

***Cryptosporidium* spp.’nin Realtime PCR Yöntemi ile Saptanması İçin Metot Verifikasyon Çalışması**

Method Verification Study for Detection of *Cryptosporidium* spp. by Realtime PCR Method

Selma Usluca*[✉], Asiye Evren Eken Berberoğlu*[✉], Bekir Çelebi**[✉], Selçuk Kılıç*[✉]

*Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ankara

**Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara

Öz

Amaç: *Cryptosporidium* spp. özellikle gıda ve su kaynaklı ishal nedenleri arasında önemli bir parazittir. Bu çalışmada, dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.’nin rutin tanısında kullanılan moleküler yöntemin metot verifikasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu amaçla *Cryptosporidium parvum* pozitif buzağı dışkı örneği PBS ile dilüe edilmiş ve *Cryptosporidium*/*Giardia* direkt floresan antikor kiti kullanılarak ookist sayısı yapılmıştır. Aynı örneğe ticari kit ile DNA ekstraksiyonu uygulanmıştır. Elde edilen DNA örneği kullanılarak *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*’in moleküler yöntemlerle saptanması için multiplex PCR kiti kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: PCR’in saptama limiti 8 ookist/reaksiyon olarak belirlenmiştir. Daha sonra yüksek ve düşük pozitif örnekler hazırlanmış, iki farklı analist ile doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılarak testin metot verifikasyonu tamamlanmıştır.

Sonuç: Metot verifikasyon çalışmalarının varyasyon katsayıları %15’in altında olduğu için testin, rutin hasta örneklerinde *Cryptosporidium*’un araştırılmasına uygun olduğu na karar verilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium* spp., realtime PCR, metot verifikasyon

ABSTRACT

Objective: *Cryptosporidium* spp. is an important parasite, especially among the causes of foodborne and waterborne diarrhea. The aim of this study was to verify the molecular method used for routine diagnosis of *Cryptosporidium* spp. in stool samples.

Methods: For this purpose, *Cryptosporidium parvum* positive calf stool sample was diluted with PBS and oocysts were counted using *Cryptosporidium*/*Giardia* direct fluorescein antibody assay. DNA extraction from the same sample was carried out using a commercial kit after determining the number of oocysts in the sample. PCR amplification was performed using multiplex PCR assay for molecular detection of *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* in the DNA sample retrieved.

Results: The detection limit was determined as 8 oocysts/reaction. Then, high and low positive samples were prepared, and accuracy and precision studies of the method were performed by two different analysts to complete verification analysis of the test method.

Conclusion: Since variation coefficients of method verification studies were below 15%, it was decided that the test was suitable for investigation of *Cryptosporidium* spp. in routine patient samples.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., realtime PCR, method verification

Alındığı tarih:

12.06.2019

Kabul tarihi:

05.07.2019

Yayın tarihi:

30.09.2019

ORCID Kayıtları

S. Usluca 0000-0002-8934-439X

A. E. E. Berberoğlu 0000-0002-3849-0119

B. Çelebi 0000-0002-4545-5573

S. Kılıç 0000-0002-4993-650X

✉ selmausluca@gmail.com



© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti’ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Cryptosporidium apikompleksa cinsi, zorunlu hücre içi bir protozoon parazittir. Gastrointestinal sistem epitel hücrelerini enfekte eder, akut ve bol sulu ishale neden olur⁽¹⁾. İshal, immun sistemi sağlam bireylerde kendi kendini sınırlarken, immun sistemi baskılanmış konaklarda kronik ve yaşamı tehdit edici olabilir^(1,2). Parazit özellikle gıda ve su kaynaklı ishal nedenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır^(1,3-5). İnsan ve hayvan dışkılarında bulunan *Cryptosporidium* ookistleri çevreye yayılır ve su kaynaklarına ulaşır. Enfektif dozun düşük olması ve ookistlerin geleneksel su arıtma yöntemlerine dayanıklı olması insanlar için bulaş riskini arttırmaktadır^(5,6). Kuyu suları ve hijyenik olmayan içme suyu kaynaklarından köken alan *Cryptosporidium* salgınları bildirilmiştir^(7,8). Şehir şebeke suyu ve şişelenmiş su tüketimi ile karşılaştırıldığında, artezyen ve kuyu suyu tüketimi olanlarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyon oranının belirgin olarak yüksek olduğu görülmektedir⁽⁸⁾. Bunun dışında, özellikle yaşlılar veya çocuklar arasında, günlük bakım merkezlerinde yayılım daha kolay olmaktadır. Bazı meslek gruplarında (hayvancılıkla uğraşanlar, veterinerler, laboratuvar personeli, kreş personeli), endemik bölgelere yolculuk edenlerde, hijyenik koşulların yetersiz olduğu yerlerde yaşayanlarda ve enfekte kişilerle yakın temas edenlerde daha yüksek oranda görülmektedir⁽⁹⁾.

