** Calpains: Potential Targets for Alternative Chemotherapeutic Intervention Against Human Pathogenic Trypanosomatids. *Current Medicinal Chemistry* 2013, 20, 3174-3185
- Bull S, Chalmers R, Sturdee AP, Curry A, Kennaugh J.** Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 1998, 77, 195–197.
- Burgu A.** Türkiye’de buzağılarda *Cryptosporidium*’ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmaları. *A. Ü. Vet. Fak. Der.* 1984, 31(3), 573-585.
- Cabada MM, White AC Jr.** Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Curr Opin Infect Dis.* 2010, 23,494–99.

Cacciò S, Homan W, Van Dijk K, Pozio E. Genetic polymorphism at the β -tubulin locus among human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 170(1),173-179.

Caccio SM, Chalmers RM. European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy 2016, 22, 471-480.

Caffrey CR, Hansell E, Lucas KD. Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol* 2001,118, 61-73.

Caffrey CR, Steverding D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009, 167, 12–19.

Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 2004, 38, 818-862.

Carlton J M, Hirt RP, Silva J C, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S. Draft genome sequence of sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 2007, 315, 207-212

Carvajal-Gamez, BI, Quintas-Granados, LI, Arroyo R, Vázquez-Carrillo LI, Ramón-Luing, LD. los A, Carrillo-Tapia E & Alvarez-Sánchez M. E. Putrescine-Dependent Re-Localization of TvCP39, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytotoxicity. *PLoS ONE* 2014, 9(9), e107293.

Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing kriptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology* 1991, 44, 445-45.

Cengiz Z, Yılmaz H, Beyhan YE, Çiçek M. A Comprehensive Retrospective Study: Intestinal Parasites in Human in Van Province. *Turkiye Parazitol Derg* 2019,43(2), 70-3.

Cevallos A, Zhang X, Waldor MK, Jaison S, Zhou X, Tzipori S, Neutra MR, Ward HD. Molecular cloning and expression of a gene encoding encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect. Immun.* 2000, 68, 4108–4116.

Chavez-Fumagalli MA, Schneider MS, Lage DP, Machado-de- Avila RA, Coelho EAF. An in silico functional annotation and screening of potential drug targets derived from

Leishmania spp. hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Experimental Parasitology* 2017, 176, 66-74

Chen X, Keithly JS, Paya CV, Russo L, Nicholos F. Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine* 2002, 346(22), 1723-1731.

Cheon SH, Kim SR, Song HO, Ahn MH, Ryu JS. The dimension of *Trichomonas vaginalis* as measured by scanning electron microscopy. *The Korean journal of parasitology* 2013, 51(2), 243.

Cheun Hyeng-II C, Byung-Suk D, Won Ma B., La Goo S, Hyeong C, Mi-jung Ji, Won-JL. Development of a Diagnostic Kit to Detect *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* Osong. *Public Health Res Perspect* 2013, 4(3), 146-151

Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12, 554–563.

Cornick S, Chadee K. *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*, 2017, 5(1)

Cuervo P, Cupolillo E, Britto C. Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *Journal of Proteomics* 2008, 71(1).109–122

Current W, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991, 4, 325-358

Çiçek M. ve Yılmaz H. Prevalence of *Cryptosporidium spp.* and other intestinal parasites in children with diarrhea. *Dicle Tıp Derg* 2011, 38(1), 70-75.

Çulha G, Hakverdi UA, Zeteroğlu Ş, Duran N. Vaginal akıntı ve kaşıntı şikayeti olan kadınlarda *T.vaginalis* yaygınlığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2006, 30 (1), 16- 8.

De Jesus JB, Cuervo P, Junqueiraetal M. Application of two dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Mass Spectrometry* 2007, 42(11), 1463– 1473,2007.

Değerli S, Şalk S, Malatyalı E. Sivas'ta vaginit ön tanılı hastalarda *T.vaginalis* sıklığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2011, 35, 145-147.

Değirmenci A, Sevil N, Güneş K, Yolasığmaz A, Turgay N. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında 2005 Yılı Boyunca Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2007, 31 (2), 133-135

Delafosse A, Chartier C, Dupuy MC, Dumoulin M, Pors I. and Paraud C. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in Western France. *Prev. Vet. Med.* 2015, 118(4), 406-412.

Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, LeChevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. microbiol* 1999,65 (8),3427-3432.

Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis:epidemiology and impact. *Microbes and Infection.* 2002, 4, 1059-1066.

Dirim D, Turgay N, Alkan M Z. Bir Cryptosporidiosis olgusunun Kinyoun Asit-Fast boyası ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile takibi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2003, 27, 237-239.

Doğan N, Akgün Y. İshalli olgularda *Cryptosporidium* oocystlerinin araştırılması. *T. Parazitol. Derg.* 1998, 22(3), 243-246.

Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin Beş Yıllık Bağırsak Paraziti Prevalansının Türlerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008,32 (2), 120 - 125

Dou Z. and Carruthers VB. Cathepsin proteases in *Toxoplasma gondii*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2011, 712, 49–61.

Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Pres, 1990, 199.

Dupont C, Bougnoux ME, Turner L, Rouveix E, Dorra M. Microbiological findings about pulmonary cryptosporidiosis in two AIDS patients. *J. Clinical Microbiol.* 1996, 34(1), 227-229.

