

## İçme kullanma sularındaki *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin analizinde TS ISO 15553 standart yönteminin uygulanabilirliğinin dış kalite kontrol numunesi ile değerlendirilmesi

### Evaluation of the applicability of the standard method of TS ISO 15553 in analysis of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in drinking waters using external quality control samples

Şule ŞENSES-ERGÜL<sup>1</sup>, Pınar KAYNAR<sup>1</sup>, Mustafa YILMAZ<sup>1</sup>, Yıldırım CESARETLİ<sup>1</sup>,  
Mustafa Kemal BAŞARALI<sup>2</sup>, İrfan ŞENCAN<sup>3</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, içme-kullanma sularının analizinde *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin tespiti amacıyla TS ISO 15553 Standart yönteminin uygulanabilirliğinin dış kalite kontrol (DKK) numunesi ile belirlenmesidir.

**Yöntem:** Çalışmada, bir adet dış kalite kontrol numunesi ile farklı zamanlarda analize alınan üç adet pozitif kalite kontrol numunesi, TS ISO 15553 Standart yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca her bir çalışmaya negatif kalite kontrol numunesi de dahil edilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmada, dış kalite kontrol numunesi ve pozitif kalite kontrol numuneleri ile edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; TS ISO 15553 Standart yöntemi ile içme-kullanma sularındaki *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin varlığı tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Çalışmada, DKK numunesi ile elde edilen sonuca göre TS ISO 15553 Standardının laboratuvarında analiz edilecek su numunelerinde uygulanabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cryptosporidium* ookist, *Giardia* kist, içme-kullanma suyu, TS ISO 15553, halk sağlığı

#### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to determine the applicability of TS ISO 15553 Standard method in water analyses in order to detect *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts by using external quality control (EQC) sample.

**Methods:** In the study, one external quality control sample and three positive quality control samples analysed at different intervals, were tested by using TS ISO 15553 standard method. Besides, negative quality control samples were also included in each study design.

**Results:** When the results obtained with external quality control and positive quality control samples were evaluated together, it was determined that the presence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts could be detected in water-intended for human consumption by using TS ISO 15553 Standard method.

**Conclusion:** According to the results obtained by using external quality control sample, it was confirmed that TS ISO 15553 Standard method can be used in the laboratory for analyzing water samples.

**Key Words:** *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, water intended for human consumption, TS ISO 15553, public health

<sup>1</sup>Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici Güvenliği Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, ANKARA

<sup>2</sup>Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcılığı, ANKARA

<sup>3</sup>Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Şule ŞENSES-ERGÜL

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tük. Güv. Lab. ve Biyo. Ür. Dai. Bşk., Adnan Saygun Cad. No: 55, 06100, Sıhhiye, Ankara

Tel : +90 312 565 51 52 E-posta / E-mail : sule.ergul@saglik.gov.tr

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2017.56514

Şenses-Ergül Ş, Kaynar P, Yılmaz M, Cesaretlı Y, Başaralı MK, Şencan İ. İçme kullanma sularındaki *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin analizinde TS ISO 15553 standart yönteminin uygulanabilirliğinin dış kalite kontrol numunesi ile değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2017; 74(EK-1): 7-12

## GİRİŞ

İçme-kullanma suyu kıtlığı ve kalitesi, dünyanın pekçok yerinde halk sağlığının ve refahının sürdürülebilmesi ve geliştirilmesi konularında karşılaşılan en büyük zorluklar arasında yer almaktadır. Temiz su kaynaklarına erişim, halk sağlığının korunmasında en önemli aşamayı oluşturmaktadır (1). Su kaynaklı hastalıklar ve bunlarla ilişkili olarak öne çıkan patojen mikroorganizmalar dünyada önemli bir sorun olarak kabul edilmektedir. İnsan faaliyetleri her geçen gün genişlemekte, farklı ülkeler arasında gerçekleşen hem iş hem de turistik seyahatler de artış meydana gelmektedir. Bu nedenle bir bölgede öne çıkan ve artış gösteren bir enfeksiyonun görülmesi, diğer bölgelere de yayılma riski taşıdığı için süratle müdahale edilmesi gereken bir durum olarak görülmektedir. Paraziter hastalıklar, içme-kullanma suyu kaynaklarının planlanması ve yönetimi ile ilişkili olarak karşımıza çıkan önemli sağlık sorunları olarak kabul edilmektedir (2, 3).