Bugüne kadar 20'den fazla tür tanımlanmış ve çeşitli konaklarda saptanmıştır. İnsanlarda olguların çoğuna *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*) ve *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) neden olmaktadır. Bunun dışında, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis* de bildirilmiştir^(2,3,6,10,11). *C. hominis* esas olarak insanları enfekte ederken, en yaygın zoonotik tür olan *C. parvum* çok sayıda hayvanı ve insanı enfekte ederek zoonotik bulaşta rol oynamaktadır^(1,6). *Cryptosporidium* türlerinin ve genotiplerinin tanımlanması, hayvan veya çevresel kaynaklı *Cryptosporidium* ookistlerinin halk sağlığı açısından önemini değerlendirmek ve enfeksiyon veya kontaminasyon kaynaklarını izlemek için önemlidir^(3,6,8,11).

Cryptosporidium spp.'nin rutin tanısının acid-fast boyama ve DFA gibi mikroskopik yöntemlerle rahatlıkla konulmasına rağmen, çeşitli nedenlerle morfolojik tanımlamanın güçleştiği ya da özellikle salgınlar gibi hızlı sonuç verilmesi gereken durumlarda moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada, özellikle ishal etiyolojisinin araştırılması amacıyla laboratuvarımıza gönderilen dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'nin rutin tanısında kullanılan moleküler yöntemin metod verifikasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

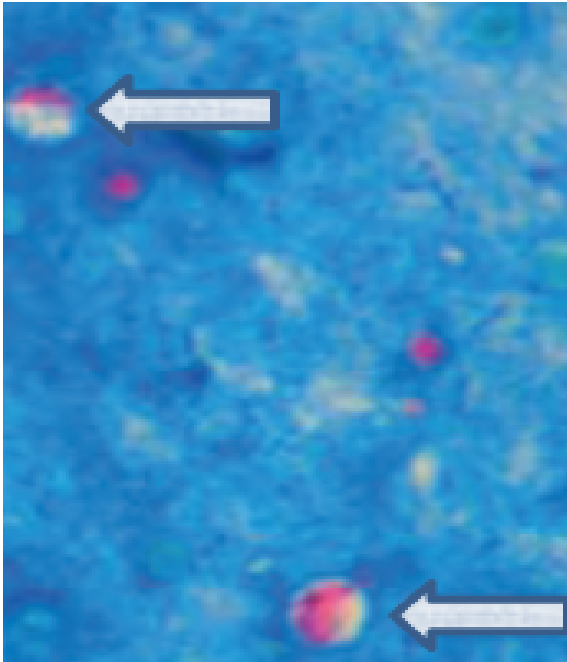
GEREÇ ve YÖNTEM

PCR'ın saptama limitinin belirlenmesi için dışkı örneğindeki ookist sayımının ilk olarak Kinyoun acid-fast boyama yöntemiyle yapılması düşünüldü. Bu amaçla *C. parvum* pozitif buzağı dışkı örneği PBS ile iki kat sulandırıldı. Sulandırım için beş tüpe 1'er ml PBS dağıtıldı. İlk tüp içerisine 1 ml sulu dışkı örneği eklenerek homojenize edildi. Buradan 1 ml alınarak seri dilüsyonlar tamamlandı. Her bir dilüsyondan 10 µl dışkı alınıp yayma preparat hazırlandı. Preparat Kinyoun acid-fast boyası ile boyanarak X1000 büyütme ile parazit sayımı yapıldı. Aynı örnekler içerisinden 10 µl alınıp DFA lamına yayıldı. *Cryptosporidium*/Giardia DFA kiti (Crypto/GiardiaCel CeLLabs, Avustralya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda direkt floresan antikör yöntemi uygulanarak X400 büyütme ile floresan mikroskopta parazit sayımı yapıldı. Ookist sayısı belirlenmiş 200 µl dışkı örneğinden QiAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu uygulandı. DNA örneğinden (200 µl) log10 tabanında seri dilüsyonlar hazırlandı ve dilüsyonlardan 10 µl DNA, saptama limiti çalışmasında kullanıldı. Easy Plex cihazı (Aus Diagnostics, Avustralya) ile *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*'i birlikte saptayan Aus Diagnostics Multiplexed Diagnostics Gastrointestinal Parasites (5Plex) kiti (Aus Diagnostics, Avustralya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda Rotorgene Q cihazında PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Kullanılan

