

**AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AFYONKARAHİSAR BÖLGESİNDEKİ RİSK GRUPLARINDA
CRYPTOSPORIDIUM PARVUM ARAŞTIRILMASI**

Yeşim HAZER

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE**

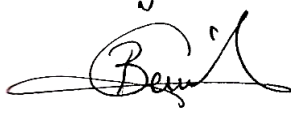
Tez No: 2007-025

2007- AFYON

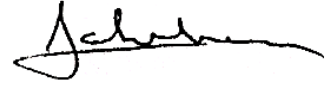
KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18.06.2007



Prof. Dr. Beril ÖZBAKKALOĞLU
ÜYE



Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA
ÜYE



Doç. Dr. O. Cem AKTEPE
ÜYE

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yeşim HAZER'in "Afyonkarahisar Bölgesindeki Risk Gruplarında *Cryptosporidium parvum* Araştırılması" başlıklı tezi ~~25/06~~25/06/2007 günü saat ~~14.00~~14.00 da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmaların yürütülmesine kadar her aşamada bilgi ve desteğinden yararlandığım, ayrıca tezimin yazılım aşamasında da büyük yardımlarını gördüğüm Danışman hocam Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE'ye en içten şükran duygularımı sunarım.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalışmaya başladığım günden bu yana sürekli ilgi, destek ve teşviklerini gördüğüm hocalarım Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye, Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA'ya ve Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŞ'e ayrıca gerek örneklerin çalışılması ve mikroskopi çalışmalarım da gerekse tezimin yazılım aşamasında emeğini, bilgisini ve zamanını benimle paylaşan Uzm. Dr. Nilay KIYILDI'ya ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bio. Yeşim HAZER

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Önsöz.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Tablo Listesi.....	VII
Şekil Listesi.....	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	X.
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe.....	2
2.2. Taksonomi.....	3
2.3. Morfoloji ve Evrim.....	5
2.3.1. Eksitasyon (Kistlerin açılması).....	6
2.3.2. Merogoni (Aseksüel çoğalma).....	6
2.3.3. Gametogoni.....	7
2.3.4. Fertilizasyon.....	7
2.3.5. Ookist dönemi.....	7
2.3.6. Sporogoni.....	8
2.4. Üreyebilme özellikleri.....	10
2.5. Epidemiyoloji.....	11
2.6. Patogenez.....	14
2.7. Klinik bulgular	14
2.7.1. İmmün sistemi normal hastalar.....	15
2.7.2. İmmün sistemi baskılanmış hastalar.....	15
2.8. İmmunolojik ve Antijenik yapı.....	16
2.9. Tanı.....	17
2.9.1. Direkt yöntemler.....	18
2.9.2. Serolojik yöntemler.....	21

2.9.3. Moleküler yöntemler.....	22
2.9.4. Histopatolojik inceleme.....	23
2.10. Tedavi.....	24
2.11. Korunma.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Formol-Etil Asetat Çöktürme Yöntemi.....	27
3.1.1. Kullanılan malzemeler.....	27
3.1.2.Yapılışı.....	28
3.2. Kinyoun asit fast boyama yöntemi.....	28
3.2.1. Kullanılan maddeler.....	28
3.2.2. Kullanılacak boyaların hazırlanışı.....	29
3.2.3.Yapılışı.....	29
3.2.4. Değerlendirme.....	29
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
7. KAYNAKLAR.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR**Simgeler**

β	: Beta
°C	: Derece (celcius)
gr	: Gram
ml	: Mililitre
µm	: Mikrometre

Kısaltmalar

AIDS	: Acquired Immun Deficiency Syndrome
AO	: Acridine Orange (boyama yöntemi)
AP-PCR	: Arbitrary Primed-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
AR	: Auramin Rodamin (boyama yöntemi)
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HSP70	: Heatschock Protein 70kDa
Ig M, G, A, E	: Immun globulin M, G, A, E
IL-12	: Interlökin -12
IMS	: Immunomagnetik Separasyon Yöntemi
INF- γ	: Interferon-γ
IFA	: Immun Floresans Antikor
KCr₂O₇	: Potasyum Dikromat
MAF	: Modifiye Asit Fast Yöntemi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RABD	: Random Amplified Polymorphic Deoksiribo Nükleik Asit
SAF	: Sodyum Asetoasetik asit-Formol
ssrRNA	: Small Subunit Ribosomal RNA
TNF -α	: Tümör Nekroz Faktörü-α

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma

Tablo 2: Mevcut bilgiler ışığında saptanan türler ve yerleştiği konaklar

Tablo 3: Farklı boyama yöntemleriyle boyanan parazit ookistlerinin mikroskopik görünümü

Tablo 4: *Cryptosporidium* ve diğer parazitleri taşıyan çocuklara ait klinik belirtiler

Tablo 5: Çocuklarda ve hastalarda saptanan parazit türleri ve yüzdeleri

Tablo 6: *C. parvum* ookistlerinin saptandığı hasta ve çocukların yaş grubuna göre dağılımı

Tablo 7: *C. parvum*' lu hastalara ait klinik bilgiler

Tablo 8: Türkiye'de çeşitli yörelerden saptanan Cryptosporidiosis prevalansı

Tablo 9: Çeşitli teşhis yöntemlerinin duyarlılık ve maliyet yönünden karşılaştırılması

Tablo 10: Parazitin teşhisinde en çok tercih edilen 3 metodun duyarlılık, özgüllük ve toplam maliyet yönünden karşılaştırılması

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 : *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü

Şekil 2 : *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri

Şekil 3 : Kinyoun Asit-fast yöntemiyle boyanmış *Cryptosporidium* ookistleri I
(x100'lük objektif)

Şekil 4 : Kinyoun Asit-fast yöntemiyle boyanmış *Cryptosporidium* ookistleri II
(x100'lük objektif)

AFYONKARAHİSAR BÖLGESİNDEKİ RİSK GRUPLARINDA CRYPTOSPORİDİUM PARVUM ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada Afyonkarahisar bölgesindeki risk gruplarında *Cryptosporidium parvum*'un araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda 2006-2007 döneminde yapılmıştır. Çalışmada, Afyonkarahisar Çocuk Esirgeme Kurumu'nda kalan 114 çocuk ve hastanemizin farklı birimlerine çeşitli şikayetlerle başvuran 136 hastadan elde edilen toplam 250 dışkı örneğinin parazitolojik incelemesi yapıldı. Toplanan örneklerle çoklaştırma için formol-etil asetat çöktürme yöntemi uygulandı. Daha sonra *Cryptosporidium* ookistlerinin tespiti için, Kinyoun asit-fast yöntemi ile boyandı ve mikroskopta incelendi. İncelenen dışkı örneklerinin 10 (%4)'unda *C. parvum* ookistlerine rastlanmıştır.

Sonuç olarak, *C. parvum* semptomatik ishal olgularında önemli bir etkidir. Bu yüzden risk grupları bu parazit yönünden dikkatle incelenmelidir. Asit-fast boyama tanı için yeterli olabilir ancak çalışmalar dikkatle yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium parvum*, Risk grupları

Sayfa adedi : 55

Tez yöneticisi : Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

AN INVESTIGATION ON *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* AMONG RISK GROUP IN AFYONKARAHISAR REGION

SUMMARY

In this study it is aimed to investigate *Cryptosporidium parvum* among risk group in Afyonkarahisar region.

This study was performed in the Parasitology Laboratory of the Hospital of Afyonkarahisar Kocatepe University, between 2006 and 2007 years. In the study, stool samples collected from 250 patients that are gathered from 114 children who are staying at the Afyonkarahisar Children-care Institution and from 135 patients who are admitted to different clinics of our hospital with various symptoms were examined according to parasitic methodology. Formol-ethyl acetate sedimentation method is performed to stool samples for concentration. After that, for diagnosis on *Cryptosporidium* oocysts, stool samples stained by Kinyoun acid-fast method and screened under the light microscope. *Cryptosporidium* oocyst were observed in 10 (%4) of examined stool samples.

In conclusion, it was found that *C. parvum* was an important agent in symptomatic diarrheal cases. Therefore the parasite must be investigated carefully in risk group. Acid-fast staining can be sufficient to determine the agent, however examinations should be done carefully.

Key words : *Cryptosporidium parvum*, risk groups

Number of pages : 55

Director of Thesis: Doç. Dr. O. Cem AKTEPE

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Cryptosporidiosis, özellikle az gelişmiş ülkelerde, yetersiz beslenme koşullarında, çocuklarda, yaşlılarda ve immün sistemi baskılanmış kişilerde daha sık görülmektedir. Ayrıca parazit son yıllarda Acquired Immun Deficiency Syndrome (AIDS) olgularında ortaya çıkan önemli bir fırsatçı enfeksiyon sebebi olmuştur (1,2). Bu çalışmada Afyonkarahisar İl Sosyal Hizmetler Müdürlüğü'ne bağlı bakımevlerinde barınan çocuklarda ve hastaneye gelen hasta örneklerinde *Cryptosporidium parvum* adlı protozoonun araştırılması amaçlanmıştır.

Endüstrileşmiş ülkelerdeki popülasyonun %25-35'inin, gelişmekte olan ülkelerdeki popülasyonun ise %64'ünün *C. parvum* ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Parazit immunsuprese kişilerde koleraya benzer bir hastalık tablosuyla; yoğun diyare, dehidratasyon ve elektrolit dengesizliğiyle seyreden ağır hastalığa sebep olur, sağlıklı kişilerde ise kısa sürede kendi kendine iyileşebilen diyareye yol açar. Parazit ookistlerinin fekal-oral yolla alınmasıyla bulaş gerçekleşir. Ayrıca kontamine sular ile çiğ sütler bulaşın en önemli kaynağıdır (1-3). *C. parvum*'un evriminde ara konakçı bulunmadığı, tek konağın insan olduğu bildirilmektedir (4).

İnsanlararası bulaşmada genellikle toplu yaşam alanları öne çıkmakta olup, çocuk yuvaları, bakım evleri ve hastane salgınları ile dikkat çekmektedir. Parazitin ookistlerinin ağır çevre koşullarına, özellikle de dezenfektanlara dayanıklı olması kontrol altına alınmasını güçleştirmektedir (5).

Direkt bulaşın fazla olduğu, kişisel hijyenin kontrol altına alınmadığı toplu yaşam alanlarında parazitolojik ajan kaynaklı enfeksiyonların giderek yaygınlaştığı bilinmektedir. Dolayısı ile toplu yaşam birimlerinde sağlığın korunması, daha sağlıklı alanların oluşturulması ve verimliliğin artırılması açısından parazitolojik etkenlerin eradikasyonu önemlidir. Bu çalışmada yuva çocuklarında ve hasta örneklerinde *C. parvum* varlığının saptanması, semptomatik kişilerde antiparaziter tedavinin verilmesi ve hijyen koşullarının iyileştirilmesiyle ilgili önlem önerilerinin verilmesiyle, parazite bağlı oluşabilecek olumsuz etkilerin önlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

C. parvum, 2-6 µm büyüklüğünde coccidian bir protozoon olup, zorunlu hücre içi parazitidir. *C. parvum*, insan ve hayvanlarda sindirim ve solunum yolu epitel hücrelerinin mikrovillus bölgesine yerleşerek bu bölgelerde enfeksiyon oluşturur. Dünya çapında giderek yaygınlaşan hastalığın kanatlıları, balıkları, sürüngenleri ve memelileri kapsayan 200'ü aşkın hayvan türünde etkili olduğu bildirilmiştir (1,2,6-8).

2.1.Tarihçe

Cryptosporidium türleri, 1895 yılında J.J. Clarke tarafından fare gastrik mukoza hücrelerinde “böcek şeklinde sporlar” olarak tarif edilmiştir. Ancak türün ilk ve tam olarak tanımlanmasının E. E. Tyzzer tarafından 1907’de yapıldığı kabul edilmektedir (9). Tyzzer çalışmasında; etkeni eski Yunanca’da “gizli spor” anlamına gelen “*Cryptosporidium*” olarak isimlendirmiştir. Aynı bilim adamı 1910 yılında *Cryptosporidium*’un evrimini açıkladı ve 1912’de insanlarda enfeksiyon yaptığı düşünülen *C. parvum*’u tanımladı. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda kanatlı, soğukkanlı ve memelilerde etkili olan yeni türler tespit edilmiştir (10-12).

Tyzzer parazitle ilgili çalışmalarına 1929 yılında tavuk ve tavşanlarda *C. parvum*’u bularak devam etmiştir. Slavin, 1955 yılında hindilerde *Cryptosporidium*’u önemli bir mortalite ve morbilite sebebi olarak tespit etmiştir. Barker tarafından 1974 yılında sığırlarda ishal etkeni olarak *Cryptosporidium*’un saptanması araştırmacıların araştırmalarını bu noktada artırmalarını sağlamıştır (11,13).

1976’da *Cryptosporidium* ile ilgili ilk insan vakası bildirilmiştir. İlk hasta 2 yaşında bağışıklık sistemi yeterli olan bir çocuk olup, hastalığı akut ve kendi kendine iyileşen enterokolit şeklinde seyir göstermiştir. Bildirilen başka bir vakanın da, 39 yaşında immunsuprese bir kişi olduğu ve parazitin hastada şiddetli ishal oluşturduğu ifade edilmiştir (10,11). Dünya çapında endemik ve epidemik ishal olgularında etken olan parazitin, özellikle insanlar açısından önemi, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde AIDS hastalarında yaygınlaşan ishal olgularıyla anlaşılmıştır (14).