Duran K, Bozacı E, Karahan AH. Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi. Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü, Tekstil ve Konfeksiyon, 2007.

Emre Z, Alabay M, Düzgün A, Çerçi H. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal specimens. *Veterinary and Animal Sciences* 1997, 21, 293-296.

Engel JC, Doyle PS, Hsieh I. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1998, 188(4), 725-734.

Eren C., Mete Ö., Akpolat N, Çiçek M. Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve Modifiye Aside Dirençli Boyama Yöntemi ile Araştırılması 2012.

Erickson MC, Ortega YR. Inactivation of protozoan parasites in food, water and environmental systems. *J. Food Prot. Rev.* 2006, 69(11), 2786-808.

Erman N, Beyazıt A, Öz İ. İzmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda Cryptosporidiosis'in yaygınlığı. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2000, 25(39), 33-38.

Ertabaklar H, Ertuğ S, Kafkas S, Odabaşı AR, Karataş E. Vajinal Akıntılı Olgularda *Trichomonas vaginalis* Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2004,28(4), 181-184.

Ertabaklar H, Caner A, Doşkaya M, Demirtaş LO, Toz SÖ, Ertuğ S, Guruz Y. Trichomoniasis tanısında polimeraz zincir reaksiyonu ile mikroskopi ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2011,35, 1-5.

Fahey TMD. Cryptosporidiosis. *Infectious Disease Update* 2003,10(2),75-80.

Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. Cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 1986,50,458-483

Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *App. and Env.Microbiol* 1997, 1076-1074.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1305-1322.

Fayer R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: General Biology. Fayer, R, Xiao, L, Boca Raton (eds), CRC Press, 2008, 1–41.

Fayer R, Orlandi P, Perdue ML. Virulence factor activity relationships for hepatitis E and *Cryptosporidium*. *J. Water Health* 7(Suppl 1): 2009, 55–63.

Figueroa-Angulo EE. , Rendo'n-Gandarilla FJ. , Puente-Rivera J, Jaeson S. Calla-Choque R E, Ca'rdenas-Guerra R. , Ortega-Lo'pez J, Laura I, Quintas-Granados M. Alvarez-Sa'nchez E, Arroyo R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* 2012,14, 1411- 1427

Foster DM, Smith GW. Pathology of Diarrhea in Calves, Smith RA, Smith GS. (Editors), Veterinary Clinics of North America. *Food Animal Practice – Bovine Neonatology*. 2009, 25(1), 13-21.

Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. ASM Pres, Washington DC, Third (eds), 1997, 59-63.

Garcia LS, Shimizu RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* Antigens in Human Fecal Specimens Using the ColorPAC Combination Rapid Solid-Phase Qualitative Immunochromatographic Assay. *J Clin Microbiol* 2000, 38(3),1267-1268.

Gasser RB, O'Donoghue P. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*1999, 29, 1379-1413.

Girouard D, Gallant J, Akiyoshi DE, Nunnari J, Tzipori S. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *J. Parasitol.* 2006,92, 399–400

Goldoft MJ, Todd D. Cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.* 2008,137(1),1-4.

Gookin JL, Nordone SK, Argenzio RA. Host Responses to *Cryptosporidium* Infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002,16, 12 – 21.

Gong C, Cao XF, Deng L, Li W, Huang XM, Lan JC. Peng GN. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. *Parasite* 2017; 24, 1.

Göz Y, Gül A, Aydın A. Hakkari Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* sp.'nin Yaygınlığı. *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007, 18 (2),37-40.

Griffiths KJ, Balakrishnan R, Widmer G, and Tzipori, S. Paromomycin and Geneticin Inhibit Intracellular *Cryptosporidium parvum* without Trafficking through the Host Cell Cytoplasm: Implications for Drug Delivery. *Infection and Immunity* 1998, 3874-3883.

Guerrant DI, Moore SR, Lima AA, Patrick PD, Schorling JB, Guerrant RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four–seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61,707–713.

Gupta R, Beg QK, Lorenz P. “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications”, *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 59, 15-32.

Gül A, Çiçek M, Kılınç Ö. Prevalence of *Eimeria spp*, *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* in calves in the Van Province. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008, 32 (3), 202- 204.

Gün H, Tanyüksel M, Haznedaroglu T. Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması. *T. Mikrobiyol. Cem. Derg.* 1994, 24, 116-119.

Hawash Y. Evaluation of an Immunoassay-Based Algorithm for Screening and Identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* Antigens in Human Faecal Specimens from Saudi Arabia Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Parasitology Research* 2014, 6.

Hazer Y. Afyonkarahisar bölgesindeki risk gruplarında *Cryptosporidium parvum* araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2007.

Heiges M, Wang H, Robinson E, Aurrecochea C, Gao X, Kaluskar N, Rhodes P, Wang S, He CZ, Su Y, Miller J, Kraemer E, Kissinger JC. 2006. CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Res.* 2003, 34, 419–D422.

Heine P, McGregor JA. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clin Obstet Gynecol* 1993,36,137-144.

Hernandez-Gutierrez R, Ortega-L’opez, J. and Arroyo R. A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 2003, 50,696–698.

Hernandez H, Sariego I, Garber G, Delgado R, Lopez O, Sarracent J. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection mice. *Parasite Immun* 2004, 26,119-125.