multipleks PCR setinin içerisinde *Cryptosporidium* için, *Cryptosporidium* ookist duvar proteinine yönelik primerler bulunmaktadır. PCR amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonunun ardından 95°C'de 10 dakika, 60°C'de 15 sn. ve 72°C'de 15 sn. 40 siklus olmak üzere uygulandı. DNA dilüsyonlarının PCR sonucuna göre pozitif olarak belirlenen son dilüsyondaki ookist sayısı yöntemin saptama limiti olarak değerlendirildi. Yüksek pozitif olarak saptama limiti değerinden $1\log_{10}$ daha yüksek değer, düşük pozitif olarak ise saptama limitinin $1\log_{10}$ katının yarısı değer kabul edildi ve testin metod verifikasyonu için iki farklı analist ile doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapıldı. Doğruluk çalışması için üç yüksek pozitif, üç düşük pozitif, üç negatif örnek birer kez çalışıldı. Çalışmalar arası kesinlik çalışması için üç farklı günde birer adet yüksek ve düşük pozitif örnek çalışıldı. Çalışma içi kesinlik çalışması için üç adet yüksek, üç adet düşük pozitif örnek çalışıldı.

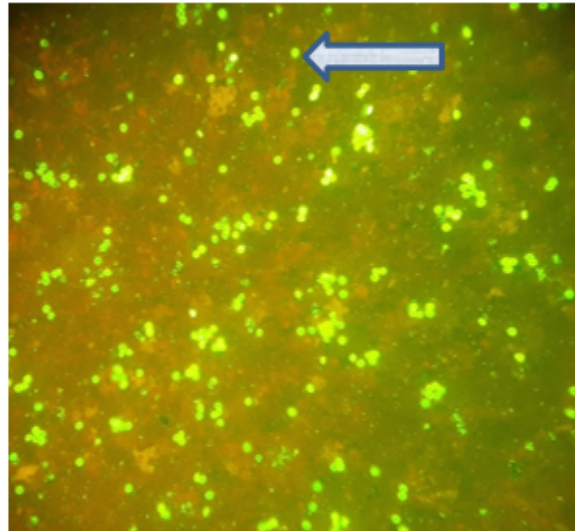
BULGULAR

PCR'ın saptama limitinin belirlenmesi için Kinyoun acid-fast boyama yöntemiyle dışkı örneğindeki ookist sayımı yapıldı, 10 µl dışkı içerisinde 281 ookist sayıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Kinyoun acid-fast boyama yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookistleri (X1000 büyütme ile).

Ancak elde edilen PCR saptama limitinin, Kinyoun acid-fast boyasındaki ookist sayısına göre çok düşük belirlendiği görüldü. Bunun üzerine Kinyoun acid-fast boyasının dışkıda bulunan tüm ookistleri belirlemediği düşünülerek ookist sayımının altın standart yöntem olan DFA yöntemiyle yapılmasına karar verildi. DFA yöntemi ile 10 µl dışkı içerisindeki ookist sayısı 1.616 olarak belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. DFA yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookistleri (X400 büyütme ile).

DFA yöntemi ile parazit sayımı yapılan dışkı örneğinden (200 µl) ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen DNA örneğinden (32.320 ookist/200 µl) saptama limiti (LOD) tespiti için $\log_{10}$ seri dilüsyonları hazırlandı. Her dilüsyondan 10 µl DNA reaksiyona katıldığında reaksiyondaki ookist miktarları Tablo 1'de verildi.

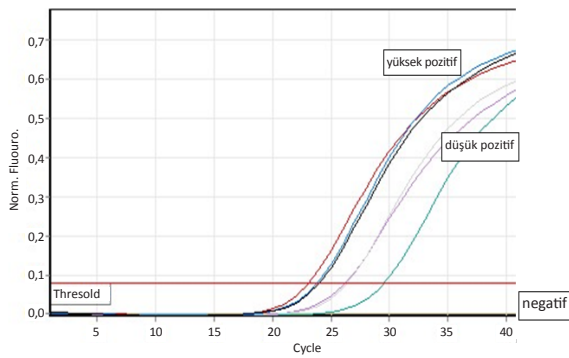
Saptama limitinin, 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonlar arasındaki bir değer olduğu düşünülerek 10^{-2} dilüsyon ½ oranında

Tablo 1. PCR reaksiyonundaki ookist miktarları.