2.2. Taksonomi

Cryptosporidium cinsi Apicomplexa bölümü, Sporozoa sınıfı, Coccidia alt sınıfı, Eucoccidia takımı, Eimerina alt takımı, Cryptosporidiidae ailesi mensubu bir protozoondur (2). Bu türün araştırmacılar tarafından belirlenmiş sınıflandırılması Tablo1’de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (15).

Tablo1. *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma (15)

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik özellikleri
Regnum	Animalia	
Subregnum	Protista	Ökaryotik, tek hücreli canlı
Phylum	Apicomplexa	Polar halka, rhoptriler, mikronemler, conoid ve subpellicular mikrotübüllerden oluşan apikal kompleks yapıları vardır. Veziküler bir çekirdeğe sahip olup tüm türleri parazittir.
Class	Sporozoa	Ookist oluşturma, seksüel ve aseksüel üreme, hücreye giren parazitin kayma kontraksiyon şeklinde hareketi gibi özellikleri vardır.
Supclass	Coccidia	Biyolojileri merogoni, gametogoni ve sporogoni şeklindedir. Seksüel faz hücre içinde gerçekleşir. Ergin gamontlar küçük olup yine hücre içidir, çoğu vertebralılarda parazitlenir.
Ordo	Eucoccidia	Merogoni vertebralı konakta geçer.
Supordo	Eimeriina	Makro ve mikro gamet oluşumu farklıdır. Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet gelişir. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet gelişir. Zigot hareketsiz olup konoid mevcuttur.
Familya	Cryptosporidiidae	Monoksen gelişim söz konusudur ve konak süreci hücrenin yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez, çıplak 4 sporozoiti vardır. Mikrogametleri flajella taşımaz.
Genus	<i>Cryptosporidium</i>	

Cryptosporidium, sporozoa sınıfından olmasına rağmen, farklı birçok özelliği göze çarpmaktadır. Bu farklılıklar içerisinde en önemlisi parazitin spesifik konak ve

doku özelliğinin bulunmamasıdır. Bu özelliklerinden dolayı araştırmacılar arasında, *C. parvum*'un sınıflandırılmasında ve tür sayısında anlaşmazlıklar söz konusu olmuştur. Fakat son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, farklı hayvanlarda değişik *Cryptosporidium* türlerinin varlığından bahsetmiştir. Bu çalışmalarda, morfoloji ve biyolojisi aynı olan birçok türün olmasına rağmen, bulaştırma çalışmalarında farklı hayvanları enfekte etmediği tespit edilmiştir (16).

Günümüzde, 21 farklı *Cryptosporidium* türünün olduğu bildirilmiştir. Bu türler arasında balıklarda *C. nasorum*, kuşlarda *C. meleagridis* ve *C. baileyi*, reptillerde *C. serpentis* ve memelilerde *C. parvum* ve *C. muris* en tanınmış olanlarıdır (14).

Tablo 2. Mevcut bilgiler ışığında saptanan türler ve yerleştiği konaklar (11).

Tür	Araştırmacı -tarih	Konak
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	Fare
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	Fare, İnsan
<i>C. crotali</i>	Triffit, 1925	Yılan
<i>C. vulpis</i>	Wetzel, 1938	Fox
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	Hindi
<i>C. wrairi</i>	Vatterling Jervis, Merrill, Sprinz, 1961	Domuz
<i>C. tyzzleri</i>	Levine, 1961	Tavuk
<i>C. lampropeltis</i>	Anderson, Dusynski Marguardi, 1968	Kertenkele
<i>C. ctenosauris</i>	Dusynski, 1969	Kertenkele
<i>C. ameivae</i>	Peraza ve Bastarda, 1969	Kertenkele
<i>C. agni</i>	Barker ve Carbonell, 1974	Koyun
<i>C. bovis</i>	Barker ve Carbonell, 1974	Sığır
<i>C. anserinum</i>	Proctor ve Kemp, 1974	Kaz
<i>C. cuniculus</i>	İnman, Takeucki, 1979	Tavşan
<i>C. felis</i>	İseki, 1979	Evcil kedi
<i>C. garnhami</i>	Bird, 1981	İnsan
<i>C. nasorum</i>	Levine, 1981	Balık
<i>C. hesi</i>	Levine, 1981	Maymun
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1981	Yılan
<i>C. baileyi</i>	Current, Upton ve Haynes, 1986	Tavuk

Farklı *Cryptosporidium* türlerinin ilk tespitleri, ookist morfolojisi etkenin konak spektrumu ve enfekte ettiği doku göz önünde tutularak yapılmıştır (17).

Cryptosporidium türleri arasındaki ilişkinin anlaşılması ancak moleküler biyoloji alanındaki yenilikler ve bu alanda uygulanan Western-blot, Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Random Amplified Polymorphic DNA (RABD) gibi teknikler sayesinde mümkün olmuştur. Heatschock protein 70kDa (HSP70), ssrRNA (small subunit ribosomal RNA) ve aktin kodlayan genlerin varlığı, izole edilen tüm *Cryptosporidium* türlerinde ortaya konmuş olup ilgili genlerin genomda, 400-500 baz çiftinden oluşan bir bölgede yerleşim gösterdikleri anlaşılmıştır. Yapılan gen analizlerinin değişik *Cryptosporidium* türlerinin filogenetik ilişkisini açıklamada oldukça önemli faydaları olmuştur (18).

Yapılan çalışmalar sonucunda, *Cryptosporidium* türlerinin özellikleriyle ilgili zoonotik ve insan sağlığı açısından önemli bilgiler elde edilmiş olsa da, soyun tür perspektifi tam anlamıyla açıklanabilmiş değildir (17).

Yapılan çalışmalarla, izole edilen parazit türlerinin konağa göre uyum kazanmış genotiplerinin olabildiği anlaşılmıştır. Memeliler açısından en önemli tür olarak düşünülen *C. parvum*'un insan, sığır, fare, gelincik, ayı ve domuz genotipleri bu duruma örnek teşkil etmektedir. Arbitrary Primed-PCR (AP-PCR) yardımıyla yapılan çalışmalar, *C. parvum*'un insan ve sığır serotipinin varlığını kanıtlar nitelikte olmuştur. İnsanlarda görülen su, yiyecek veya bazı faktörlerden kaynaklanan salgınlarda yapılan çalışmalar, *C. parvum*'un hem sığır, hem de insan genotipinin var olduğunu göstermiştir (19-21).

2.3. Morfoloji ve Evrim

C. parvum mide ve bağırsak epitel hücrelerinin, enterositlerin mikrovillus bölgelerinde yerleşim göstermesi nedeniyle diğer hücre içi parazitlerinden ayrılır. Çünkü diğer parazit türleri hücrenin sitoplazması içinde yerleşim gösterirken, *C. parvum* hücrenin ekstrastoplazmik alanında yerleşir ve üremesi birbirini izleyen eşeyli ve eşeysiz üreme şeklinde gerçekleşir (22).

Parazitin yerleşim gösterdiği ve konak hücreden orjin alan bölge “parazitoforoz vakuol” adını alır. İç kısmında parazit içeren bu vakuol, konak hücrenin mikrovillus bulunan yüzeyinde yer alır. *C. parvum*'un yaşam siklusu tek bir

konakta altı gelişim evresi halinde gerçekleşir. Bu gelişim evreleri; Eksitasyon, Merogoni, Gametogoni, Fertilizasyon, Ookist dönemi ve Sporogoni olarak tanımlanmaktadır (10,13,22,23) (Şekil 1, Şekil 2).

2.3.1. Eksitasyon (Kistlerin açılması)

Etkenin dışı ile dışarı atılan formu, sporlanmış ve enfektivite kazanmış ookist formlarıdır. Dışkıyla dışarı atılan bu ookistler, 2-6 µm çapında, kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde dört sporozoit, bir çok küçük tanecikler ve zara bağlı kürecikler yer alır. Ookistler yiyecek, içecek veya bazı diğer çevresel etmenler aracılığıyla oral yoldan, konjunktiva aracılığıyla veya inhale edilerek alınabilmektedirler (24).

Sindirim yoluyla konak hücre tarafından alınan ookistlerin normal şartlarda ince bağırsakta açılması "eksitasyon" olarak da adlandırılır. Kist açılımında rol oynayan faktörler arasında pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik indirgeyici etmenler sayılabilirler. Ağız aracılığıyla alınan ookistler uygun konakların sindirim yolunda açılır ve sporozoitler serbest hale geçer (23-26).

2.3.2. Merogoni (Asexüel çoğalma)

Konağın sindirim yolunda serbest kalan sporozoitler konağın barsak epitel hücreleri (enterositler) içine girerek, epitel hücrelerin mikrovillus bölgesinde trofozoit (tek nükleuslu merontlara) formuna dönüşürler. *C. parvum* için bağırsakta asıl tutunma yerinin jejenumun sonu ve ileum olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber sporozoitler sindirim kanalına ek olarak pankreatik kanalları, safra kanalını ve solunum sistemini de tutabilmektedirler. Sporozoitler 4,9x1,2 µm çapında olup çekirdekleri 1/3 arka kısmındadır, duvarı ise 50 nm kalınlığında, düz ve renksiz yapıdadır (9,12,22,25,27). Sporozoitlerden oluşan trofozoitler ise 2-2.5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapılar olup, ribozomal endoplazmik retikuluma gereksinim duyarlar. Apikal kompleks tam olarak farklılaşmamış halde olup, trofozoitler olgunlaşınca kaybolur ve ribozomal endoplazmik retikulum meydana gelir. Konak hücre içerisinde beslenen, büyüyen trofozoit eşeysiz olarak şizogoni ile çoğalarak 6-8 merozoit meydana getirir. Merozoitleri taşıyan hücreye meront I (şizont) adı verilmektedir. Meront I'lerin parçalanmasıyla serbest hale geçen merozoitler diğer hücrelere girerek yeni bir

şizogoniye başlatırlar ve meront I veya meront II'ye dönüşürler. Şizogoni sonrasında meront II içerisinde 4 merozoit meydana gelir. Meront-II'lerden oluşan merozoitler yeni hücreleri enfekte eder ve gametogoninin oluşmasında rol oynarlar (22,28).

2.3.3. Gametogoni

Şizogoni sonucunda Tip II merontların içinde oluşan 4 merozoit ve hücre parçalanınca serbest hale geçer bu merozoitler yeni bir döngü oluşturmazlar. Fakat bu merozoitler konak içinde yeni hücrelere girdiklerinde mikro veya makro gametositlere, daha sonra da makro ve mikrogametlere dönüşür (9,22,29). Her bir mikrogamontların 16 tane mikrogamet ve her bir makrogamonttan ise yalnızca bir makrogamet meydana gelir (23,30,31).

2.3.4. Fertilizasyon

Yaşam siklusunun dördüncü evresinde, barsak lümeninde serbest olarak bulunan 0,4-0,5 µm büyüklüğünde ve ince yapılı kamçısız mikrogametlerden birisinin, 4-6 µm büyüklüğündeki makrogameti döllemesi sonucunda zigot oluşur (10,31,32).