Kullanıma sunulan su içerisinde sağlığa zararlı olabilecek hiçbir etkenin bulunmaması için arıtma ve dezenfeksiyon işlemi yapılması gerekmektedir. *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistleri en önemli su kaynaklı patojen mikroorganizmalar arasında bulunmaktadır. Her iki parazit cinsi de insanlarda görülen gastroenteritlerin ve beslenme bozukluklarının en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Hem cryptosporidiosis hem de *Giardiasis* normalde bağışıklık sistemi güçlü bireylerde sınırlı düzeyde etkilenme oluştursa da, bağışıklık sistemi zayıf bireylerde (AIDS ve kanser hastaları, çocuklar, yaşlılar, vb.) hayati tehlikeler oluşturabilmektedir. Dünya’da yaklaşık 200 milyon insanda semptomatik *Giardiasis* görüldüğü, prevalansının endüstrileşmiş ülkelerde %2-5, Asya, Afrika ve Latin Amerika’nın gelişmekte olan bölgelerinde ise %20-30 olduğu rapor edilmektedir. *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerin enfeksiyonları gelişmekte olan ülkelerde oldukça fazla sosyo-ekonomik yüke neden olduğu için 2004 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından ihmal edilen

hastalıklar girişimi içerisine dahil edilmiştir (4).

Ülkemizde *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kist kaynaklı enfeksiyonlar rapor edilse de, bunların su kaynaklı olup olmadığı konusunda sistematik bir doğrulamaya gidilememektedir. Rutin su analizlerinde test edilen gösterge parametreleri için pozitif sonuç alındığında; fekal kontaminasyonun olduğu, bu nedenle de pozitif sonuç alınan bölgenin parazit, virüs ve diğer patojen bakteriler açısından pozitif olabileceği yaklaşımı uygulanmakta ve gerekli önlemler bu genel yaklaşıma göre alınmaktadır (5). Ancak yapılan araştırmalarda gösterge parametrelerinde saptanan uygunsuzluk ile parazit varlığının birebir örtüştüğü sonucuna ulaşılamayacağı vurgulanmaktadır.

Dünya’da şu anda *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin çevresel örneklerde belirlenmesi amacıyla US EPA metotlarından 1622 (6) veya 1623 (7) ile bu metotların İngiltere ve diğer ülkelerdeki eşdeğer standartları kullanılmaktadır. Bu yöntemler temel olarak (oo)kistlerin filtrasyon ile sudan deriştirilmesi, immunomanyetik separasyon (IMS) yöntemi ile izolasyonları ve elde edilen (oo)kistlerin floresan boyama yöntemi ile tespit edilmeleri aşamalarından oluşmaktadır (8). Bu çalışmanın amacı, içme-kullanma sularında *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin tespiti amacıyla TS ISO 15553 (9) standart yönteminin kullanılması için dış kalite kontrol numunesi çalışması ile doğrulanmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Dış kalite kontrol (DKK) numunesi:** Laboratuvarda uygulanacak TS ISO 15553 Standardına göre *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistin belirlenmesinde yöntemin uygulanabilirliğinin sağlanması için dış kalite kontrol programlarına katılım için kayıt yapılmıştır. Kayıt işlemi sonrasında planlanan program dahilinde gelen dış kalite kontrol numunesi, program sağlayıcısının talimatlarına göre hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