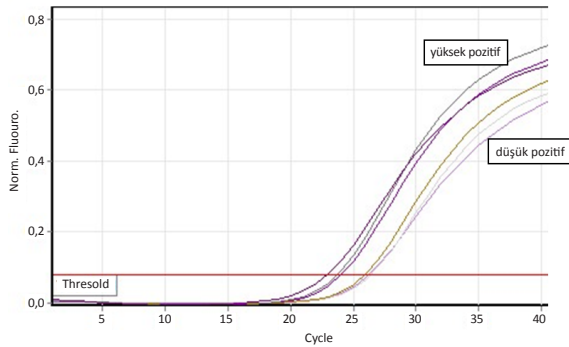
DNA dilüsyonları	Reaksiyondaki ookist miktarı	Sonuç/CT
100	1.616	Pozitif (19.81)
10^{-1}	161	Pozitif (23.02)
10^{-2}	16	Pozitif (26.27)
10^{-3}	1.6	Negatif

*PCR reaksiyonuna 10 µl DNA eklenmiştir. 200 µl DNA 32.320 ookist içermektedir.

yine sulandırılarak, reaksiyonda 8:4:2 ookist içeren örneklerle PCR yöntemi yinelenildi. Reaksiyonda 8 ookist içeren örnek PCR ile pozitif, diğer örnek reaksiyonları negatif olarak belirlendi. Saptama limiti 8 ookist/reaksiyon olarak belirlendi. Saptama limitinin $1\log_{10}$ katı (80 ookist/reaksiyon) yüksek pozitif, $1\log_{10}$ katının yarısı da (40 ookist/reaksiyon) düşük pozitif olarak hesaplandı. Belirlenen bu örneklerle testin metot verifikasyonu için iki farklı analist ile doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapıldı (Şekil 4, 5).



Şekil 3. LOD çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4. Doğruluk çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri.

İkinci analistin doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait varyasyon katsayıları Tablo 3'te gösterilmektedir.

Metod verifikasyonu çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde Cumitech 31A, 2009 (12) referans alındı. Testlerin varyasyon katsayısının (%CV) %15'in altında olması yinelenebilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Her iki analist tarafından doğruluk

Tablo 2. Birinci analistin metot verifikasyon çalışma sonuçları.

	Doğruluk çalışması	Kesinlik çalışması (Çalışma içi)	Kesinlik çalışması (Çalışmalar arası)
Yüksek pozitif (%CV)	2.09	2.091	5.70
Düşük pozitif (%CV)	7.09	7.088	6.23
Negatif (%CV)	0.00	-	-

Tablo 3. İkinci analistin metot verifikasyon çalışma sonuçları.

	Doğruluk çalışması	Kesinlik çalışması (Çalışma içi)	Kesinlik çalışması (Çalışmalar arası)
Yüksek pozitif (%CV)	2.05	2.052	4.51
Düşük pozitif (%CV)	6.89	6.886	5.33
Negatif (%CV)	0.00	-	-

ve kesinlik çalışmaları yapıldı ve bu sonuçlara göre testin rutin hasta örneklerinin çalışılmasına uygun olduğuna karar verildi.

TARTIŞMA

Cryptosporidium'un laboratuvar tanısı genellikle acid-fast boyama veya floresan antikor yöntemleri kullanılarak dışkının mikroskopik incelemesiyle konulmaktadır⁽¹⁾. Mikroskopinin uzun zaman alması, değerlendiren mikroskopistin deneyimli olmasının gerekmesi ve değerlendirmenin subjektif olması gibi dezavantajları vardır⁽¹³⁾. Mikroskopi kullanılarak yapılan saptama limiti çalışmaları değerlendirildiğinde, 10^3 - 10^7 ookist/g dışkı şeklinde, oldukça farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Deneyimli bir mikroskopist acid-fast boyama yöntemi ile 50.000-500.000 ookist/g dışkı saptayabilmektedir⁽¹⁴⁾. Geleneksel saptama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. PCR tabanlı yöntemler, az sayıda *Cryptosporidium*'un saptanması için oldukça duyarlı ve özgüldür, zaman ve maliyet açısından da etkilidir⁽¹⁵⁾. Ayrıca geleneksel yöntemler tür düzeyinde tanımlama yapamadığından, bu amaçla PCR, real-time PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), mikroarray, melting analizi, sekans analizi gibi moleküler yöntemler geliştirilmiştir⁽²⁾. Günümüzde bu nedenlerle moleküler yöntemlerle tanı koyan laboratuvarların sayısı artmaktadır.