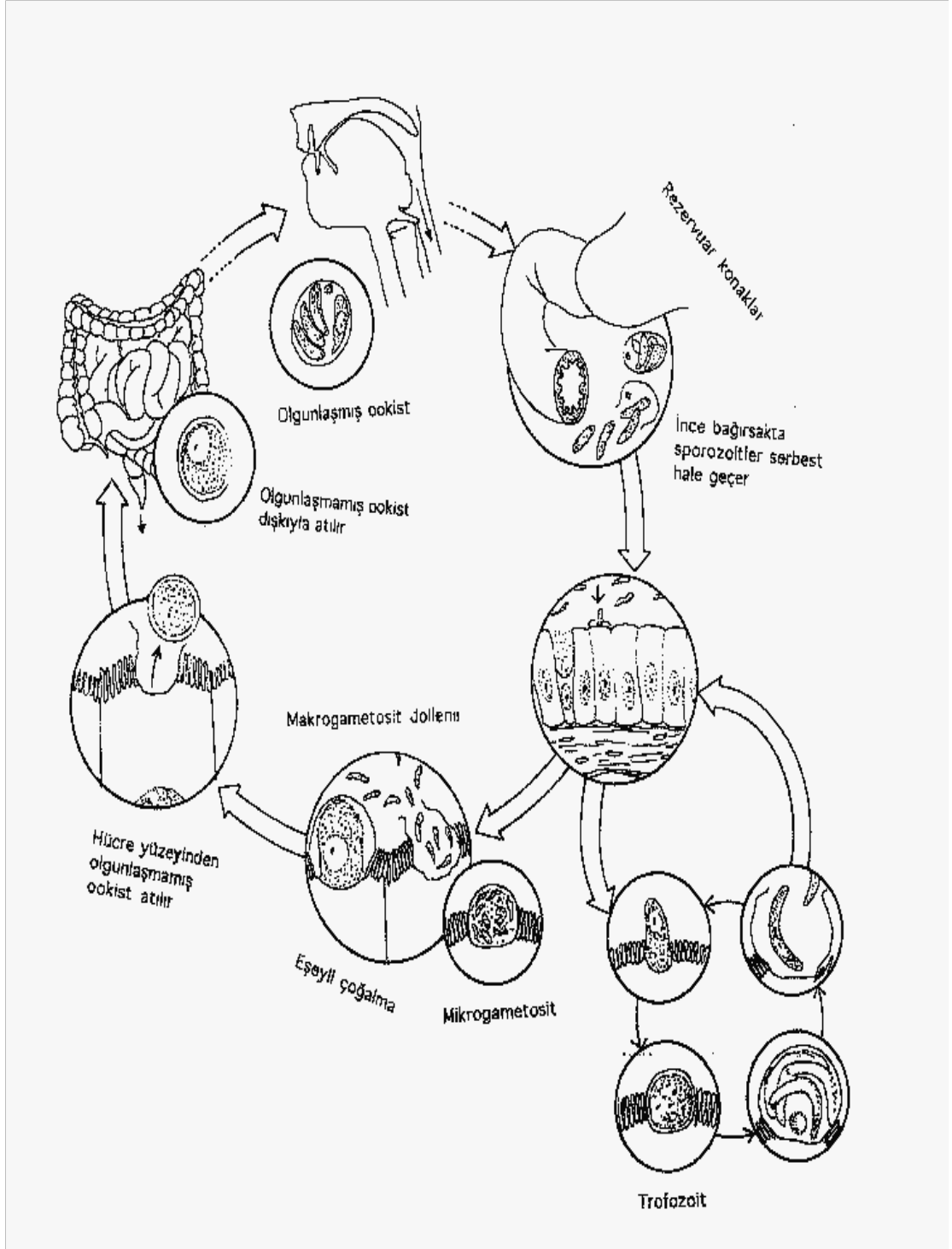
2.3.5. Ookist dönemi

Bu dönemde zigotun etrafı iki veya üç farklı tabakanın birleşmesinden oluşan ookist duvarıyla çevrili haldedir. Zigotun etrafındaki duvarın kalınlaşması, parazitin bir konaktan diğere bulaşmasını sağlayacak olan ookistleri oluşturmak içindir (9). *C. parvum*'un ookist duvarı kimyasal ve mekanik etkilere karşı dirençli bir yapı arz eder. Ookistin elektron mikroskopunda gözlenilebilen en önemli özelliklerinden birisi; ookist duvarı üzerinde ookistin yarısını veya üçte birini saran şerit şeklinde bir yapının mevcut olmasıdır. Ookist duvarının dış tabakasında asidik özellikte glikoprotein filamentleri bulunmaktadır. Orta kısımda mikobakteriyel lipidler ve balmumu benzeri sert yapılı kompleks lipid tabakası yer alır. İç tabakası ise yine glikoproteinleri içerir. Hücre duvarında bol miktarda lipid bulunması, karbol fuksin ile boyamadan sonra ookistin asit-alkol ile dekolorizasyon işleminden etkilenmemesini sağlar (26,32).

2.3.6. Sporogoni

Bu dönemde konak hücrede olgunlaşan ookistlerin içinde sporlanma ile enfektif sporozoitler meydana gelir. *C. parvum* 'un eşeyli üremesi sonucunda 2 farklı tip ookist oluşumu gözlenir. Oluşan ookistlerin yaklaşık %80'i kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlı bir yapı gösterir (9,25). İnce çeperli ookistler içinde 4 sporozoit yer alır. Bu ookistler konak vücudu dışına çıkmadan, bağırsak boşluğuna atılıp bağırsak içinde açılırlar. İçlerinde bulunan sporozoitler serbest kalarak yeni epitel hücrelerine girerler ve konakta enfeksiyonun devamından sorumludurlar. Bu tip bulaş şekli yuvarlak solucanlardan *Strongyloides stercoralis*'in evriminde görülen duruma benzetilerek "iç oto enfeksiyon" adını almıştır (3,22,29).

Kalın çeperli yapıya sahip 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışkısı ile dışarıya atılırlar ve konaklar arası bulaşmada rol oynarlar (24,25,27). Bu tip ookistler hem dış oto enfeksiyon yoluyla, hem kişilerarası direk temasla, hem de bulaşlı yiyecek içeceklerle ağızdan alınır ve bu şekilde parazitoz insanlararası bulaşma gösterir. Yani bulaşma fekal-oral yolla, ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir. Bu kistler çevre ve iklim koşullarına uzun süre dayanıklı yapıdadır (3,4,21,22).



Şekil 2. *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsü (22)

için en uygun konak durumundadır. Enfekte buzağuların, insanlara enfeksiyonun bulaştırılmasında katkısı çok büyüktür (33,34).

Ookist saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi, *C. parvum*'un hücre kültüründe de üretilmesine olanak sağlamıştır, fakat çok sayıda organizma elde edilmemiştir (4). Üretilen hücreler arasında domuz ve tavuk böbrek hücreleri, sığır üreme epitel hücreleri, insan fetal akciğer hücreleri yer alır ve bunlar içinde en uygun olanı insan fetal akciğer hücreleridir (33,35).

Bir araştırmada sığırlardan ve AIDS hastalarından izole edilen *C. parvum* ookistlerinin in vitro olarak açılması ve sporozoit formlarının L929 fare fibroblast hücre dizisinde üretimi sağlanmıştır. Kullanılan bu yöntem, ilaçların in vitro anti *Cryptosporidium* etkinliklerinin araştırılmasında yararlı bulunmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada, insan ince bağırsak epitel dizisinin glukozsuz ortamda üretilmesi durumunda in vitro Cryptosporidiosis modeli olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (36,37).

Hücre kültüründen izole edilen ookistlerin sayısı, tavuk embriyon korio-allantoik membranından ve süt emen farelerin bağırsaklarından izole edilen ookistlerden daha az miktardadır. Ookistlerin hücre kültüründe daha az üreme göstermesi, otoenfektif ookistlerin bu sistemde iyi gelişmemiş olmasına bağlanmıştır (11).

2.5. Epidemiyoloji

Enfekte hayvan ve insanların dışkıyla atılan, dirençli ookistlerle *Cryptosporidium* türlerinin bulaşı gerçekleşir. Cryptosporidiosis zoonoz bir enfeksiyon olup, dünya çapında bir dağılım gösterir. İnsana bulaşmada evcil hayvanların ve besi hayvanlarının, özellikle buzağuların dışkısının rolü büyüktür (3,22,29). Ayrıca çevre ve suların insan ve buzağı kaynaklı ookistlerle enfekte olması sonucu da bulaşma gerçekleşir (23,34,38). Sığırların insan *Cryptosporidium* enfeksiyonları için rezervuar olabileceği düşünülerek bir çalışma yapılmış ve enfekte sığır dışkısı ile teması olan immün direnci sağlam 12 kişide enfeksiyon geliştiği açıklanmıştır (39). Fare ve sıçanların ağız yoluyla, insan veya sığır kaynaklı ookistlerle enfekte edilebilmesi bu durumu güçlendirir hale gelmiştir (40). Yapılan farklı çalışmalarda insanlardan elde edilen ookistlerin kuzular için patojen olduğu, kedi ve köpek gibi ev

hayvanlarının da parazitin neden olduğu enfeksiyona yatkın oldukları bildirilmiştir (39,41).

İnsanlararası kontaminasyon fekal-oral veya anal-oral yolla olabilmektedir (3). Özellikle çocuk bakımevlerinde (42-44) ve hastanelerde (44,45) ortaya çıkan salgınlar insandan insana bulaşın önemini kanıtlayan en önemli olaylar arasında yer alır. Günümüzde *Cryptosporidium* bir turist hastalığı etkeni olarak da bilinir (46-48).

Erişkin şahıslarda *Cryptosporidium* görülme oranı, çocuklara göre daha düşük seviyededir. Çocukluk döneminde ise dört yaş ve özellikle de iki yaş altındaki çocuklarda parazitin görülme sıklığı artar. Bunun yanında parazitoza anne sütü ile beslenmeyenlerin, anne sütü ile beslenenlerden daha sık yakalandıkları tespit edilmiştir (22,49,50).

Cryptosporidium ookistlerinin özellikle nemli hava ve sıcaklıkla beraber doğada konsantrasyon artışına paralel olarak, *Cryptosporidium* enfeksiyonları da artış göstermektedir. Ookistlerin yağışlarla beraber seferber olabileceği ve iklim değişikliği durumlarında, karada ya da su çevrelerinde taşınması ya da inaktivasyonundaki seyrin devam edeceği düşünülmektedir. Bazı bilim adamları Cryptosporidiosis'in özellikle ılık ve ıslak mevsimlerin hastalığı olduğunu belirtmişlerdir. Mevsimlerin bol yağış alması, parazitin içme sularına ve diğer bazı gıdalara bulaşma riskini artırmaktadır. Türkiye'de ise insanlarda Cryptosporidiosis'in bahar aylarında yükselerek, Eylül ve Ekim aylarında en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (34,35,52).

Yiyecek, içecek ve çevresel sistemlerde protozon parazitlerinden olan *Cryptosporidium*'un inaktivasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Soğutma, ısıtma, filtrasyon, çöktürme, UV ışığı, ışınlama, yüksek basınç ve ses dalgalarını içeren bu fiziksel yöntemlerin parazitin hayatta kalmasını ya da yer değiştirmesini etkilediği bildirilmektedir (53).

Bulaşmaya neden olan ookistler günümüzde kullanılan pek çok dezenfektana, soğuğa, sığağa ve neme dirençli yapı gösterirler. Yapılan çalışmalar 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 inaktive oldukları bildirilmiştir (54).

ABD’de bir kaynak suyundan 400.000 kişi enfekte olmuştur. Su kaynaklı epidemiy 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 *Cryptosporidiosis* vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından salgın şeklinde geliştiği bildirilmiştir (23,29). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Cryptosporidium* oocistlerinin 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* oocistleri üzerine etkisi araştırılmış, enfektivitelerinin 1ppm konsantrasyonda 10 dakika sonra ortadan kalktığı gözlenmiştir. *Cryptosporidium* oocistlerinin aynı şartlarda, *Giardia* kistlerine göre ozona 30 kat, klora ise 14 kat daha fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dezenfektanlarla yapılan çalışmalar sonucunda, sularındaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun, klor ya da klordioksitten daha etkili bir dezenfektan olduğu bildirilmiştir (53,55).

İçme suyunun hijyenik olmaması, yetersiz kanalizasyon sistemleri gibi kötü hijyenik koşullar, hayvancılıkla uğraşma, evcil hayvan besleme, veteriner hekimlik ve laboratuvar faaliyetleri gibi mesleğe ait faktörler, epidemik bölgelere yolculuk, immün 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 (2,13,23,49).

Cryptosporidium enfeksiyonları, altı kıta üzerinde 60’tan fazla ülkede saptanmış olup, yapılan çalışmalar prevalansın az gelişmiş ülkelerde daha yüksek olduğu göstermiştir (23). Yapılan dışkı taramalarında Avrupa ve Kuzey Amerika’daki insanlarda %1-3, gelişmekte olan ülkelere ise %7-8.5 oranında parazit prevalansı elde edilmiştir. Yine aynı bölgelerde yapılan serolojik taramalarda ise gelişmiş ülkelere prevalansın %25-35, gelişmekte olan ülkelere ise %65 olduğu belirtilmiştir (56).

Ayrıca son yıllarda *C. parvum*’un organ nakli alıcılarında hastalık sebebi olduğu bildirilmiş olup, enfeksiyonun aşı ya da kan nakli aracılığıyla taşınabileceği ya da çevresel şartlardan kazanılabileceği düşünülmüştür (57).

2.6. Patogenez

Cryptosporidiosis ile ilgili patolojik bilgiler, canlılarda biyopsi ve ölenlerde otopsi bulguları şeklindedir. Yapılan histopatolojik çalışmalar, etkenin gastrointestinal sistemde özefagustan rektuma kadar olan bölgenin herhangi bir yerinde yerleşebileceğini ancak; en ağır enfeksiyonun jejunum bölgesinde olabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmalarda enfekte bağırsak epitel hücrelerinde absorpsiyon işlevinin sekteye uğradığı ve sekresyon salınımının arttığı gözlenmiştir. Etkenin özellikle immün yetmezliği olan şahıslarda solunum sisteminde, hepatobiliyer sistemde ve pankreas kanalında da hastalığa neden olabileceği tespit edilmiştir (11,22,23,29).

Hastalık bağırsaklarda diyare, akciğerlerde ise solunum sistemi bozuklukları halinde şekillenir. Ağır enfeksiyona tutulan hastaların ince bağırsak villuslarında atrofi ve körleşme, kriptlerin boyunda uzama gözlenirken, plazma hücrelerinin ve lenfositlerin lamina propriada infiltrasyonu söz konusu olmuştur (58,59).

Cryptosporidium enfeksiyonlarında hastalığın oluşum mekanizması tam anlamıyla açıklanabilmiş değildir. Bunun yanında hastalıkta ishalin ortaya çıkışında, mukozal yüzeyin azalması ve bütünlüğünün bozulması temel neden olarak gösterilirken, parazitten enterotoksin salgılanmasının da etkili olabileceği göz önünde tutulmuştur. Zarar gören absorpsiyon yüzeyinin bütünlüğüne bağlı olarak B₁₂ vitamini, yağ ve D-xylose malabsorpsiyonunun gelişebildiği belirtilmiştir. Mevcut bilgiler ışığında *Cryptosporidium* enfeksiyonunda mukozal bariyer bozukluğu oluşmakta ve bunun sonucunda da makromoleküllerin permabilitesi artış göstermektedir. Permabilite artışına bağlı olarak barsak epitelinde bulunan iyonlar ve su tekrar barsak lümenine atılmakta ve lümen içi sıvı miktarında artış yaşanmaktadır. Bazı Cryptosporidiosis vakalarında, kolera ve diğer enterotoksijenik mikroorganizmalarda görülen ishale benzer bol miktarda sulu ishal tablosu gözlenmektedir (28,59).