Hewitt RG, Yiannoutsos CT, Higgs ES. the AIDS Clinical Trial Group. Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 2000, 31, 1084–1092.

Hijawi N. *Cryptosporidium*: in vitro cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture, Eds: Thompson, R.C.A, Armson, A,Ryan, U.M, from molecules to disease. Amsterdam: Elsevier, 2003, 233-253.

Hijawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan U, Olson, ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int. J. Parasitol* 2004, 34, 769–777.

Hobbs MM, Sena AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect* 2013, 89(6), 434-438

Honigberg B. Trichomonads parasitic in humans. Springer Science and Business Media 2012, 7-21.

Haupt E, Bushen OY, Sam NE, Kohli A, Asgharpour A, Ng CT. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:520–522

Huang KY, Chien KY, Lin YC. A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 2009,104(4) 927–933.

Huang R, Que X, Hirata K, Brinen L.S, Lee J.H, Hansell E, Engel J, Sajid M, Reed S. The cathepsin L of *Toxoplasma gondii* (TgCPL) and its endogenous macromolecular inhibitor, toxostatin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009, 164 (1), 86-94.

Huang KY, Huang PJ, Ku FM, Lin R, Alderete JF, and Tanga P. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infection and Immunity* 2012, 80(11), 3900–3911.

Huang L, Zhu H, Zhang S, Wang R, Liu L, Jian F, Ning C, Zhang N. An in vitro model of infection of chicken embryos by *Cryptosporidium baileyi*. *Exp. Parasitol.* 2014,147, 41–47.

Ibanez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Aran VJ, Escario JA, Gomez-Barrio A, Alderete JF. Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in *Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among *Trichomonas* species. *Parasitology International* 2014, 63, 427-431.

Iqbal A, Goldfarb DM, Slinger R, Dixon, BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in diarrhoeic patients in the Qikiqtani Region, Nunavut, Canada. *International Journal of Circumpolar Health* 2015 74(1), 27713.

Janoff NE, Reller BL. *Cryptosporidium* species, o proteon protozoan. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25(6), 967-975.

İçen H, NB Arserim, N Işık, C Özkan and Kaya A. Prevalence of four enteropathogens with immunochromatographic rapid test in the feces of diarrheic calves in east and southeast of Turkey. *Pak Vet J* 2013, 33(4): 496-499.

Jenkins MC, Trout J, Abrahamsen MS, Lancto CA, Higgins J, Fayer R. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *Journal of Microbiological Methods* 2000, 43, 97-106.

Jia WZ, Li Z, Zhao L, Nie FF, Zhao-Rong Lun ZR. Cloning, expression and immunogenicity analysis of cysteine proteinase 3 of *Trichomonas vaginalis* Chinese. *Journal of Parasitology & Parasitic Diseases* 01 Dec 2009, 27(6):483-487.

Jimenez JC, Fontaine J, Grzych JM, Capron M, & Dei-Cas E. Antibody and cytokine responses in BALB/c mice immunized with the excreted/secreted proteins of *Giardia intestinalis*: the role of cysteine proteases. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2009, 103(8), 693–703.

Joute JR, Gill JPS, Singh BB. Prevalence and molecular epidemiology of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves in Punjab (India). *J. Parasit. Dis.* 2016, 40(3): 745-749.

- Kang JM, Ju HL, Yu JR, Sohn WM, Na BK**, Cryptostatin, a chagasin-family cysteine protease inhibitor of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 2012, 139(8), 1029-1037
- Karaman Ü, Daldal N, Özer A, Enginyurt Ö, Ertürk Ö**. Incidence of *Cryptosporidium spp.* in the human population of Malatya in Turkey. *Acta Medica Mediterranea* 2015, 31: 263
- Karaman, Ü, Kolören, Z, Seferoğlu, O, Ayaz, E, Demirel, E**. Samsun İl ve İlçelerinden Alınan Çevresel Sularda Parazitlerin Varlığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2017, 41, 19-21.
- Karanis P, Aldeyarbi HM**. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int. J. Parasitol* 2011, 41, 1231–1242.
- Keene WE, Hidalgo ME, Orozco E**. *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol* 1990, 71(2), 199-206.
- Khaparde SS, Singhal RS**. Chemically Modified Papain for Applications in Detergent Formulations. *Bioresource Technology* 2001, 78, 1-4.
- Khin KL**. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and other Gastrointestinal Parasites in Dairy Calves in Mandalay, Myanmar. MSc Thesis, Chiang Mai University and Freie Universität Berlin, 2007.
- Kissinger JC**. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis: Genomics, Fayer, R, Xiao, L, CRC Press, Boca Raton, FL, (eds) 2008, 43–56.
- Kooi C, Sokol PA**. Differentiation of thermolysins and serralytins by monoclonal antibodies. *J. Med. Microbiol* 1996, 45, 219-225.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF**. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 2013, 382, 209–222.
- Krull TM**. Studien zur Bedeutung der Kälbercryptosporidiose und deren medikamenteller Bekämpfung. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss. 2000.