Moleküler yöntemlerden realtime PCR'in en önemli avantajları "kapalı tüp" sistemiyle kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi ve daha az zaman almasıdır. Amplifikasyonun, reaksiyondan sonra elektroforez uygulanmadan, floresan kimyasallar kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlar^(11,16). Multipleks PCR yönteminin avantajları sonuç verme süresinin kısaltılması, duyarlılık ve özgüllüğün artırılması, örnek içerisinde tek bir reaksiyonla birden çok parazitin saptanmasına olanak vermesidir. Realtime PCR teknik personelin deneyiminin az olması, aşırı iş yükü, morfolojik olarak bozulmuş örnekler gibi insandan kaynaklanan hataları elimine etmektedir. Maliyetinin yüksek olması, floresan dalga boylarının birbirine çok yakın olması durumunda emisyon spektrumunun birbiri üzerine gelmesi ve yanlış kullanım nedeniyle örneğin, duyarlılığının azalması gibi dezavantajları vardır^(13,16).

Günümüzde *Cryptosporidium*'un tespiti için altın standart yöntem, saptama limiti $\leq 10^3$ ookist/g dışkı olan PCR yöntemi olarak kabul edilmektedir⁽¹⁴⁾. Klinik numunelerde parazitlerin araştırılmasında moleküler yöntemlerin kullanımının giderek yaygınlaşması bu tekniklerin kullanımının standardize edilmesi gerekliliğini doğurmuştur⁽¹⁷⁾. İshal salgınlarının araştırılması amacıyla laboratuvarımıza, önemli bir ishal etkeni olan *Cryptosporidium* türlerinin saptanması için dışkı örnekleri gönderilmektedir. Tanı amacıyla mikroskopik yöntemler olan acid-fast boyama yöntemi ve DFA yöntemi kullanılmakta, ancak özellikle ishal salgını durumunda, ilgili birimlerin organizasyonu ve örneklerin toplanarak referans laboratuvara ulaştırılması zaman aldığı için ve örneklerin transportu sırasında zaman zaman uygun olmayan koşullara maruz kalabildikleri için parazitin morfolojisinin bozulduğu, bu nedenle mikroskopik tanının güçleştiği durumlarda moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Parazite ait ookistlerin duvar yapısının uygun bir DNA ekstraksiyonu yöntemiyle parçalanması, ardından kısa sürede ve güvenilir tanı konulması için konvansiyonel yöntemler yerine, hem standardizasyonun sağlanması hem de hızlı uygulanabilmesi açısından ticari kitle DNA ekstraksiyonu ve realtime PCR uygulanma-

sı yeğlenmiştir.

En sık görülen ishal etkenleri olan *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'nin her birinin tanısı için bu parazite özgü yöntemlerin rutin tanı laboratuvarına dâhil edilmesi zaman alıcıdır ve bir dışkı incelemesinin maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle her üç etkenin belirlenmesi için multipleks realtime PCR yöntemleri geliştirilmiştir⁽¹⁸⁾. Gastrointestinal parazitlerin saptanmasına yönelik multipleks PCR kitlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, tanı performansının büyük ölçüde kullanılan yönteme ve hedeflenen patojen türlerine bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Test duyarlılığı/özgüllüğü, maliyeti, araştırılan hasta popülasyonu, laboratuvar iş akışı ve tanı algoritması gibi faktörler, en uygun multipleks PCR kitini seçerken dikkatle düşünülmesi gereken konulardır⁽¹⁹⁾. PCR'in altın standart yöntem olarak antijen testi ve singlepleks PCR'in birlikte kullanıldığı bir çalışmada, %88 duyarlılığa ve %98 özgüllüğe sahip olduğu belirlenirken, altın standart yöntem olarak mikroskopik incelemenin kullanıldığı bir çalışmada, özgüllüğünün %100 olduğu bildirilmiştir⁽¹³⁾. Çalışmamızda, *Cryptosporidium* spp.'nin yanı sıra, önemli ishal etkenleri olan *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve nonpatojen kabul edilmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda, klinik bulgulara neden olduğu belirlenen *D. fragilis*'i birlikte saptayabilen ticari multipleks realtime PCR kiti kullanılmıştır. *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *D. fragilis*'in tanısı temel olarak direk mikroskopik inceleme ve trichrome yöntemleri ile konulabilmekte, *E. histolytica* tanısını desteklemek için ELISA yöntemi, *G. intestinalis* tanısını desteklemek için ise DFA yöntemi kullanılabilmektedir. *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında direkt mikroskopi ve trichrome boyamanın değeri yoktur. Tanı temel olarak modifiye acid-fast boyama ile yapılabilmekte, DFA ile desteklenmektedir. Özellikle ishal olgularında bu etkenlere kısa sürede ve tek bir yöntemle tanı konulması istendiğinde PCR yöntemi yeğlenebilmektedir.