2.7. Klinik bulgular

İnsanda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının kuluçka süresi 2-21 gün olarak bilinse de, bazen bu sürenin konağın sağlık durumuna bağlı olarak 2.5 aya uzayabileceği

bildirilmiştir. Ookistlerin oral yoldan alınmasıyla hastalığa ait klinik belirtilerin ortaya çıkma süresinin 7-10 gün olabileceği bildirilmiştir. Parazitin her yaştaki insanları infekte edebileceği saptanmıştır. Hem immün direnci baskılanmış hem de immün direnci sağlam hastalarda hastalığa ait en önemli klinik belirtinin ishal olarak gözlenmiştir. Yapılan dışkı muayeneleri sonucunda dışkının karakteristik olarak, sulu nitelikte olup bazen mukus ihtiva ettiği ve bol miktarda çıkarıldığı ancak; dışkıda kan ve lökosit görülmediği bildirilmiştir. Hastalarda ishalin yanında kusma, bulantı, kilo kaybı abdominal ağrı, vücut sıcaklığında hafif bir artış, kas ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık ve gibi belirtilerin olabileceği de belirtilmektedir. Ayrıca bu semptomların süresi ve klinik seyrinin konağın bağışıklık durumu ve atılan ookist miktarı ile paralellik gösterdiği bildirilmektedir (3,27,38,60,61).

2.7.1. İmmün sistemi normal hastalar

Cryptosporidiosis bağışıklığı yeterli hastalarda genellikle iki hafta sürer ve hastalığın seyrinde kendi kendine iyileşen diyare gözlenir. Bununla birlikte gözlenen diğer semptomlar ateş, ağrı, karında kramp, iştahsızlık, bulantı ve zayıflama vb şeklindedir. Hastalar genellikle hastaneye yatırılma ihtiyacı olmadan ayakta tedavi edilebilmekte, ancak uzun süren ishallerde çocuklarda dehidrasyon çok belirgin olacağından ve malnütrisyon tablosu da gelişebildiğinden onların hastaneye yatırılması gerekmektedir. Bunun yanında çeşitli nedenlerle oluşan malnütrisyon tablosunun, kişilerin direncini zayıflatması sebebiyle, böyle hastaların *Cryptosporidium* enfeksiyonlarına daha duyarlı hale geldiği belirtilmektedir (11,38,62).

2.7.2. İmmün sistemi baskılanmış hastalar

Cryptosporidium'un immüsuprese kişilerde kısa dönemli ishalden, kronik kolera benzeri tabloya kadar çok farklı şekillerde ortaya çıkabildiği ve ölüm nedeni olabildiği belirtilmektedir. Hastanın kliniği ile şahıstaki immün supresyonun tipi ve derecesi arasında belirgin bir korelasyon mevcuttur. İmmüsuprese hastalarda ishal orta şiddette gelişip kısa sürebilir ya da şiddetli belirtilerle aylarca sürebilir. *Cryptosporidiosis*'in; AIDS, kızamık ve çiçek gibi bazı viral hastalıklarda olduğu gibi, kemik iliği hastalıkları, gamma-globulinlerin düştüğü hastalıklar, insüline bağlı diyabet hastaları, böbrek yetmezliği olan hastalar, karaciğer nakli olan hastalar,

lösemi ve diğer kanser tedavisi uygulanan hastalarda şiddetli semptomlar oluşturduğu belirtilmektedir. AIDS'li kişilerde Cryptosporidiosis belirtisi CD₄ hücre sayısı ile bağlantılıdır. CD₄ hücre sayısı >180 hücre/ml olanların, Cryptosporidiosis'i nispeten hafif geçirdiği, bu sayının altında olanlarda ise kronikleşme izlendiği ve hastalığın süreklilik arz ettiği bildirilmiştir. Bu tip hastalarda hastalık ağır seyreder ve sulu ishal haftalarca hatta aylarca devam eder. Sıvı kaybı oldukça fazla olup, günde 3-6 litre arasında olan sıvı kaybı bazı hastalarda günde 17 litreye kadar çıkabilmektedir. Bu durumdaki hastalar günde 50 kez bile dışkılamaya çıkabilir. Bu hastalarda ateş, dehidrasyon, kilo kaybı, kramp benzeri karın ağrısı ve bulantı gibi semptomların daha belirgin görülür (22,23,29,38,61).

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda *Cryptosporidium*'un ayrıca safra yollarını, pankreas kanalını ve solunum sistemini de enfekte edebileceği bildirilmiştir. Solunum sisteminin enfekte olması durumunda kısa soluk, hırıltılı nefes, ses kısıklığı, öksürük gibi belirtiler belirginleşir. Bronşlarda infiltrasyon, assit ve pankreatit gibi durumlar gelişebilmektedir. Ayrıca alkalen fosfataz, serum amilaz ve bilirubin değerlerinde yükselmelerin olduğu belirtilmiştir. Etken tükürükte, trakea aspirasyonunda, bronkoalveolar lavaj sıvısında ve akciğer biyopsisinde teşhis edilebilmektedir. *Cryptosporidium*'a bağlı olarak oluşan ilk safra kesesi enfeksiyonunun varlığı 1981 yılında AIDS'li hastalardaki safra kesesi ve safra kanalı yangıları şeklinde tespit edilmiştir (22,23,38,58).

2.8. İmmünolojik ve Antijenik yapı

Cryptosporidium enfeksiyonlarına karşı korunmada hem humoral, hem de hücreli immunitenin rol oynadığı belirtilmektedir. Cryptosporidiosis'de ortaya çıkan ilk enfeksiyon immun cevapla önlenemez ve yayılması engellenebilir. Enfeksiyona karşı oluşan ilk immün yanıt, T-lenfosit hücrelerinin artışına bağlı olarak ortaya çıkan barsak yangısı şeklindedir. Bunun yanında enfeksiyonda Interlökin-12 (IL-12), İnterferon- γ (INF- γ) ve Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinlerin bağırsaklarda artışı söz konusudur. Bağırsaklarda artış gösteren bu sitokinler yangınsal bağırsak hastalıklarının etiyolojisinde önemli rol oynadıkları için, Cryptosporidiosis'de mukozal patojenitenin oluşmasından sorumlu tutulmuşlardır. Enfeksiyonun bu immünolojik kontrolünü belirlemek amacıyla fareler üzerinde

çalışmalar yapılmış ve INF- γ 'nın koruyucu immuniteyi sağladığı ve CD $_4^+$ T-lenfosit hücrelerinin enfeksiyonu elimine ettiği tespit edilmiştir. Mukozal seviyede CD $_4^+$ intraepitel lenfositler Cryptosporidial enfeksiyonların kontrollerini sağlamada görev alırken, INF- γ i parazitin enterositlerde gelişimi sırasında direkt olarak yavaşlatıcı etki gösterir. Dolayısıyla CD $_4^+$ T-lenfosit hücre eksikliği olan konakçılarda hastalığa olan duyarlılık artar ve hayati tehlikelere varan ciddi komplikasyonlar gözlenir hale gelir (63-65).

İmmüitesi yeterli kişilerde enfeksiyon sırasında önce Immunglobulin M (IgM) ve sonra da IgG antikor yanıtı oluştuğu bildirilmiştir. IgG düzeyi birkaç ay içinde azalmakla birlikte yıllarca pozitif kalabilmektedir. Enfeksiyon sırasında IgA ve IgE antikorlarının artışının da gerçekteştiği belirlenmiştir. IgA'nın parazitin sporozoit ve merozoit formlarının barsak mikrovilluslarına tutunmasını engelleyici rol oynadığı belirtilmektedir (10,63).

2.9.Tanı

Başlangıçta Cryptosporidiosis tanısı bağırsak biyopsilerinde *C. parvum*'un gelişim evrelerinin gösterilmesiyle konulmuş ve parazitlerin intrasellüler-ekstrasitoplazmik olarak yerleştiği açığa çıkmıştır. Fakat dışkı, balgam ve safra örneklerinde *C. parvum* ookistlerini saptamaya yönelik daha gelişmiş yöntemlerin ortaya çıkışıyla, invaziv, pahalı ve uzun sürede sonuç alınan biyopsi yöntemleri tanıda tercih sebebi olmaktan çıkmıştır (29,66-68). Ayrıca teşhis amacıyla kullanılan ince bağırsak aspiratı, bronkoalveolar lavaj ve şüpheli dokuların biyopsisi gibi yöntemlerin duyarlılığı araştırmacılar arasında tartışma sebebi olmuştur (12,56).

Enfekte konaktan etkenin tespitinde dışkı boyama, Immun Floresans Antikor (IFA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), PCR ve Flow sitometri gibi tekniklerden yararlanabilse de, rutin klinik laboratuvarlarında hastalığın tanısında dışkı taraması ve etkenin mikroskopta görölmesi esastır (12,69).

Cryptosporidium enfeksiyonunun teşhisinde temelde dört yöntem kullanılmaktadır (68). Bunlar:

- Direkt yöntemler
- Serolojik yöntemler
- Moleküler yöntemler

-Histopatolojik yöntemler

2.9.1. Direkt yöntemler

Yapılan çalışmalar *Cryptosporidium* enfeksiyonunda, klinik kullanım alanı göz önünde bulundurulduğunda en kolay ve kesin tekniğin, dışkıyla atılan ookistlerin taraması olduğunu göstermektedir (65).

Dışkının makroskopik bakışı hastalıkta şüphe uyandırıcı nitelikte olsa bile Cryptosporidiosis'e spesifik önemli bir görünüm söz konusu değildir. Dışkıda kan olması hastalık için çok ender bir bulgu olup, bu durumun genellikle parazitlerle birlikte saptanan bir başka enteropatojen ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. İrin için de benzeri şeyler söylenebilir. Cryptosporidiosis ishallerinde mukusa sık olarak rastlanabilmekte ve inceleme amaçlı alınan örneğin ilgili kısımlarından seçilmesinin daha uygun olabileceği belirtilmektedir (12,70).

Toplanan dışkılar kısa zamanda inceleme imkanı yoksa, %10'luk formol, %2.5'lik potasyum dikromat (KCr_2O_7), sodyum asetoasetik asit-formol (SAF) solüsyonları içinde taze olarak saklanabilmektedir (24). %2.5'lik KCr_2O_7 solüsyonu içerisinde +4 °C'de saklanan ookistlerin önemli bir kısmının 3 aydan uzun bir süre canlı kalabildikleri ifade edilmektedir. Ayrıca solüsyonlar içinde saklanan ookistlerin, 12 aydan fazla bir süre DNA ekstrasyonu amacı ile kullanılabilceği bildirilmiştir. Ancak %2.5'lik KCr_2O_7 solüsyonunda saklanan ve daima canlılığını kaybetmeyen ookistlerin enfeksiyon riski taşımaları sebebiyle, çalışmalar süresince dikkatli olunması gerekmektedir. Toplanan dışkıların %10 formol solüsyonunda ise +4 °C'de veya -30 °C'de uzun süre saklanabilmeleri mümkündür. Ancak standart %10 formol fiksasyonunun uzun süreli olması etkenin PCR yöntemiyle etken tanısını olumsuz yönde etkilemektedir (24,25,71-73).

Enfekte konakların dışkıları ile genelde yeterli miktarda ookist atılımı olması sebebiyle, teşhis için konsantrasyon tekniklerine gerek duyulmamaktadır. Bununla birlikte etkenin düşük yoğunlukta atıldığı asemptomatik konaklar, epidemiyolojik taramalar ve su vb çevresel kaynaklardan etken izolasyonu için ön bir etken yoğunlaştırma işlemine ihtiyaç duyulabilmektedir. İncelenen materyalde bulunan PCR antagonistlerinin uzaklaştırılması, çeşitli konsantrasyon teknikleri sayesinde az ya da çok mümkün olabilmektedir (12,74).

Örnekten etken konsantre etmek amacıyla geliştirilen yöntemler arasında; Formol-eter ve Formol-etil asetat sedimantasyon yöntemleri, Sheather'in yüzdürme yöntemi, Percoll-sukroz yöntemi, Doymuş çinko sülfat ve doymuş sodyum klorür yüzdürme teknikleri, Demir III sülfat flotasyonu, Dializ ile profikasyon, Cam çubuk-sütun profikasyonu ve Immunomagnetik separasyon (IMS) yöntemi sayılabilir. Formol-eter ve formol-etil asetat sedimantasyon teknikleri ile Sheather'in yüzdürme yöntemi en çok kullanılan konsantrasyon yöntemleri arasındadır. Çöktürme yöntemi yapılırken diğer parazitler için kullanılan santrifüj hızı, *Cryptosporidium*'un küçük yapılı ookistleri için yeterli olmayabileceğinden, *Cryptosporidium* aranacağı zaman 1000-1500 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılması gerekmektedir (12,24,68,73-75).

Toplanan dışkı örnekleri, serum fizyolojik ile karıştırıp direkt taze preparat halinde x10, x40 objektiflerde incelenebilmektedir. Taze veya yüzdürme yöntemi ile zenginleştirilmiş dışkı örnekleri faz kontrast veya differensiyel interferens kontrast ile nativ olarak tarandığında ookistlerin tespiti mümkün olmaktadır. Tespit esnasında amaca ve tekniğe göre ısı, alkol veya diğer teknikler de kullanılabilir. Genel olarak parazitin ookistlerinin mikroskopik inceleme esnasında mayalarla benzerlik göstermesi sebebiyle, hazırlanan boyasız preparatlarda tanının yapılması zorlaşmaktadır. Dolayısıyla tanı preparatlarının boyama yapılarak incelenmesi tanının yapılmasını kolaylaştırıcı rol oynamaktadır. Diğer pek çok parazitin boyanmasında kullanılan Hematoksilen, Trikrom demir hematoksilen, Polivinil alkol gibi boyama teknikleri *Cryptosporidium* tanısında kullanılmamaktadır. Kimi araştırmacılar iodin ile yapılan boyamanın basit, kolay olması açısından bir ön teşhis yöntemi olarak kullanılabileceğini belirtmiş olsalar da, genel olarak lügol ile boyanan preparatlarda ookistlerin iyi bir şekilde tespit edilemeyeceği bildirilmektedir. Bundan dolayı tespit için ayıt edici bazı boya yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu yöntemler arasında Kinyoun asit-fast boyama yöntemi, Modifiye asit fast sıcak boyama yöntemi, Floresan boyama (Auramin-rhodamine (AR), Acridine orange (AO), Auramin-fenol floresans, Auramin-karbol fuksin), Giemsa ve Safranin-metilen mavisi, Nigrosin, Karbol fuksin boyama yöntemleri sayılabilir (12,24,25,76-80) (Tablo 3).