- Kuman A, Altıntaş N.** Protozoan Hastalıkları. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1996, 71-78.
- Kumar CG, Takagi H.** Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 1999,17, 561–594.
- Kumari V, Sankar S, Prasad KM , Kashif M, Kalia I, Rai R, Singh AP, Pandey KC.** A Nonpeptidyl Molecule Modulates Apoptosis-like Cell Death by Inhibiting *P.falciparum* Metacaspase-2. *Biochem J* 2020,23.
- Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ, Singh BN.** Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb. Pathog.* 2008, 44, 197-203.
- Lammie PJ, Moss DM, Brook Goodhew E.** Development of a new platform for neglected tropical disease surveillance. *Int J Parasitol.* 2012, 42, 797–800.
- Langer RC, Riggs MW.** *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999, 67,5282–5291.
- Laskowski M and Kato I.** Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry* 1980, 49, 593–626.
- Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF.** Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* Infection. *Microbes and Infection* 1999, 2,141–148.
- Lehker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF.** Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 1990,171,2165-2170
- Lehker MW, Alderete JF.** Biology of trichomonosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2000,13, 37-45.
- Lejeune M, Rybicka JM, Chadee K.** Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* 2009, 4, 105-118.
- Leng X, Mosier DA, Oberst RD.** Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *App. Env. Microbiol.* 1996, 62(2), 643-647.

León-Félix J, Ortega-López J, Orozco-Solís R and Arroyo R. Two novel asparaginyl endopeptidase-like cysteine proteinases from the protist *Trichomonas vaginalis*: their evolutionary relationship within the clan CD cysteine proteinases. *Gene*, 2004, 335(1-2), 25–35.

Levine ND. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *J. Protozool.* 1984,31, 94–98 .

Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40(7), 2335-2338.

Lindmark DG, Müller M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Trichomonas foetus* and its role in pyruvate metabolism. *J.Biol.Chem* 1973, 248, 7724.

Lindmark DG, Müller M. Hydrogenosomes in *T.vaginalis*. *J.Parasitol* 1975, 61, 552.

Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Black RE. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2010, 379:2151–2161.

Lombardelli JA, Tomazic ML, Schnittger L, Tiranti KI. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. *Parasitology Research* 2019, 118,2079–2086.

Lubick KJ, Burgess DE. Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 2004, 72, 1284-290.

Mahajan RT, Badgujar SM. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research* 2010, 3(9),2048-2068.

Mahfouz ME, Mira N, Amer S. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium spp.* in farm animals in Egypt. *J. Vet. Med. Sci.* 2014, 76(12): 1569-1575.

Maikai BV, Umoh JU, Kwaga JKP, Lawal IA, Maikai VA, Cama V, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Veterinary Parasitology* 2011, 178(3-4), 241–245.

- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J.** The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol* 1993, 47, 821–853.
- McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M.** Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 2006, 1, 497–536.
- McKerrow JH. , Rosenthal PJ. , Swenerton R, Doyle P.** Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2008,21(6), 668–672.
- Meinhardt PL, Casemore DP, Miller RB.** Epidemiologic aspect of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiologic Rev.* 1996, 18(2), 118-136.
- Melendez-Lopez SG, Herdman S, Hirata K, Choi MH, Choe Y, Craik C.** Use of recombinant *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryot Cell.* 2007, 6(7), 1130–1136.
- Mendoza-Lopez M, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Ruiz-Tachiquin ME, Ortega-Lopez J, Arroyo R.** CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000, 68(9), 4907-4912.
- Mendoza-Oliveros T, Arana-Argáez V, Alvaréz-Sánchez LC, Lara-Riegos J, Alvaréz-Sánchez ME, Torres-Romero JC.** Immune Response of BALB/c Mice toward Putative Calcium Transporter Recombinant Protein of *Trichomonas vaginalis* The Korean. *Journal of Parasitology* 2019, 57(1): 33-38.
- Merdivenci A.** Medikal Parazitoloji Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul 1981, 120-130.
- Miller CM, Akrotos C, Johnson AM, Smith NC.** The production of a 70 kDa heat shock protein by *Toxoplasma gondii* RH strain in immunocompromised mice. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1467–1473.
- Miller, DL, Liggett, A, Radı ZA, Branch, LO.** Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Vet. Parasitol.* 2003, 115,199-204.
- Miller SA, Rosaria CL, Rojas E, Scorza KV.** Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health*

2003, 8, 342-347.

Mirzai Y, Yakchali M, Mardani K. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* infection in naturally infected cattle of Northwest Iran. *Vet. Res. Forum* 2014, 5(1): 55-60.

Monis PT, Andrews RH, Saint CP. Molecular biology techniques in parasite ecology. *International Journal for Parasitology* 2002, 32, 551–562

Monteiro ACS, Abrahamson M, Lima APCA, Vannier-Santos MA. , Scharfstein J. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine proteases inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science* 2001, 114, 3933–3942

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004, 363, 1965-1976.

Moolasart P, Eampokalap B, Ratanasrithong MM, Kanthasing P, Tansupaswaskul S, Tanchanpong C. Cryptosporidiosis in HIV infected patients in Thailand. *Southern Asian J Trop Med Pub Health*, 1995, 26, 335-338.

Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RC, Ndiritu W, Lal A, Moore A, Deplazes P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol* 2000, 38, 1180 –1183.

Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 1992, 6(14):1925–1932.

Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH. Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *P Natl Acad Sci USA* 1996, 93(12), 6008–6013.