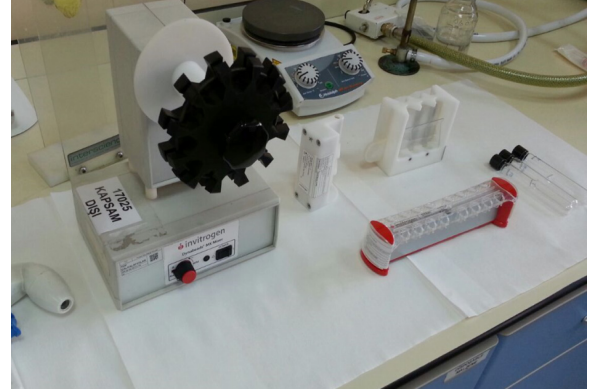
**Numunenin analizi:** Çalışma, TS ISO 15553 Standardına göre yapılmıştır (9). 10 L su numunesi peristaltik pompa (Watson Marlow, UK) kullanılarak 1,5 L/dak'lık akış hızında 0,2 µm por çaplı (Sartorius Stedim, Almanya) selüloz asetat membran filtreden geçirilmiştir. Filtrasyondan sonra numuneler 1100g' de 15 dak santrifüjlenmiş ve immünomanyetik separasyon (Dynabeads G/C Combo kit, Invitrogen) uygulanarak konsantre edilmiştir. Konsantre edilen numunelere anti-*Cryptosporidium* ve anti-*Giardia* monoklonal antikoları ile konjuge edilmiş 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) ve floresin isotiyosiyanat (FITC) (AquaGlo, Waterborne Inc.) kullanılarak immünofloresan boyama işlemi uygulanmıştır. Boyama yapılmış ookistler ve/veya kistler epifloresan mikroskopi tekniği ile incelenerek sayımı yapılmıştır. Mikroskopik inceleme aşamasında kit içerisinde yer alan pozitif boyama kontrol numuneleri de üretici talimatları doğrultusunda hazırlanmış, negatif boyama kontrol numunesi olarak ise steril ultra saf su kullanılarak aynı numune analiz basamakları uygulanmıştır.



Şekil 1. Membran Filtrasyon Düzenegi

**Pozitif kalite kontrol (KK) numunesi:** Çalışmada, *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistlerini içeren pozitif kontrol numunelerinin hazırlanması için Aqua-Glo™ G/C direkt kapsamlı kit (Waterborne, Inc., New Orleans, LA, USA) içerisinde bulunan AccuSpike™-IR geri kazanım

değerlendirme çözeltileri kullanılmıştır. Pozitif kalite kontrol numunesinin hazırlanmasında 10 L su içerisinde 1-5 adet ookist/kist bulunacak şekilde pozitif çözelti eklenmiş ve numune ile aynı işlem basamakları uygulanmıştır.



Şekil 2. Immünomanyetik Separasyon Düzenegi

**Negatif kalite kontrol (KK) numunesi:** Çalışmada, negatif KK numunesi olarak 10 L ultra saf su kullanılmış, numune için aynı analiz basamakları uygulanmıştır.

## BULGULAR

Çalışmada, 2016 yılı Aralık ayı içerisinde analiz edilen bir adet DKK numunesi ile farklı zamanlarda analiz edilen ve yaklaşık 1-5 adet ookist/kist içeren üç adet pozitif KK numunesi değerlendirilmiştir. Bunun yanısıra sistemden kaynaklanabilecek herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının kontrolü amacıyla steril saf sudan oluşan bir adet negatif kontrol numunesi de her çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 1' de gösterilmiştir.

Analiz edilen DKK numunesinin sonuçları DKK program sağlayıcısına ait web sayfasından incelenmiştir. DKK numunesinde *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerinin varlığı belirlenerek su analizlerinde TS ISO 15553 Standart yönteminin laboratuvarında uygulanabileceği tespit edilmiştir.

Pozitif KK numunesi olarak hazırlanan ve aşılama düzeyi olarak 10L'de 1-5 ookist ve/veya kist içeren numunelerin de pozitif olarak değerlendirilmiş olması yöntemin geri kazanımının da laboratuvarda uygulanabilirlik açısından uygun olduğunu doğrulamıştır.

**Tablo 1.** Analiz edilen numunelerde *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistleri varlığı

Numune	<i>Cryptosporidium</i> ookistleri varlığı	<i>Giardia</i> kistleri varlığı
DKK*	+	+
Pozitif KK1	+	+
Pozitif KK2	+	+
Pozitif KK3*	+	+
Negatif KK1	-	-
Negatif KK2	-	-
Negatif KK3*	-	-
Pozitif boyama 1	+	+
Pozitif boyama 2	+	+
Pozitif boyama 3*	+	+
Negatif boyama 1	-	-
Negatif boyama 2	-	-
Negatif boyama 3*	-	-

\*: Aynı zamanda analizi yapılmıştır.

## TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda; konvansiyonel, immünolojik ve moleküler yöntemlerin su kaynaklı protozoaların varlığının, prevalansının, kontaminasyon düzeylerinin ve kaynaklarının belirlenmesini kolaylaştırdıkları belirtilmiştir. Su kaynaklı (oo) kistlerin rutin izlemelerinde kullanılan tüm yöntemlerde konsantrasyon, saflaştırma ve tespit üç önemli aşamayı oluşturmaktadır. Bu aşamalar, suda bulunabilecek düşük sayıdaki protozoa (oo) kistlerinin etkin olarak geri kazanımını sağlayacak şekilde optimize edilmişlerdir (9). İmmunomanyetik separasyon tekniğinin de bugüne kadar yapılan birçok çalışmanın konusunu oluşturduğu ve (oo)kistlerin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edildiği bilinmektedir (10). Yöntemin zaman alıcı olması ve uzmanlık gerektirmesi dışında bazı dezavantajlara da sahip olduğu belirtilmiştir. Bunların yanlış negatif ya da pozitif sonuçların elde edilmesi ile (oo)kistlerin manyetik küreciklerden ayrılmasındaki zorluk olduğu vurgulanmıştır (11). DKK numunesi ile yapılan çalışmada *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistleri

TS ISO 15553 Standardında tanımlandığı gibi sırasıyla; 4-6 µm büyüklüğündeki yuvarlak şekilli ve 9-12 µm büyüklüğündeki oval şekilli olarak görülmektedir.

Moss ve ark., (12) tarafından yapılan bir çalışmada ; US EPA 1623 yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerlerinin *Cryptosporidium* ookist için ortalama %26,89, *Giardia* kist için ise ortalama %27,11 olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, pozitif kontrol numuneleri ile 10 L suda 1-5 ookist ve/veya kist tespit edilmiştir. Bu standardın laboratuvarında analiz edilecek su numunelerinde uygulanabileceği belirlenmiştir.

## SONUÇ

TS ISO 15553 Standart yönteminin pozitif KK numunesi olarak kullanılan 10 L saf suda 1-5 ookist ve/veya kisti tespit etmede etkin olduğu görülmüştür. DKK numunesi ile elde edilen sonuca göre TS ISO 15553 Standardının laboratuvarında analiz edilecek su numunelerinde uygulanabileceği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmamız, laboratuvarında uygulanabilirliğinin gösterilmesi açısından ülkemizde ilk olması önemlidir.

## KAYNAKLAR

1. Gajadhar AA, Allen JR. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet Parasitol*, 2004; 126: 3-14.
2. Karanis P. A review of an emerging waterborne medical important parasitic protozoan. *Jpn J Protozool*, 2006; 39 (1): 5-19.
3. Köksal F, Başlantı İ, Samastia M. Retrospective Evaluation of the Prevalence of Intestinal Parasites in Istanbul, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg*, 2010; 34 (3): 166-71.
4. Carmena D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. *Formatex*, 2010; 3-14.
5. Anonymous. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2005
6. Anonymous, EPA Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/FA, 2001.
7. Anonymous, EPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, 2005.
8. Kerri LX, Alderisio A, Jiang J. Detection of *cryptosporidium* oocysts in water: effect of the number of samples and analytic replicates on test results. *App Env Microbiol*, 2006; 72(9): 5942-47.
9. Anonymous. TS ISO 15553 Su Kalitesi - *Cryptosporidium* Ookist Ve *Giardia* Kistin Sudan Ayrılması ve Belirlenmesi. Ankara: Türk Standartları Enstitüsü, 2014.
10. Skotarczak B. Methods for parasitic protozoans detection in the environmental samples. *Parasite*; 2009; 16: 183-90.
11. Kumar T, Majid MAA, Onichandran S, Jaturas N, Andiappan H, Salibay CC, et al. Presence of *cryptosporidium parvum* and *giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. *Infect Dis Poverty*, 2016; 5:1-12.
12. Moss JA, Gordy J, Snyder RA. Effective concentration and detection of *cryptosporidium*, *giardia*, and the *microsporidia* from environmental matrices. *J Pathog*, 2014; 1-10.