Tablo 3. Farklı boyama yöntemleriyle boyanan parazit ookistlerinin mikroskopik görünümü (77)

Boyama yöntemi	Ookist	Maya
Modifiye asit fast sıcak	Parlak kırmızı	Mavi-yeşil
Kinyoun asit fast soğuk	Kırmızı-mor	Mavi-yeşil
Giemsa	Eflatun	Eflatun
Acridine-orange	Yeşil-sarı	Kırmızı-turuncu
Auramin -Rhodamin	Portakal rengi	Görülmez

Ookistler, hacim yapıları ve morfolojik özellikleri açısından maya hücreleri, fungal ve küf sporları ve yağ globülleriyle benzerlik gösterirler. Bu yapıları ookistlerden ayırmak amacıyla günümüzde en sık kullanılan ve güvenilir, spesifik ve tanısal değeri en yüksek olan metot asit-fast boyama metodudur (68,77,78,81). Bu boyama yöntemi hem taze dışkıları, hem de %2,5 potasyum bikarbonat veya %10'luk formol eklenerek oda ısısında saklanan dışkıları uygulanabilir özelliktedir. Dolayısıyla Asit-fast boyalarının kullanımının kolay olması, saklanmış dışkıları boyaması, ucuz olması, kırmızı boyanan ookistleri mavi zemin üzerinde kolay bir şekilde göstermesi, ookistlerin iç yapısını ayrıntılı göstermesi ve kalıcı bir boya olması nedeniyle *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde bu boyama yönteminin kullanılması uygun bulunmuştur (75,81).

Modifiye Ziehl Neelsen boyama tekniği ile boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yeşil zemin üstünde, kırmızı-pembe bir renkte gözlenebilmektedir. Bu boyalarla boyanan preparat incelemelerinde ookistin seçilemeyen kısmı, etkenin yüzeyine göre daha koyu boyanırken, mantar sporları, bakteriler, fekal kalıntılar ve diğer asit fast özellik taşımayan yapılar mavi renkte görülürler (65,82).

Safranin-metilen mavisi ile boyanan preparatlarda ookistler turuncu-kırmızı renkte, şeffaf bir hale ile çevrili olarak fark edilirken, fekal kalıntılar mavi renkte gözlenir. Dolayısıyla bu boyama yöntemiyle boyanan preparatlarda ookistlerin tanısı oldukça kolay olmaktadır. Ookistin iç yapısının seçilememesi ve boyanmanın etkenin tümünü kapsamayabilmesi tekniğin olumsuz yönlerindedir (21).

Karbol fuksin boyamada ookistler şiddetli ışık kırıcı özellikte, düzgün duvarlı ve tam oval bir yapıda gözlenirken, zemin kırmızı renkte boyanır. Karbol fuksin boyama yönteminde x40 objektifte mikrometre oynamaları sonucunda, ookistler içerisinde kırmızı kalıntılar şeklinde sporozoit formları fark edilebilmektedir (70,72,83).

Negatif boyama tekniklerinden olan Nigrosin boyamada ise, zemin ve bakteriler yeşil renkte boyanırken, ookistler ve mantar sporlarının boya almadıkları bilinmektedir. Dolayısıyla bu boyama yönteminde ookistlerle mantar sporlarının ayırt edilmeleri belli bir deneyim gerektirir. Aynı şekilde metilen mavisi-eozin ve karbol fuksin boyama tekniklerinde de, Nigrosin'e benzer bir durum söz konusudur ve ortamdaki renk kontrastı hızlı bir taramanın yapılabilmesi için yetersiz kalmaktadır (21).

Giemsa boyama yöntemi, uygulama kolaylığı olan ve hazırlanan preparatların uzun süre saklanabildiği bir yöntemdir. Ancak bu teknikle boyanan preparatlarda renk kontrastı oldukça zayıf olduğundan, ookist yapılarını dışkıda rastlanabilen spordan ve diğer mikroorganizmalardan ayırırken zorluklar yaşanmaktadır (84).

2.9.2.Serolojik yöntemler

Cryptosporidium ookistlerinin teşhisinde serolojik tanı yöntemlerinden olan Western-blot, Latex aglütinasyon, Revers Pasif Hemalutinasyon, IFA ve ELISA yöntemleri de kullanılabilir (79,85-87).

IFA yönteminde, ookist yapısında bulunan antijenik yapılara, floresan boya ile işaretli monoklonal antikorların bağlanması prensibi baz alınmaktadır (74). Bu yöntem diğer protozoon, helmint ve enterik bakterilerle çapraz reaksiyon vermemesi ve parazitin az sayıda ookist içeren dışkı örneklerinde bile teşhis edilebilmesi noktasında önemlidir. Dolayısıyla IFA yöntemi hastalığın erken döneminde tanı konulmasında ve asemptomatik taşıyıcıların belirlenmesinde spesifik bir yöntemdir. IFA testinin özgüllüğü oldukça yüksek olup, asit-fast tekniklerinden daha duyarlı özelliktedir. Ancak pahalı bir teknik olması ve uygulanması için floresan mikroskoba gereksinimin olması testin dezavantajları arasında sayılabilir (68,81). Floresan boyama teknikleriyle boyanan preparatların floresan mikroskopunda x100 objektif

taramasında, ookistler siyah zemin üzerinde sferik, yuvarlak-oval yapıda ve boyaya göre sarımsı elma yeşili veya turuncu renkte kolaylıkla fark edilebilirler. Ancak ookistlerin çoğunun yeteri kadar boya almaması ve yapısının bozulmuş olması gibi nedenlerle iç yapının seçilememesi ve tekniğin kalite kontrolünün zorluğu yöntemin dezavantajlarındandır. (77,88).

AO boyama yöntemi de dışkıdaki ookistlerin tanısında kullanılabilen duyarlı yöntemler arasındadır. AO ile boyanıp pozitif bulunan örneklerin aynı preparat üzerinde asit-fast boyası yapılarak doğrulanabilmesi testin avantajlarındandır. AO boyasıyla mantarlar kırmızı turuncu boyanırken, ookistler sarı yeşil renkte boyanmaktadır (68).

Diğer bir boyama yöntemi olan AR boyama; hücre duvarındaki mikolik aside affinite gösteren bir boya olarak bilinmektedir. Boyamada zıt boya olarak potasyum permanganat kullanılır. Bazı protozoon parazitleri de kapsayan birçok aside dirençli mikroorganizma AR ile iyi boyanır. Bu yöntemde *Cryptosporidium* ookistleri kırmızı zemin üzerinde parlak sarı renkte görülür. Dolayısıyla usülüne uygun bir şekilde boyanan ve karakteristik rengini alan ookistlerin maya ve mantarlarla karıştırılması mümkün değildir (28,68).

ELISA, dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin tanımlanmasında kullanılan serolojik bir yöntemdir. ELISA testinin duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %100 olarak bilinmektedir. ELISA diğer bazı yöntemlere nazaran hem hızlı, hem de kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak günümüz teknolojisini gerektirmesi ve masraflı olması gibi dezavantajları vardır (81).

2.9.3. Moleküler yöntemler

PCR, *Cryptosporidium* türlerinin klinik ve subklinik olgularda ve çevresel kaynaklarda gösterilmesi amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PCR sayesinde numunede bulunan bir ookist bile saptanabilmekte iken, bu sayı mikroskopta yapılan preparat taramalarında 1 gram (gr.) materyalde 10.000-500.000 etkendir. PCR sayesinde uygulamada, materyalde bulunan birden fazla tür taranabilmekte ve kullanılan diğer tekniklerin de duyarlılığını kontrol etmek mümkün olabilmektedir. PCR salgınlarda etkili olan parazit türünün tanımlanabilmesi açısından da iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Sıvı numunelerden

ookist izolasyonu konusunda ELISA tekniğine göre 10^3 - 10^4 kat daha duyarlı olan PCR, artık diğer tanı yöntemleri karşısında yer alan en önemli alternatif bir yöntemdir ve özellikle etkenin hibridizasyon ürünlerini hedefleyen PCR teknikleri, IFA yöntemine nazaran çok etkili bulunmaktadır. PCR kötü koşullarda muhafaza edilmiş, donmuş veya içerisinde çok az etken bulunan numunelerin tanısında dahi kolaylıkla kullanılabilir en uygun yöntem durumundadır (12,80,83,89,90).

PCR, oldukça hızlı, yüksek düzeyde duyarlı ve doğru sonuçlar çıkaran bir test olmasına rağmen yöntemin kullanımını sınırlayıcı pek çok faktörden bahsedilmektedir. Çıplak nükleik asit tespiti sırasında gözden kaçmış diğer mikroorganizmalardan ve laboratuvar kontaminasyonlarından kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmesi, bazı çevresel kontaminantların ölçüm sırasında kalitatif veya kantitatif değerlendirmeye dahil olabilmesi testin dezavantajlarından. Genel olarak PCR laboratuvarında deneyimli elemanlara gereksinim duyulan bir yöntemdir. Dışkıdan etkenin teşhisinde PCR'ı rutin bir şekilde kullanabilmek için kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması ve numuneden ookistlerin titizlikle izole edilmesi gerekmektedir (21). Aynı zamanda, uygun bir ekstraksiyon yöntemi bularak işleme sokmak ve en uygun primerleri seçip kullanmak gerekmektedir. Rutinde yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyonu, dışkıda yer alan safra tuzları, bilirubin, kompleks polisakkaritler ve bazı diğer komponentler PCR tekniğinde inhibitör karakterinde yapılarıdır. Dolayısıyla testin güvenilirliği açısından dışkıda veya diğer numunelerde bulunan inhibitör özelliği gösteren yapıların eliminasyonu gerekmektedir. Son yıllarda, gerek PCR teknolojilerinin gelişmesi, gerekse de bütün inhibitörleri ortadan kaldıran DNA izolasyon kitlerinin üretilmesi, PCR'ın tercih edilmesini sınırlayıcı faktörleri elimine etmiştir (19,74,91).

2.9.4. Histopatolojik inceleme

Özellikle 1980 öncesinde *Cryptosporidium* için kullanılan tek tanı yöntemi, bağırsaklardan biyopsi alınarak mikrovillusların kenarında küçük ve yuvarlak ookistlerin gösterilmesi şeklindeydi. Bu yöntemde hemotoksilen ve eozin gibi boya ile boyanarak çeşitli gelişim safhasındaki *Cryptosporidium*'ların teşhisi yapılabilse de, yöntem identifikasyon için yeterli olmamıştır. Bunun yanında hem

invaziv girişim gerektirmesi, hem de alınan parça için hızlı fiksasyona ihtiyaç duyulması, pahalı olması ve yapılması için fazla zamana gereksinim duyulması gibi sebeplerle günümüzde pek kullanılmamaktadır (11,68).

2.10. Tedavi

Hastalığa ait uygun bir kültür ortamının olmamasından dolayı parazitin biyokimyasal ve metabolik özellikleri üzerinde fazla çalışılmamış ve sonuçta Cryptosporidiosis için hastalığın etkisini geçiren, ookistleri öldüren güvenilir bir ilaç bulunamamıştır. İmmunitesi yeterli bireylerde diyarenin genelde 20 günden az sürmesi, klinik belirtilerin ve ookist atılımının kendiliğinden ortadan kalkması nedeni ile bu tür hastalarda uygulanabilecek etkili bir tedavi yolunun bulunması üzerinde fazla durulmamıştır. Çünkü bu tip hastalarda sıvı ve elektrolit kaybına bağlı dehidratasyon oluşmakta ve hastalık kendiliğinden iyileşmektedir. Bu durumda tedavinin en önemli kısmı nonspesifik antidiyareiklerle birlikte sıvı ve elektrolit desteğiyle sağlanmaktadır (11,23,29,38).

Enfeksiyonun tedavisinde günümüze dek pek çok ilaç denenmiş olup, bunlar arasında en çok denenilen ilaç spiramisin'dir. Wittenberg ve ark. (92) tarafından *Cryptosporidium* saptanan bebeklere spiramisin verildiğinde atılan dışkı hacminin önemli ölçüde azaldığı, ancak yan etkileri nedeniyle ilacın kesilmesiyle ookist atılımının tekrar arttığı belirtilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, Cryptosporidiosis'e bağlı diyaresi olan çocuklara 5 gün boyunca iki doza bölünerek 75mg/kg dozda spiramisin verilmesi halinde, ilacın diyare süresini kısalttığı ancak; ookist atılımını önleyemediği bildirilmiştir (93,94).

Naciri ve ark., buzağılar üzerinde yaptığı çalışmada halofuginone lactate'ın 120mg/kg dozda verilmesi durumunda parazite ait klinik bulguları azalttığını, ilacın kesilmesinden sonra ise hayvanların ookist çıkarımının devam ettiğini bildirmişlerdir (95).