Murakoshi F, Xiao L, Matsubara R, Sato R, Kato Y, Sasaki T, Nakai Y. Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* in grazing beef cattle in Japan. *Veterinary Parasitology* 2012, 187(1-2), 123–128.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Klinik Mikrobiyoloji. *Manual of Clinical Microbiology*, 2007, 9(2), 2122-2128.

Musyoka TM, Kanzi AM, Lobb KA, Bishop ÖT. Structure Based Docking and Molecular Dynamic Studies of Plasmodial Cysteine Proteases against a South African Natural Compound and its Analogs. *Nature Scientific Reports* 2016, 1, 16.

Na BK, Kang JM. and Sohn WM. CsCF-6, a novel cathepsin F-like cysteine protease for nutrient uptake of *Clonorchis sinensis*. *International Journal for Parasitology* 2008, 38, 493–502.

Na BK, Kang JM, Cheun HI, Cho SH, Moon SU, Kim TS, Sohn WM. Cryptopain-1, a cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*, does not require the pro-domain for folding. *Parasitology* 2009, 136, 149–157.

Ndao M, Nath-Chowdhury M, Sajid M. A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57, 6063–6073.

Neale KA and Alderete JF. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates, *Infection and Immunity* 1990, 58(1), 157–162.

Nesterenko MV, Tilley M. and Upton SJ. A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios* 1995, 83, 77–88.

Nguyen ST, Nguyen DT, Le DQ, Hua LNL, Nguyen TV, Honma H, Nakai Y. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium spp.* in cattle in central Vietnam. *Vet. Parasitol.* 2007, 150(4): 357-361

Nichols G. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis.*. CRC Press, Boca Raton, FL (edt) 2008, 79–118.

Nime FA, Burek JD, Page DL. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976, 70, 592–598.

Noel CJ, Diaz N. Sicheritz-Ponten T, Safarikova L, Tachezy J, Tang P, Fiori PL, Hirt RP. *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* 2010,11, 99.

Nydam D. Calves with cryptosporidiosis can be frustrating: Is there a treatment? Ministry of Agriculture and Food. Correll Univ, 2003, 1-2.

O'Connor RM, Burns PB, Ha-Ngoc T, Scarpato K, Khan W, Kang G. Polymorphic mucin antigens CpMuc4 and CpMuc5 are integral to *Cryptosporidium parvum* infection in vitro. *Eukaryot Cell*. 2009,8(4), 461–469.

O'Handley RM, Olson ME. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. Ballweber LR, Smith RA. (edt), Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice – Ruminant Parasitology 2006, 22, 623 – 639.

O'Hara SP, Chen XM. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection* 2011,13, 721 – 730.

Ok Üz, Balcioğlu C. Cryptosporidiosis: Tıbbi parazit hastalıkları, Özcel, M.A, Özbel, Y, AK, M.(edit) İzmir, 2007, 363-382.

Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants— are we there yet? *Int. J. Parasitol.* 2002, 32, 517–525.

Otağ F, Aslan G. , Emekdaş G. Aydın E, Özkan Taylan A, Çeber K. Mersin İlinde İlkokul Öğrencilerinde *Cryptosporidium spp.* Ookistlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2007,31 (1), 17-19.

Över U. İshalle seyreden hastalarda *Cryptosporidium'* un rolü ve sağlıklı populasyonda seroprevalansı. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 1996.

Öz ZS. *Trichomonas vaginalis*'in fagositik aktivitesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2009, 66, 29-34.

Öz ZS, Demirezen Ç, Beksap MS. *Trichomonas vaginalis* vailiginde gorulen hucresele değişikliklerin sitolojik olarak saptanması. *Klinik Bilimler ve Doktor*,2000, 6, 801-806.

Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22. İzmir: 2007, 363-376.

Özcel MA, Zeyrek FY. Trichomoniasis. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:22, İzmir 2007, 431-447

Özcel M, Tanyüksel M, Eren H. Molekuler Parazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2009, 22, 431-447.

Özçelik S, Poyraz Ö, Kalkan K, Malatyalı E, Değerli S. Hayvancılıkla Uğraşanlarda ve Sığırlarda *Cryptosporidium* spp. Yaygınlığının ELISA ile Araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012,18,61-64

Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E. Elazığ yöresinde buzağı ve kuzularda bulunan *Cryptosporidium*'un yayılışı üzerinde araştırmalar. *Türk. J.Vet. Anim. Sci.* 1990,14, 439-445.

Özkul A, Alçığır G, Kutsal O. Bursal cryptosporidiosis in chickens associated with marek's disease. *Doga-Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 1991, 16, 1-9.

Özkul A, Alçığır G, Karaer Z, Yonguç AD. Intestinal cryptosporidiosis causing diarrhoea in goat kids. V. International Conference On Goats. New Delhi, INDIA 1992.

Özlem MB, Eren H, Kaya O. Aydın yöresi buzağlarında *Cryptosporidium*'ların varlığının araştırılması. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* 1997, 22(36), 15-22.

Pandey KC, Singh N, Arastu-Kapur S, Bogyo M, Rosenthal PJ, Falstatin, a cysteine protease inhibitor of *Plasmodium falciparum*, facilitates erythrocyte invasion. *PLoS Pathog.* 2006,11, 117.

Pedroza Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst Wall protein gene. *Emerg. Inf. Dis.* 2001, 7(1), 49-56.