Cryptosporidium'un saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler SSUrRNA, *Cryptosporidium* ookist

duvar proteini (COWP), trombospondin ile ilişkili proteinler, 70 kDa ısı şok proteini (HSP70) ve aktin genleri dâhil olmak üzere genomun farklı bölgelerini hedef almaktadır^(2,10). SSU rRNA genine yönelik primerlerle realtime PCR yönteminin kullanıldığı çalışmalarda saptama limitinin 2-5 ookist/reaksiyon arasında değiştiği görülmektedir^(3,10). 18S rRNA geni hedef olarak kullanıldığında realtime PCR'ın saptama limitinin 10 ookist/reaksiyon olarak belirlendiği görülmektedir⁽⁵⁾. *Cryptosporidium* ookist duvar proteinine yönelik primerler kullanılarak *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'nin eşzamanlı tespiti için multiplex realtime PCR yönteminin uygulandığı bir çalışmada saptama limiti 100 ookist/reaksiyon olarak belirlenmiştir⁽¹⁸⁾. Çalışmamızda, ookist duvar proteinine yönelik primer kullanarak uyguladığımız yöntemin saptama limiti 8 ookist/reaksiyon olarak belirlenmiştir.

PCR yönteminin saptama limitinin belirlenmesinde genellikle DFA yöntemi⁽¹⁰⁾ veya acid-fast boyama yöntemi⁽¹⁶⁾ gibi mikroskopik yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların ağırlıklı olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra, araştırılan parazitin hedef bölgesinin klonlanması yönteminin kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır⁽²⁰⁾. Çalışmamızda, yaptığımız deneyler sonucunda modifiye acid-fast boyama yönteminin parazitin saptanmasına olanak vermesine rağmen, parazit sayımı için DFA yöntemi kadar başarılı olamadığı görülmüştür. Bu nedenle PCR'ın saptama limitini belirlemek için parazit sayımı DFA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda, benzer PCR teknikleri kullanılmasına rağmen elde edilen saptama limitlerinin farklı olmasının nedenleri çalışılan örnek matriksi, matriks içindeki hedef mikroorganizmayı sayma yöntemi, kullanılan DNA ekstraksiyonu yöntemi, PCR uygulamalarında kullanılan primerlerin hedef gen bölgeleri ve kullanılan reaktiflerin farklı olması, testin optimize edilip edilmemiş olması, PCR reaksiyonunun gerçekleştirildiği cihazların farklı olması gibi birçok faktör rol oynamaktadır.

Metod verifikasyonu, bir laboratuvarın bir yöntemi/testi değerlendirerek onayladığı ve belirli kullanımlar için özel şartların yerine getirildiğine dair objektif kanıtlar sağlayan bir işlemdir. Yöntemin, bir veya daha fazla matriks içerisindeki bir etkeni, bir veya daha fazla cihazda veya platformda belirleyip, tanımlayabildiğini göstermeyi sağlar⁽²⁰⁾. Moleküler yöntemlerin uygulanmasında en iyi amplifikasyon eğrisi veya PCR ürünü bandını veren sonuçların elde edilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılarak yöntemin geliştirilmesi ve standardize edilmesi gereklidir. Inhouse PCR yönteminin amplifikasyon aşamasının optimizasyonunda en çok dikkat edilmesi gereken aşamalar uygun bağlanma ısısı, optimal MgCl₂ ve primer-prob konsantrasyonunun belirlenmesidir. Ticari kitler, kullanıma hazır olmaları ve optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra kullanıma sunulmaları nedeniyle günümüzde birçok laboratuvar tarafından yeğlenmektedir. Ancak kullanılan cihazlar ve örnek matriksleri farklılıkları gibi nedenlerden dolayı test sonuçları etkilenmekte, bu nedenle her laboratuvar tarafından rutin laboratuvar içi uygulamaları için saptama limitinin belirlenmesi ve yeniden optimize edilmesi gerekmektedir.