Parazitin tedavisinde kullanılan bir diğer ilaç, aminoglikozit grubu antibiyotik olan paromomisin'dir. Cryptosporidiosis'e yakalanmış 5 AIDS 'li hastaya paromomisin verilmesiyle birlikte hastalardaki ishalin ve diğer belirtilerin azaldığı belirtilmiş ve 3-6 ay sonra hastalardaki belirtilerin tekrar nüksettiği bildirilmiştir. Paromisinle ilgili yapılan diğer bir çalışmada, 10 hastaya 14 gün boyunca 25-35

mg/kg dozda paromomisin verilmiş ve hastalarda dışkılamanın azaldığı ancak ookist çıkarımının devam ettiği bildirilmiştir (96,97).

Bir başka makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin, *Cryptosporidium*'la enfekte AIDS'li hastalara günde 1 gr olarak iki dozda 2-4 hafta boyunca verildiğinde hastaların dışkılama sıklığı ve miktarında azalmaya sebep olduğu, ayrıca hastaların ookist çıkarmaya devam ettiği belirtilmiştir (98).

Konuyla ilgili olarak ABD'de böbrek nakli yapılan Cryptosporidiosis'e yakalanmış 7 yaşındaki bir alıcıya, günde 2 lt'yi aşan uzun süreli diyaresi nedeniyle azitromisin, paromomisin ve nitazoxanid'den oluşan kombine antibiyotik tedavisi uygulanmış ve 4 hafta içinde dışkısının normale döndüğü, hastalığın 6 ay sonra tekrarlamadığı bildirilmiştir (99).

C. parvum enfeksiyonunda ishalin süresi ve şiddetinin konağın immunitesi ile yakından ilişkisi olduğu anlaşılınca, Cryptosporidiosis'in sağaltımı için immunolojik yöntemler denenmeye başlamıştır. Bazı olgularda immun sistemi baskılayan ilaçların kesilmesinden bir süre sonra enfeksiyonun tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu amaçla Cryptosporidiosis'li yedi AIDS hastasına *C. parvum* ile bağışıklanmış buzağı lenf düğümü hücrelerinden hazırlanan lökosit ekstresi oral olarak verildiğinde, hastaların altısında kilo artışı ve barsak hareketlerinde azalma saptanmış ve beşinde dışkıyla ookist çıkarımı durmuştur (100).

2.11. Korunma

Korunmada, insan ve hayvan dışkılarından ve bunlarla enfekte olan toprak, su ve yiyeceklerden sakınılmalıdır. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında öncelikle ookistlerin çevreye yayılmasının önlenmesi gerekir. Parazit ookistleri uzun süre dış ortamda canlılıklarını devam ettirirler ve dışarıda 4°C'de 2-6 ay canlı kalabilirler. Çevre koşullarına ve dezenfeksiyona oldukça dayanıklı yapı gösterirler. Dolayısıyla ookistleri -20°C'de 72 saat dondurma, 45-55°C'de 20 dakika ısıtma işlemleri, ookistin enfeksiyon yeteneğini azaltır veya yok eder (11). Parazit ookistlerine uygulanan dezenfeksiyon işleminde, dezenfektan maddenin çeşidi ile hazırlanan solüsyonun konsantrasyonu ve ookistlerle temas süresi önemlidir. Ookistlerin dezenfeksiyonunda en çok önerilen dezenfektan, sodyum hipokloridin % 2.5'lik solüsyonudur. Ayrıca %5'lik amonyum ve % 10'luk formol solüsyonunda

4°C'de 18 saat tutulduğunda ookistlerin enfeksiyon yeteneği kaybolduğu gözlenmiştir (23,27).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda 2006-2007 döneminde yapılmıştır. Çalışmaya, Afyonkarahisar Çocuk Esirgeme Kurumu'nda kalan ve rutin parazit taraması yapılan 114 çocuk ve hastanemizin farklı kliniklerine çeşitli şikayetlerle başvuran 136 hastadan elde edilen toplam 250 dışkı örneği dahil edilmiştir. Çocuk Esirgeme Kurumu'nda, görevlilerin yardımıyla 7-11 yaş ve 11-18 yaş arası çocuklara temiz ve ağız kapalı gaita kapları dağıtılarak örnekler toplanmıştır. Toplanan örneklerin uygun fiksatifler (%10 formol) içinde hızlı bir şekilde laboratuvara transportu sağlanmıştır. Toplanan örneklerin önce serum fizyolojik ile nativ preparatı hazırlanarak direkt mikroskopik incelemesi yapılmıştır. Daha sonra örnekler formol-etil asetat çöktürme yöntemi ile çoklaştırma yapıldıktan sonra Kinyoun asit-fast yöntemi ile boyanarak *C. parvum* ookistleri yönünden mikroskopta incelenmiştir.

3.1. Formol-Etil Asetat Çöktürme Yöntemi (101)

3.1.1. Kullanılan malzemeler

- %10 Formol
- Etil asetat
- Falcon tüpü (15 ml'lik)
- Pastör pipeti (tek kullanımlık)
- Plastik bardak (tek kullanımlık)
- Tahta çubuk (tek kullanımlık)
- Plastik Süzgeç (tek kullanımlık)
- Gazlı bez
- Rodajlı lam
- Santrifüj

3.1.2.Yapılışı

1. 1-1.5 gr dışkı üzerine 10 ml %10'luk formol çözeltisi dökülerek, tahta bir çubuk yardımıyla homojen bir sıvı oluşuncaya kadar karıştırıldı. Fiksasyonun tam olarak gerçekleşebilmesi için en az 30 dakika beklendi.
2. Karışım çift katlı gazlı bezden diğer bir kap içine süzüldü ve gazlı bezin üzerinde kalanlar atıldı.
3. Süzülen karışımdan 8 ml konik santrifüj tüpüne (falcon tüpü) konuldu ve üzerine 2 ml etil asetat solüsyonu eklendi. Tüpün ağzı kapatılıp 1 dakika altüst yapılarak karışması sağlandı.
4. Santrifüj aletine konan tüpün, 1000-1500 rpm'de 5 dakika santrifüjü yapıldı.
5. Tüp santrifüjden çıkarıldığında, içindeki karışımın dört tabakaya ayrıldığı görüldü. Bunlar;
 - a. En üstte etil asetat tabakası,
 - b. Tüpün duvarlarına yapışan bir dışkı artığı tabakası,
 - c. Formol tabakası,
 - d. Çökelti tabakası olarak tanımlanmaktadır
6. Dışkı artığı tabakası bir çubuk yardımıyla gevşetildikten sonra, tüp hızlıca eğilerek çökelti haricindeki diğer bölümler (üstteki 3 tabaka) döküldü.
7. Çökeltiden bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı ve preparat oda ısısında kurumaya bırakıldı.

3.2.Kinyoun asit-fast boyama yöntemi

3.2.1.Kullanılan maddeler

1. Bazik fuksin,
2. %95 Etil alkol,
3. Fenol kristalleri,
4. Konsantre sülfürik asit,
5. Loeffler'in alkali metilen mavisi,
6. Saf metanol,
7. Distile su,
8. Şaleler,
9. Kurutma kağıdıdır.

3.2.2. Boyaların Hazırlanışı

-Kinyoun Karbol fuksin boyası

- 4 gr bazik fuksin, 20 ml %95 etil alkol içinde eritildi.
- Fenol kristalleri 56 °C'lik su banyosunda eritilerek 8 ml'lik fenol elde edildi.
- Sonra erimiş fenol ile fuksin-alkol karışımına 100 ml distile su ilave edildi.
- Solüsyon 1-2 gün bekletildi ve süzülerek kullanılmak üzere renkli şişede saklandı.

-Dekolorizasyon solüsyonu (%1-2'lik H₂SO₄, %50'lik Etil alkol)

- 98 ml distile su içine dikkatli ve yavaş bir şekilde 2 ml sülfürik asit eklendi.
- Ayrı bir şalede 50 ml etil alkol içine 50 ml distile su ilave edildi.

- Löffler'in alkali metilen mavisi

- 0,3 gr metilen mavisi 30 ml etil alkol içinde eritildi
- 100 ml %0,01 potasyum hidroksit solüsyonu eklendi

3.2.3. Yapılışı

- Taze dışkı örneğinden veya konsantrasyon sonrası elde edilen formolde saklanmış sedimentten her hasta için ayrı bir numara vererek hazırladığımız yayma preparatlar kurumaya bırakıldı.
- Preparat üzerine saf metil alkol dökülüp, 3 dakika bekletilerek tespit edildi.
- Yaymalar içinde karbol fuksin boyası içeren şalede 5 dakika tutularak boyandı.
- Lam üzerindeki boya döküldü, preparat %50'lik alkole batırılıp çalkalandı ve hemen ardından musluk suyunda yıkandı.
- Daha sonra preparat dekolorizasyon işlemi için %1-2 'lik sülfürik asit içeren şalede 1-2 dakika bekletildi ve musluk suyunda yıkandı.
- Son olarak da Metilen mavisi içeren şalede 1 dakika bekletildikten sonra su ile yıkanıp kurumaya bırakıldı.

3.2.4. Değerlendirme

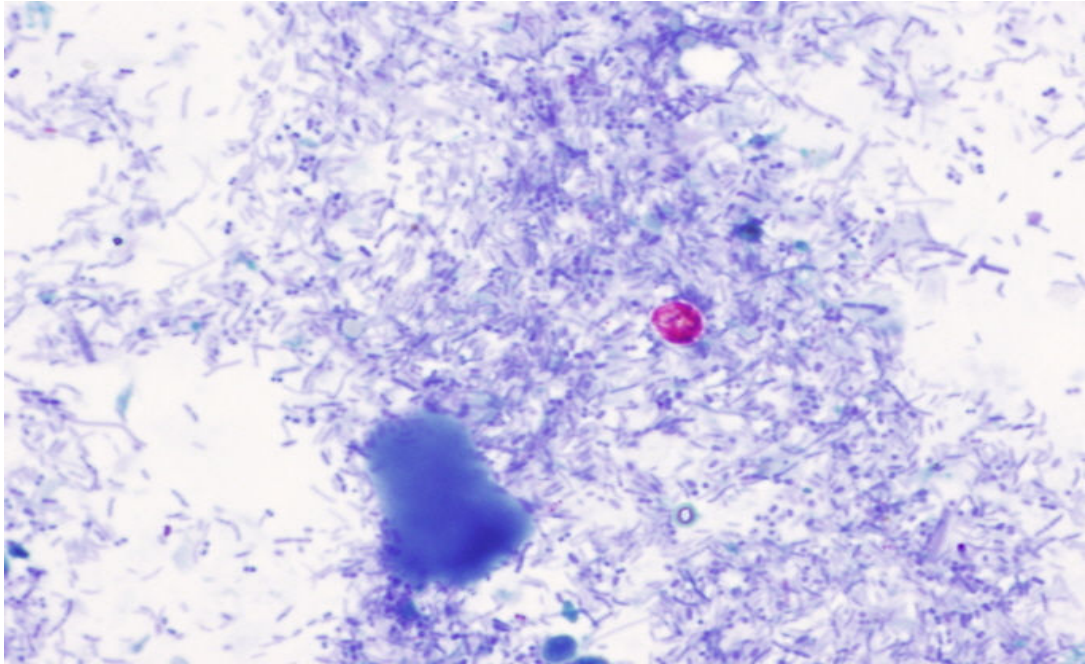
Her preparat x100'lik büyütmede immersiyon yağı ile lamel kullanmadan incelendi. Mavi zemin üzerinde parlak pembe-kırmızı renkte boyanan ve çoğunun içinde siyah

muntaazam olmayan granüller bulunan, 4-6 µm çaplı, yuvarlak yapılar *Cryptosporidium* olarak değerlendirildi. Mantarlar asit fast özellikte olmadıkları için mavi-yeşil boyandı ve ookistlerden daha büyük yapılı olarak gözlendi.