Perkins ME, Riojas YA, Wu TW, Le Blancq SM. CpABC, a *Cryptosporidium parvum* ATP-binding cassette protein at the host-parasite boundary in intracellular stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 5734 –5739.

Perryman LE, Jasmer DP, Riggs MW, Bohnet SG, McGuire TC, Arrowood MJ. A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol* 1996,80,137–147.

- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G.** Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998, 11(2),300- 317.
- Petry F.** Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microsc. Microanal* 2004, 10, 586–601.
- Pettoello- Mantovani M, Di Martino L, Dettori G, Vajro P, Scotti S, Guandalini S.** Asymptomatic Carriage of Intestinal *Cryptosporidium* in Immunocompetent and Immunodeficient Children: A Prospective Study. *Pediatric Infectious Disease* 1995, 14(12), 1042 -1047.
- Playfair JH, Taverne J, Bate CA, and de Souza JB.** The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease. *Immunol Today* 1990, 11, 25 – 27.
- Plutzer J, Karanis P.** Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol* 2007,146, 357-362.
- Plutzer J.** *Cryptosporidium* and *Giardia* as water contaminant pathogens in Hungary. 2008, 22-25.
- Polat E, Sirekbasan S, Yıldırım Z, Bağdathı Y, Çepni İ, Çift T, Baltalı ND.** İstanbul’da kadın hastalıkları hastaları ile hayat kadınlarında *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığının on yıl önceki oranla karşılaştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2011, 35, 68-71.
- Poppe WAJ.** Nitroimidazole-resistant vaginal trichomoniasis treated with paramomycin. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001,96,119-120.
- Poole DN, McClelland, RS.** Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections* 2013, 89(6), 418–422.
- Poorman RA, Tomasselli AG, Heinrikson RL, Kezdy A.** A cumulative specificity model for proteases from human immunodeficiency virus types 1 and 2, inferred from statistical analysis of an extended substrate database. *J Biol. Chem*, 1991, 266, 14554–14561.
- Priest JW, Bern C, Xiao L.** Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin Vaccine Immunol* 2006, 13, 123–131.

Puente-Rivera J, de los Ángeles Ramón-Luing L, Figueroa-Angulo EE, Ortega-López, J, & Arroyo R. Trichocystatin-2 (TC-2): An endogenous inhibitor of cysteineproteinases in *Trichomonas vaginalis* is associated with TvCP39. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, 54, 255–265.

Raksakulthai R, Hard NF. Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2003, 43(4), 401-445.

Ramón-Luing LA, Rendón-Gandarilla FJ, Cárdenas-Guerra RE. Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 2010, 10(3), 435–444.

Ramón-Luing LA, Rendon-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Avila-Gonzales L, Arroyo R. Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCp39 proteinase gene *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2011,43, 1500-1511.

Rani K, Rana R, Datt S, Review on Latest Overview of Proteases. *International Journal of Current Life Sciences* 2012, 2, 12-18.

Ranjbar R. and Fattahi R. Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in calves under one year old in Ilam county (Iran), from March 2014 to February 2015. *Electron. Physician* 2017, 9(6): 4631-4635.

Rao MB, Tanksale M, Ghatge MS, Deshpande V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 1998, 62(3): 597-635.

Reed SL, Keene WE, McKerrow JH. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989, 27(12), 2772–2777.

Rein MF. *Trichomonas vaginalis*. Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases Volume 2 içinde. Fifth edition. Churchill Livingstone, 2000, 2894-2898.

Reisner BS, Spring J. Evaluation of a combined acid-fast-trichrome stain for detection of *Microsporidia* and *Cryptosporidium parvum*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2000,124, 777-779.

Rigden DJ, Mosolov VV, Galperin MY. Sequence conservation in the chagasin family suggests a common trend in cysteine proteinase binding by unrelated protein inhibitors. *Protein Science* 2002. 11, 1971–1977.

Riggs MW, Stone AL, Yount PA, Langer RC, Arrowood MJ, Bentley DL. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J. Immunol* 1997, 158, 1787–1795.

Riggs MW. Recent advances in cryptosporidiosis: the immun response. *Microbes Infect.* 2002, 4, 1067-1080.

Roberts CL, Morin C, Eddiss DG, Wahlquist SP, Mshar PA, Hadler JL. Factors influencing *Cryptosporidium* testing in connecticut. *J. Clin. Microbiol* 1996, 34(9), 2292-2293.

Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 2014, 141, 1667–1685.

Ryan U, Paparini A, Tong K, Yang R, Gibson-Keuh S, O’Hara A, LyMBERY A, Xiao L. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol* 2015, 150C, 31–35.

Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. *Int J Parasitol* 2018, 48(1), 1-12.

Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 2002, 120(1), 1-21.

Salleh A, Basri M. New Lipases and Proteases, 2nd ed. *Nova Science Publishers*, New york 29, 2006.

Santoro A, Dorbek-Kolin E, Jeremejeva J, Tummeleht L, Orro T, Jokelainen P, Lassen B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium spp.* in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. *Parasitology*, 2018, 1–7.

Santos CC, Sant’Anna C, Terres A, Cunha-e-Silva NL, Scharfstein J. and Lima APCA. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *Journal of Cell Science* 2005, 118, 901–915.