Rutin hizmet veren laboratuvarlarda duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, optimize edilmiş ticari kitlerin kullanımının, rutin mikroskopik inceleme ile saptanamayan veya gözden kaçırılabilen parazitlerin tanısında halk sağlığına önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Vejdani M, Mansour R, Hamzavi Y, Vejdani S, Nazeri N, Michaeli A. Immunofluorescence assay and PCR analysis of *Cryptosporidium* oocysts and species from human fecal specimens. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(6): e10284. <https://doi.org/10.5812/jjm.10284>
2. Rolando RFR, da Silva S, Saramago Peralta RH, et al. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(4):476-9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000400006>
3. Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation

- of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2335-8.
<https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2335-2338.2002>
4. Amar CFL, Dear PH, McLauchlin J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. Lett Appl Microbiol. 2004;38(3):217-22.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01473.x>
 5. Adamska M, Leońska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B. PCR and real time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst DNA. Folia Biol (Kraków). 2011;59(3-4):115-20.
https://doi.org/10.3409/fb59_3-4.115-120
 6. Burnet JB, Ogorzaly L, Tissier A, Penny C, Cauchie HM. Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. J Appl Microbiol. 2012;114(4):1211-22.
<https://doi.org/10.1111/jam.12103>
 7. Aksoy U, Akisu C, Sahin S, et al. First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. Euro Surveill. 2007;12(2):E070215.4.
<https://doi.org/10.2807/esw.12.07.03142-en>
 8. Usluca S, Aksoy U. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. Turk J Med Sci. 2011;41(6):1029-36.
<https://doi.org/10.3906/sag-1003-720>
 9. Usluca S, Aksoy Ü. Su kaynaklı bir parazit: *Cryptosporidium*. DEÜ Tıp Fak Derg. 2006;20(1):65-74.
 10. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 2011;49(3):918-24.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01733-10>
 11. Soliman RH, Othman AA. Evaluation of DNA melting curve analysis real-time PCR for detection and differentiation of *Cryptosporidium* species. Parasitol United J. 2009;2(1):47-54.
 12. Clark RB. Cumitech 31A: Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed., SE Sharp. ASM Press, Washington, ABD; 2009.
 13. Bian L. Validation of multiplex real-time PCR tests for intestinal parasites. Bölüm tezi, Texas Üniversitesi, ABD; 2013.
 14. Crannell ZA, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, Rohrman B, White AC, Richards-Kortum R. Nucleic acid test to diagnose cryptosporidiosis: lab assessment in animal and patient specimens. Anal Chem. 2014;86(5):2565-71.
<https://doi.org/10.1021/ac403750z>
 15. Köken E. Detection and quantification of *Cryptosporidium parvum* in natural soil matrices and leachates using qPCR. MSc Tezi, Illinois Üniversitesi, Şikago, ABD; 2012.
 16. Tanriverdi S, Tanyeli A, Başlamışlı F, et al. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3237-44.
<https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3237-3244.2002>
 17. Couto MCM, Sudre AP, Lima MF, Bomfim TCB. Comparison of techniques for DNA extraction and agarose gel staining of DNA fragments using samples of *Cryptosporidium*. Vet Med-Czech. 2013;58(10):535-42.
<https://doi.org/10.17221/7085-VETMED>
 18. Haque R, Roy S, Siddique A, et al. Multiplex real-time pcr assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. Am J Trop Med Hyg. 2007;76(4):713-7.
 19. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. PLoS One. 2019;14(4):e0215068.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>
 20. Hawash Y, Ghonaim MM, Al-Hazmi AS. Internal amplification control for a *Cryptosporidium* diagnostic PCR: construction and clinical evaluation. Korean J Parasitol. 2015;53(2):147-54.
<https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.2.147>
 21. Guidelines for the validation of analytical methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds, 2nd Ed., US Food & Drug Administration Office of Foods and Veterinary Medicine, 2015.