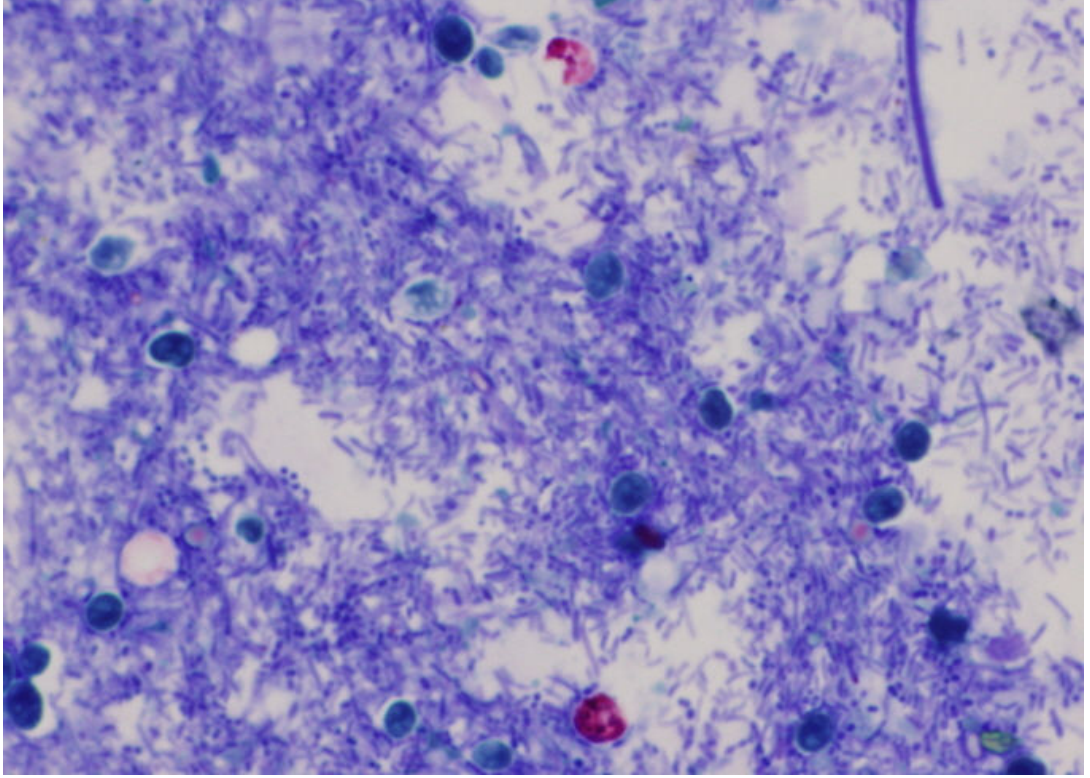
4. BULGULAR

Yaptığımız çalışmada AKÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nden 73'ü bayan ve 63'ü erkek 136 kişi, Afyonkarahisar Çocuk Esirgeme Kurumu'dan ise 30'u bayan ve 84'ü erkek 114 kişiye ait toplam 250 dışkı örneği incelenmiştir. Çocuk Esirgeme Kurumu'ndan toplanan 114 dışkı örneğinin 5 (% 4.4)'inde *C. parvum* saptanmıştır. Ayrıca bu örneklerin 16 (%14.03)'sında *Giardia intestinalis*, 13 (%11.4)'ünde saprofit parazitlere rastlanmıştır. Çeşitli şikayetlerle hastanemizin kliniklerine başvuran hastalardan alınan 136 dışkı örneğinden 5'inde (%3,6) Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile *C. parvum* ookistleri saptanmış olup, bu hastalarda *C. parvum* haricinde başka paraziter bir ajana rastlanmamıştır.

Kinyoun asit-fast boyama yöntemini kullanarak hazırlamış olduğumuz preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri, mavi zemin üzerinde, x10 büyütmede cidarı düzgün, iç yapısı seçilemeyen, küçük, parlak pembe kürecikler şeklinde fark edilirken, x40 büyütmede de yine etrafı koyu bir hale ile kuşatılmış parlak kürecikler şeklinde görülmüş ve özellikle x100 büyütmede immersiyon kullanılarak yapılan incelemelerde içlerinde sporozoit yapıları fark edilmiştir (Şekil 3, Şekil 4).



Şekil 3. Kinyoun asit -fast yöntemiyle boyanmış *C. parvum* ookistleri I (x100)



Şekil 4. Kinyoun asit-fast yöntemiyle boyanmış *C. parvum* ookistleri II (x100)

Dışkı örnekleri incelenen 250 kişinin sıklıkla ishal olmak üzere, ateş, bulantı, kusma, karın ağrısı, zayıflık, iştahsızlık, ağızdan salya akması, halsizlik gibi şikayetlerden en az birini taşıdığı saptanmıştır. Çocuk Esirgeme Kurumu'nda yapılan anket çalışmaları sonucunda elde edilen, *C. parvum* ve diğer parazitlerin saptandığı çocuklara ait klinik belirtiler Tablo 4'te ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Çocuk Esirgeme Kurumu'nda kalan çocuklarda yapılan anket çalışmalarında parazit taşıyan çocuklarda genelde iştahsızlık, halsizlik, karın ağrısı gibi şikayetler olmasına rağmen, örnek verme konusundaki sıkıntı ve hafif seyreden ishal sebebiyle hastaneye başvurunun çok nadir olduğu saptanmıştır. Ayrıca ishal şeklinde belirti verebilen bu paraziter ajanın her pozitif olguda bu semptomu vermediği ve paraziti taşıyan immun sistemi yeterli çocuklar için hiçbir tedavi yöntemi uygulanmamış olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4. *Cryptosporidium* ve diğer parazitleri taşıyan çocuklara ait klinik belirtiler

Hasta adı	Yaş	Saptanan parazit	Ağızdan salya akması	Karın ağrısı	İştahsızlık	Halsizlik	ishal	Doktora gitti mi?
1. hasta	18	<i>C. parvum</i>	yok	yok	yok	yok	yok	hayır
2. hasta	16	<i>C. parvum</i> , <i>G. intestinalis</i> , Saprofit parazit	yok	var	var	var	var	hayır
3. hasta	14	<i>C. parvum</i>	var	var	var	var	yok	hayır
4. hasta	8	<i>C. parvum</i>	var	yok	var	yok	var	hayır
5. hasta	9	<i>C. parvum</i>	var	yok	yok	yok	yok	hayır
6. hasta	16	<i>G. intestinalis</i>	var	var	yok	var	var	evet
7. hasta	17	<i>G. intestinalis</i>	var	var	var	var	yok	hayır
8. hasta	7	<i>G. intestinalis</i>	yok	var	yok	yok	var	evet
9. hasta	16	<i>G. intestinalis</i>	var	var	var	var	var	evet
10. hasta	7	<i>G. intestinalis</i>	yok	var	var	var	yok	hayır
11. hasta	14	<i>G. intestinalis</i>	var	yok	var	var	yok	hayır
12. hasta	9	<i>G. intestinalis</i>	var	var	yok	yok	var	evet
13. hasta	16	<i>G. intestinalis</i>	yok	var	var	var	var	evet
14. hasta	8	<i>G. intestinalis</i>	var	yok	var	yok	yok	hayır
15. hasta	9	<i>G. intestinalis</i>	yok	yok	var	yok	yok	hayır
16. hasta	13	<i>G. intestinalis</i>	yok	yok	yok	var	yok	hayır
17. hasta	14	<i>G. intestinalis</i>	var	var	yok	var	var	evet
18. hasta	10	<i>G. intestinalis</i>	yok	var	yok	var	var	evet
19. hasta	14	<i>G. intestinalis</i>	var	var	var	var	yok	hayır
20. hasta	14	<i>G. intestinalis</i> , Saprofit parazit	var	yok	var	var	yok	hayır
21. hasta	13	Saprofit parazit	var	yok	yok	yok	yok	hayır
22. hasta	7	Saprofit parazit	yok	var	yok	yok	yok	hayır
23. hasta	11	Saprofit parazit	var	var	yok	yok	yok	hayır
24. hasta	10	Saprofit parazit	yok	yok	yok	yok	yok	hayır
25. hasta	11	Saprofit parazit	yok	var	yok	var	yok	hayır
26. hasta	9	Saprofit parazit	yok	yok	var	var	var	evet
27. hasta	13	Saprofit parazit	var	yok	yok	yok	yok	hayır
28. hasta	16	Saprofit parazit	yok	yok	yok	yok	yok	hayır
29. hasta	15	Saprofit parazit	yok	yok	var	var	yok	hayır
30. hasta	10	Saprofit parazit	yok	yok	yok	var	yok	hayır
31. hasta	8	Saprofit parazit	var	var	var	yok	var	evet

Afyonkarahisar'daki risk gruplarından 250 kişinin dışkı örneği toplanarak yapılan gaita taramalarda bulunan *C. parvum* oranı %4 'tür (Tablo 5)

Tablo 5. Çocuklarda ve hastalarda saptanan parazit türleri ve yüzdeleri

Bulunan parazit	Pozitif olgular					
	Çocuk		Hasta		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>C. parvum</i>	5	4.4	5	3.6	10	4
<i>G. intestinalis</i>	16	14.3	0	--	--	--
Saprofit parazitler	13	11.4	0	--	--	--

Tablo 6. *C. parvum* ookistlerinin saptandığı hasta ve çocukların yaş grubuna göre dağılımı

Örnek Alınma yeri	Yaş grubu	<i>C. parvum</i>		Toplam Kişi sayısı
		Sayı	%	
Çocuk Esirgeme Kurumu	11 yaş ve altı	2	2.9	67
	11 yaş üstü	3	6.4	47
AKÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi	11 yaş ve altı	1	4.7	21
	11-40 yaş	1	2.2	44
	40 yaş üstü	3	4.2	71

Afyonkarahisar Çocuk Esirgeme Kurumu çocuklarından alınan 114 dışkı örneğinin 47'si 11 ve üstü yaş grubuna ait olup, bunların 3'ünde (%6.4) *C. parvum* ookistleri ve 67'si 11 yaşından küçük çocuklara ait olup, bunların da 2 (%2.9)'ünde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır.

Hastanemizin kliniklerine başvuran çeşitli yaş grubuna sahip 136 hastadan alınan dışkı örneğinin 21'i 11 yaş altı gruba ait olup, 1 (%4.7)'inde, 44'ü 11-40 yaş grubuna ait olup 1 (%2.2)'inde, 71'i 40 ve üstü yaş grubuna ait olup 3 (%4.2)'ünde *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (Tablo 6)

C. parvum pozitif saptanan olguların klinik dağılımına bakıldığında iki tanesi dahiliye hastası olup, bunlardan biri Kronik Böbrek Yetmezliği olan ve diyaliz ünitesine bağlanan bir hasta idi. *C. parvum* ookistlerine rastlanan diğer

hastalar acil servis, kadın hastalıkları ve çocuk hastalıkları kliniklerine başvurmuşlardır. Hastaneye başvuran hastalardaki parazitin görülme sebepleri arasında immün sistemin yetersizliği, alınan antibiyotikler, hastaların sosyo-ekonomik düzeyi, yaşadıkları mekandaki alt yapı yetersizlikleri sayılabilir. *C. parvum* pozitif olguların yaş, semptom, geldiği klinik ve sahip olduğu ek hastalığı gösteren bilgiler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. *C. parvum*’ lu hastalara ait klinik bilgiler

Hasta adı	Yaşı	Dışkıının durumu	Örneğin alındığı bölüm	Bir başka hastalık
1. hasta	8	Çok sulu	Çocuk Hastalıkları	Bulunmamaktadır
2. hasta	29	Çok sulu, mukuslu	Acil servis	Bulunmamaktadır
3. hasta	51	Mukuslu	Kadın Doğum	Bulunmamaktadır
4. hasta	51	Sulu	Dahiliye	Bulunmamaktadır
5. hasta	57	Sulu, mukuslu	Diyaliz	Kronik Böbrek Yetmezliği
6. hasta	8	Sulu	Çocuk Esirgeme Kurumu	Bulunmamaktadır
7. hasta	9	Çok sulu	Çocuk Esirgeme Kurumu	Bulunmamaktadır
8. hasta	18	Mukuslu	Çocuk Esirgeme Kurumu	Bulunmamaktadır
9. hasta	14	Mukuslu	Çocuk Esirgeme Kurumu	Bulunmamaktadır
10. hasta	16	Çok sulu	Çocuk Esirgeme Kurumu	Bulunmamaktadır

5.TARTIŞMA

İnsanlarda ve pek çok hayvan türünde, değişik derecelerde ishal tablosu ile karakterize hastalık oluşturabilen *Cryptosporidiosis*'in, ılıman bölgeler başta olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde giderek yaygın hale gelen bir dağılıma sahip olduğu bildirilmiş olup, gençlerde ve immün yetmezlik problemi bulunan bireylerde problem yarattığı vurgulanmıştır (8,24,74).

Özellikle son yıllarda önemi artan *Cryptosporidium* türlerini, enfekte insan veya hayvanlardan tespit etmek amacıyla doku biyopsisi, dışkı boyama, ELISA, IFAT, PCR gibi tekniklerin kullanılabileceği bildirilmiştir. Kullanılan yöntemler için değişik materyallerden yararlanılabilsede yapılan çalışmalar, *Cryptosporidiosis*'te teşhis için en kolay tekniğin boyama ile dışkı taraması olduğu bildirilmiştir. Toplanan dışkı örneklerinin, direkt taze preparat hazırlayarak x10, x40 objektiflerde incelenebileceği ancak, genel olarak boyasız preparatlarda tanı zorlukları yaşandığı belirtilmiştir (12,25,65).

Sosyo-ekonomik düzeyi düşük ve bireysel hijyene dikkat edilmeyen geri kalmış veya az gelişmiş ülkelerde daha önce yapılan çalışmalar, *Cryptosporidium* ve diğer bağırsak parazitlerinin yüksek olduğunu, ülkelerin gelişmişlik oranıyla birlikte bu oranın da düştüğünü ortaya koymuştur (1,56).

Parazitin prevalansı ile ilgili 1983 yılından sonra farklı coğrafi bölgelerde yapılan bazı araştırmalar sonucunda elde edilen bilgiler şu şekildedir: 1992-2003 yıllarında İngiltere ve Wales'deki 4321 hastayı etkileyen, su yoluyla bulaşan intestinal diyarenin 89'unun epidemiyolojik ve mikrobiyolojik karakterleri rapor edilmiştir. Salgınların 24 (%27)'ünün kamuya ait su örneklerinden, 35 (%39)'ünün yüzme havuzundan, 25 (%28)'inin özel su örneklerinden ve 5 (%6)'inin diğer kaynaklardan bulaştığı ve salgınların %69'unda *Cryptosporidium* türünün etken olduğu bildirilmiştir (102).

Finlandiya'da 154 erişkin hastanın %9,1'inde (103), Brezilya'da semptomatik 117 hastanın %8'inde enfeksiyon saptanmıştır (104). İspanya'da gastrointestinal sistem şikayeti olan 339 hastanın %0,9'unda (105), Kanada'da 621 diyareli hastanın %1,2'sinde *Cryptosporidium* oookistlerinin saptandığı bildirilmiştir (106).