Santos CC, Scharfstein J. and Lima APCA. Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. *Parasitology Research* 2006, 99, 323–324.

Sarı B, Aktaş MS, Arslan MÖ. Erzurum Yöresinde Buzağılarda *Cryptosporidium* Türlerinin Prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008, 32 (2), 116 – 119.

Saygı G. Temel tıbbi parazitoloji: Esnaf ofset matbaacılık 1998, 44-47.

Saygı G. Paraziter hastalıklar ve parazitler: Es-Form Ofset Ltd Şti. 2009, 79-86.

Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17, 794–803.

Sears CL, Kirkpatrick BD. Cryptosporidiosis and isosporiosis. in: Principles and Practice of Clinical Parasitology. *John Wiley & Sons Ltd. Press.* 2001, 139-164.

Seife C. “Blunting nature’s Swiss army knife”, *Science* 1997, 277(5332), 1602-1603.

Selvitopu A, Özçelik S, Değerli S. Jinekolojik hastalardan alınan vaginal örneklerde *Trichomonas vaginalis* görülme sıklığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2006, 30, 3.

Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugeless B, Chan VJ, Engel JC, Bogyo M, Russelli DG, Sakanari JA, Mckerrow JH. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 11015–11022.

Shahbazi M, Zahedifard F, Taheri T, Taslimi Y, Jamshidi S, Shirian S, Mahdavi N, Hassankhani M, Daneshbod Y, Zarkesh-Esfahani SH, Papadopoulou B, Rafati S. Evaluation of Live Recombinant Nonpathogenic *Leishmania tarentolae* Expressing Cysteine Proteinase and A2 Genes as a Candidate Vaccine against Experimental Canine Visceral Leishmaniasis, 2015. *PLoS ONE* 2015, 10(7), 132794.

Siqueira –Neto JL, Debnath A, McCall L.-I, Bernatchez JA, Ndao M, Reed SL & Rosenthal PJ. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2018, 12(8).

Slavin D . *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) . *J Comp Pathol* 1955, 65, 262 – 266.

Smith RP, Clifton-Hadley FA, Cheney T. and Giles M. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Vet. Parasitol.* 2014, 204(3-4): 111-119.

Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, Smyth S, Millar BC, Rooney PJ, Matsuda M, Kenny F, Xu J, Dooley JS. Cryptosporidiosis in developing countries. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2007, 1, 242–256.

Spano F, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *International Journal for Parasitology* 2000, 30(4), 553–565.

Stanley SL JR, Zhang T, Rubin D. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Innfect Immun* 1995, 63(4), 1587-1590

Starling CR, Arrowood MJ. Cryptosporidia. in: Parasitic Protozoa, vol.6. Academic Press, 1993, 65, 159-224.

Steele MI, Kuhls TL, Nida K, Meka CS, Halabi IM, Mosier DA, Elliott W, Crawford DL, Greenfield RA. A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infect. Immun.* 1995, 63, 3840–3845.

Stemmer SM, Adelson ME, Trama JP, Dorak MT, Mordechai E. Detection Rates of *Trichomonas vaginalis*, in Different Age Groups, Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2012, 16(4), 352-357.

Stoch SA, Wagner JA. Cathepsin K. inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. Proof of principle' that cysteine proteases are druggable targets. *Clin Pharmacol Ther* 2008, 83, 172–176.

Strong W, Gut J, Nelson RG. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60- kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun* 2000, 68, 4117– 4134.

Suresh P, Rehg JE. Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. *J. Clin. Microbiol* 1996, 34(1), 38-40.

Suud S, Kapil A. An update on *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Sex Transm Dis* 2008, 29, 7-14.

Şahal M, Karaer Z, Yasa Duru S, Çizmeçi S, Tanyel B. Cryptosporidiosis in newborn calves in Ankara region: clinical, haematological findings and treatment with Lasalocid-NA DTW. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2005, 112(6), 203-8, 210.

Şener B, Ergüven S, Erciş S. 1980-1996 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi parazitoloji laboratuvarında dışkıının parazitolojik inceleme sonuçları. *T. Parazitol. Dergisi* 1997, 22(1), 37-40.

Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13, 196–206.

Que X, Brinen LS, Perkins P. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 2002,119(1),23-32.

Que X, Ngo H, Lawton J. The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J Biol Chem* 2002, 277, 25791-25797.

Tamer SG ve Gülenç S. Dışkıda *Cryptosporidium spp.* Antijenlerinin ELISA ile Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008, 32(3), 198-201

Teixeira C, Gomes JR. and Gomes P. Falcipains, *Plasmodium falciparum* cysteine proteases as key drug targets against malaria. *Current Medicinal Chemistry* 2011, 18, 1555–1572.

Templeton TJ, Enomoto S, Chen, WJ, Huang, CG, Lancto CA, Abrahamsen MS, A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a *Gregarine* and *Cryptosporidium*. *Mol. Biol. Evol.* 2010, 27, 235–248.

Thompson RCA, Olson, ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS,Hijjawi, NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* 2005, 59, 77-158.

Thompson HP, Dooley JS, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol Res* 2007, 100(3), 619-624.

Tian HF, Chen B, Wen JF. Giardiasis, Drug Resistance, and New Target Discovery. *Infectious Disorders - Drug Targets* 2010, 10(4), 295–302.

Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Evcil hayvanlarda Cryptosporidiosis: enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2002, 38(1), 20-31.

Töz S. Aspirasyon, Vücut sıvıları ve idrar incelemeleri. Korkmaz M, Ok ÜZ. (edt). Parazitolojide Laboratuvar İzmir. Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:23. 2011, 61-62.

Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr. Pharm. Des.* 2002,8, 1623-1637.

Tyzzar EE. *Cryptosporidium parvum* (Sp. Nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protis.* 1912, 26, 394–412.

Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002, 4, 1047-1058.

Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M. Unat'ın tıp parazitolojisi. 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, 1995, 595-600.

Ungar BLP. Infectious diseases and their etiologic agents, volume 2, section H, in Principle and Practise of Infectious Diseases. Mandell G.L, Bennet J.E, Dolin R (edt) Fourth Edition, Churchill livingstone, New York Churchill livingstone 1995, 2500-2546.

Ülgen Z, Balcıoğlu İC. CRYPTOSPORİDİOSİS. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayını 2007, 363-376.

Üner A, Tanrıverdi S, Caner A, Değirmenci A. *Cryptosporidium* 'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar: Moleküler Parazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın, 2007, 631-664.

Vergara-Castiblanco CA, Quilez Cina J, Feira -Santos F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazas ME. Serological response to *Cryptosporidium parvum* in adult cattle from the Andean region of Colombia. *Parasitol. Res.* 2001, 87,500-5004.

Vizovišek M, Vidak E, Javoršek U, Mikhaylov G, Bratovš A, & Turk B. Cysteine cathepsins as therapeutic targets in inflammatory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2020, 1–16.

Walner-Hanssen P, Krieger JN, Stevens CE, Kiviat NB, Koutsky L, Critchlow C, DeRouen T, Hillier S, Holmes KK. Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis, *Jama*, 1989, 261(4), 571-576.

Wang AL, Wang CC. A linear double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260(6), 3697-3702.

Wang ZD, Liu Q, Liu HH, Li S, Zhang L, Zhao YK, Zhu XQ. Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and Isospora infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* 2018, 11(1).

Wanyiri J, Ward H. Molecular basis of *Cryptosporidium*-host cell interactions: recent advances and future prospects. *Future Microbiol* 2006,1,201–208.

WEB-1. ANOFEL Cryptosporidium National Network <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.33.19642-en> adresinden erişilerek Türkçeleştirilmiştir (28.09. 2019).

WEB-2. *Trichomonas vaginalis* Life cycle <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> adresinden erişilerek Türkçe'leştirilmiştir (23.10. 2019).

WEB-3. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/vaginal-discharge.htm#a2> (13.10. 2019).

WEB-4. Papain enziminin üç boyutlu yapısının gösterimi <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase9.html> (25.08. 2019).

WEB-5. <https://www.creative-biolabs.com/vaccine/recombinant-trichomonas-vaginalis-tvmif-protein-aa-1-363-46072.htm> (30.11. 2019).

WEB-6.

<http://www.herbaextractsplus.com/bromelain.cfm?gclid=CKa8sK0uJYCFQWB1AodXFikKw>, (11.10. 2019).

Wegayehu T, Karim R, Anberber M, Adamu H, Erko B, Zhang L, Tilahun G. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species in dairy calves in Central Ethiopia. *PLoS One* 2016, 11(5): e0154647.

WHO Guidelines for drinking-water quality. third edition, WHO, Geneva, 2016, 1.

WHO Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008 (15.10. 2019).

Widmer G, Orbach EA, Tzipori S. β -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65(4), 1584- 1588.

Widmer G, Sullivan S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol* 2012, 34, 61–71.

Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a Small- Subunit rRNA based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66(12), 5492-5498.

Xiao L, Sulaiman, IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, Zhang X, Fayer R, Lal AA. Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology* 2002, 32, 1773-1785.

Xie YT, Gao JM, Wu YP, Tang P, Hide G, Lai DH, Lun ZR. Recombinant α -actinin subunit antigens of *Trichomonas vaginalis* as potential vaccine candidates in protecting against trichomoniasis. *Parasites & Vectors* 2017, 10(1).

Yıldırım A, Adanır R, İnci A, Yukarı BA, Düzlü Ö. Burdur Yöresindeki Sığırlarda Cryptosporidiosis 'in Real Time PCR Yöntemi ile Araştırılması ve *Cryptosporidium* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu, 2012, Tübitak, Proje No: 111O512, Kayseri.

Yu Q, Li J, Zhang X, Gong P, Zhang G, Li S. Induction of immune responses in mice by a DNA vaccine encoding *Cryptosporidium parvum* Cp12 and Cp21 and its effect against homologous oocyst challenge. *Vet Parasitol.* 2010, 172(1–2):1–7

Zhang Z, Wang L, Seydel KB. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 2000, 37(3), 542-548.

Zhao G, Zhou A, Lv G, Meng M, Sun M, Bai Y, He S. *Toxoplasma gondii* cathepsin proteases are undeveloped prominent vaccine antigens against toxoplasmosis. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13(1).

Zhu G, Fritzler JM. Novel anti-*Cryptosporidium* activity of known drugs identified by high-throughput screening against parasite fatty acyl-CoA binding protein (ACBP). *J Antimicrob Chemother* 2012, 67, 609–617.