Kosta Rika'da 278 diyareli hastanın %4.3'ünde Giemsa boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* enfeksiyonu görülmüş, yılın sıcak, yağmurlu ve nemli aylarında olgu sayısının giderek artış gösterdiği bildirilmiştir (107). Bangladeş'de yapılan bir araştırmada, semptomatik 578 hastanın %4.3'ünde enfeksiyon etkenleri görülmüş olup yılın sıcak ve nemli ayı olan Mart ayında enfeksiyon oranında artış kaydedildiği bildirilmiştir (108). Hindistan'da akut diyareli 682 hastanın %13'ünde enfeksiyon saptanmasına rağmen kontrol olgularının da %9.8'inin enfekte bulunması, antibiyotik kullanımı sonrası enfeksiyon görülme sıklığının arttığını kanıtlamıştır (109).

Fransa'da diyare nedeniyle hastaneye kaldırılan 190 çocuğun %2.1'inde (11), ABD'de 1703 hastanın %2.8'inde, Avustralya'da ishal nedeniyle hastaneye yatırılan 884 çocuğun %4.1'inde (54), Venezüella'da 2 yaşın altındaki akut diyareli çocuklarda %10,8 oranında (54), Yeni Zelanda'da ishalleri olan 36 çocuğun %22'sinde parazite ait ookistlerin olduğu tespit edilmiştir (11).

İngiltere'de bir eğitim hastanesinde 2197 hastanın %0,5'inde parazit saptanmış ve sadece immün direnci düşük ve kendiliğinden iyileşmeyen diyaresi olan hastalarda etkenin araştırılması önerilmiştir. Yine İngiltere'de gastrointestinal sistem yakınması olan 867 hastanın %5'inde *Cryptosporidiosis* tanısı konmuş, 5 yaşın altındaki çocuklarda bu oranın %7 olduğu bildirilmiştir (110). Liberya'da 6-9 aylık yaş grubundaki 374 çocuktan diyarelilerde %8.4, asemptomatiklerde %5.9 oranlarında bulunmuş, ayrıca enfeksiyon oranı 2.5 yaşın altında ve biberonla beslenen çocuklarda yüksek, anne sütü ile beslenenlerde ise düşük düzeylerde saptanmıştır (111). İngiltere'de yapılan diğer bir çalışmada semptomatik 742 çocuğun %6'sında *Cryptosporidiosis* tanısı konmuş, çoğu 2 yaşın üstü olan infekte olguların %89'unda sulu diyare, %80'inde kusma gibi semptomların görüldüğü bildirilmiştir (112).

AIDS'li hastalarda parazitin prevalansının araştırılması çalışmalarında; ABD'de 19.182 AIDS hastasının %3.6'sında *Cryptosporidiosis* tanısı konulmuş, AIDS'li 174 çocukta bu oran %5.1 olarak saptanmıştır (113). Brezilya'da AIDS'li 131 hastanın %19.1'inde (114), Venezüella'da 29 AIDS 'li hastanın %41.3'ünde (49), Küba'da dışkıları incelenen 67 AIDS'li hastanın %11.9'unda, Zaire'de AIDS'li

ve kronik diyareli 106 hastanın %21'inde, Zambia'da dışkıları incelenen 63 AIDS'li hastanın %32'sinde (115) Cryptosporidiosis tanısı konulmuştur.

Türkiye'de değişik yörelerde yapılan araştırmalar prevalansın %0-35.5 oranında olduğunu belirtmiştir (84). İzmir'de 0-6 yaş grubu 600 çocuk üzerinde yapılan araştırmada ise, hastaların sadece %0.1'inde etken görülmüştür (116). Konya'da yapılan bir araştırmada 250 kişiye ait dışkı örneğinin %1.6'sında (117), Sivas'da yapılan bir araştırmada 110 kişiye ait dışkı örneğinin %11.8'inde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır (50). İzmir'de Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hemodiyaliz Ünitesi'nde yapılan bir çalışmada, böbrek yetmezliği olan 46 hastanın %30.4'ünde ookist saptanmıştır (118). Eskişehir'de 0-6 yaş grubu ishalleri 650 çocuğa ait dışkı örnekleri incelenmiş ve %3.6'sında pozitif sonuç elde edilmiştir (35). Ankara Onkoloji Hastanesi'nde 106 neoplastik hasta üzerinde yapılan çalışmada %16.9 oranında ookistlere rastlanmıştır (84). Elazığ'da 0-5 yaş grubu ishalleri 417 çocuğa ait dışkı örneklerinin %4.55'inde *C. parvum* ookistleri saptanmıştır (119). İstanbul'da yapılan bir araştırmada 5 yaşın altındaki diyareli 73 çocuğun yalnızca 1'inde Modifiye Asit Fast Yöntemi (MAF)'le Cryptosporidiosis saptanmıştır (120). Türkiye'de insanlardaki Cryptosporidiosis prevalansı Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Türkiye'de çeşitli yörelerden saptanan Cryptosporidiosis prevalansı (84).

Şehir	Çalışma grubu	(%)	Araştırmacılar
Ankara	İshalleri 106 kanserli olgu	16.9	Tanyüksel ve ark. (1995)
	İshalleri olmayan 60 kanserli olgu	0	
İzmir	İshalleri 31 kanserli olgu (1-18 yaş)	35.5	Ok ve ark. (1995)
	İshalleri olmayan 28 olgu	14.0	
İzmir	Hemodiyalizli 46 olgu (16-69 yaş)	30.4	Ok ve ark. (1996)
Elazığ	Hemodiyalizli 41 olgu (14-67 yaş)	7.1	Yücel ve ark. (2000)
	İshalleri 194 olgu (0-60 yaş)	1.54	
Eskişehir	İshalleri 607 olgu (0-6) yaş	3.6	Doğan ve Akgün (1998)
Bursa	İshalleri 173 çocuk	2.9	Mıstık ve ark. (1992)
Adana	İshalleri 110 olgu (4-6 yaş)	11.8	Özcan ve ark. (1987)
	İshalleri olmayan 58 olgu (4-6 yaş)	4.1	
Sivas	İshalleri 110 olgu (0-80 yaş)	11.8	Özçelik ve ark. (1996)

Tarafımızdan yapılan bu araştırmada ise, 250 kişiye ait dışkı örneğinin incelenmesi sonucu saptadığımız %4 *C. parvum* oranı, yurdumuzda daha önce yapılan araştırmaların sonuçlarına benzerlik göstermekte ve gelişmekte olan ülkemizde parazit oranının gelişmiş ülkelere göre arttığı gerçeğini doğrulamaktadır.

Cryptosporidium ookistlerinin özellikle nemli hava ve sıcaklıkla beraber doğada konsantrasyon artışına paralel olarak, *Cryptosporidium* enfeksiyonları da artış göstermektedir. Bilim adamları araştırmaları sonucunda Cryptosporidiosis'in özellikle ılık ve yağışlı mevsimlerin hastalığı olduğu konusunda fikir birliğine varmışlardır. Bu mevsimlerde, yağışın fazla olması nedeniyle parazit'in içme sularına ve diğer bazı gıdalara bulaşma riskinin artırdığı, Türkiye'de ise insanlarda Cryptosporidiosis'in bahar aylarında yükseldiği, Eylül ve Ekim aylarında ise en yüksek artışını gösterdiği bildirilmiştir (34,35). Yaptığımız araştırmada ocuk Esirgeme Kurumu'dan toplanan örneklerin Eylül-Ekim döneminde toplanmış olması, bu örneklerde parazit'in 114 çocukta yaklaşık %4.4 oranında görülmesinde etkili olabilir. Hastaneye gelen örnekler ise yılın çeşitli aylarında geldiği için bunlardaki parazit dağılımının mevsimlerle ilişkisi göz ardı edilmiştir.

Cryptosporidiosis, özellikle az gelişmiş ülkelerde, yetersiz beslenme koşullarında, çocuklarda, yaşlılarda ve immün sistemi baskılanmış kişilerde daha sık görülmekte olup son yıllarda AIDS olgularında ortaya çıkan önemli fırsatçı enfeksiyonlar arasındadır. Immunsuprese kişilerde koleraya benzer bir hastalık tablosuyla; yoğun diyare, dehidratasyon ve elektrolit dengesizliğiyle ağır hastalığa neden olurken sağlıklı kişilerde kısa sürede kendi kendine iyileşebilen diyareye neden olduğu bildirilmiştir. İnsanlararası bulaşın oduğunu kanıtlayan en önemli olaylar özellikle ocuk bakımevlerinde ve hastanelerde ortaya çıkan salgınlardır (1,2,42-45).

Hastalığın hem immün direnci sağlam, hem de immün direnci baskılanmış hastalarda en önemli klinik belirtisinin ishal olduğu gözlenmiştir. Dışkının karakteristik olarak, bol miktarda çıkarıldığı, sulu nitelikte olduğu, bazen mukus ihtiva ettiği ancak; dışkıda kan ve lökosit görülmediği bildirilmiştir. Bununla birlikte abdominal ağrı, bulantı, kusma, vücut sıcaklığında hafif bir artış, kas ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi belirtilerin olduğu grlmştir. Bu

semptomların süresi ve klinik seyrinin konağın bağışıklık durumu ve atılan ookist miktarı ile paralellik gösterdiği bildirilmektedir (2,27,38,61).

Bölgemizde yapılan bu çalışmada saptanan %4'lük parazit oranı, toplu yaşam yerlerinde parazitin arttığını bildiren araştırmaları destekler niteliktedir. Örnek toplamadan önce yaptığımız anketlerde parazit saptanan kişilerde karın ağrısı, ağızdan salya akması, iştahsızlık, halsizlik, anal bölgede kaşıntı gibi şikayetlerin görülmesinin destekleyici olduğu düşünülmüştür. Yalnız Çocuk Esirgeme Kurumu çocuklarında hastalık için karakterize belirti olan ishalin nadir görülmesi veya hiç görülmemesi şaşırtıcı olmuştur. Genellikle adölesan çağa yakın yaşlarda ve kurumda barınan çocuklarda şiddetli belirtiler söz konusu olmaması, örnek verme konusundaki isteksizliği meydana getirmiş ve hastaneye başvuru söz konusu olmamıştır. Ayrıca bu çocukların paraziti taşımalarına rağmen, immun sistemlerinin normal olması nedeniyle hastaneye başvurma gereksinimi duymadıkları düşünülmüştür. Hastaneden toplanan örneklerde ise başta ishal olmak üzere çeşitli semptomların olduğu görülmüştür. Bu semptomların süresi ve klinik seyri hastadan hastaya değişiklik göstermiştir. Hastaneye çeşitli sebeplerle başvuran immün sistemi düşük veya baskılanmış hastalarda hastalık kendi kendine iyileşmemiş, bunun için ilaç tedavisi gerektirmiştir. Toplanan dışkı örnekleri içerisinde *Cryptosporidium* ookistlerinin saptandığı dışkıların miktar olarak fazla, makroskopik olarak sulu nitelikte olduğu görülmüştür.

İngiltere'de gastrointestinal sistem şikayetleri olan 867 hastada %5 oranında, 5 yaşın altındaki çocuklarda ise %7 oranında Cryptosporidiosis tanısı konduğu bildirilmiştir (110). Çocukluk çağında prevalansın yüksek olmasının nedeni, bu yaş grubunda fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması, temizlik kurallarına yeterli özenin gösterilmemesi ve immun sistemlerinin tam gelişmemiş olması en önemli nedenler olarak gösterilmiştir (10). Yapılan bu çalışmada örnek toplamadaki zorluklar, yeterli zaman olmayışı, çocukların dışkılama zamanında belirsizlik olması ve şikayetlerini anlaşılır bir şekilde anlatamayacaklarını düşünerek 0-6 yaş grubu çocuklardan örnek taraması yapılmamıştır. Dolayısıyla 6 yaşın altındaki çocuklarda parazitin yetişkinlere göre hangi oranlarda olacağı tespit edilememiştir.

Ayrıca Afyonkarahisar bölgesine ait AIDS'li olguların oranı çok düşük olduğu için, bu grup hastalardan örnek alımı söz konusu olmamıştır. Çalışmamızda

Çocuk Esirgeme Kurumu'nda kalan çocuklarda oranın yüksek olmasının nedenleri arasında çocukluk yaş grubunda fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması, hijyen kurallarına yeterli özenin gösterilmemesi, çocukların iyi bir tuvalet eğitimi bilgisi olup olmaması, toplu halde yaşamaları, dengeli beslenmemeleri olabileceği düşünülmüştür.

Hastaneden alınan örneklere sahip hastalardan ikisi dahiliye kliniği hastası olup, bunlardan biri Kronik Böbrek Yetmezliği olan ve diyaliz ünitesine bağlanan bir hastadır. Diğer *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanan hastalar acil servis, kadın hastalıkları ve doğum, çocuk hastalıkları kliniklerine başvurmuşlardır. Hastaneye başvuran hastalardaki parazitin görülme sebepleri arasında immün sistemin düşüklüğü, alınan antibiyotikler, hastaların sosyo-ekonomik düzeyi, alt yapısı yetersiz yerlerde yaşamaları, içme suyu kaynaklarının kirlilikleri olabileceği düşünülmüştür.

Cryptosporidium ookistlerinin teşhisi asit fast boyalarıyla yapılabildiği gibi, floresan boyama metotları da tanıda kullanılabilir. Boyama tekniklerinin mikroskopik tanıda dışkısında az sayıda parazit bulunduran kişilerin ve taşıyıcı olguların tespitinde düşük duyarlılık gösterdiği, serolojik ve floresan boyama yöntemlerinin daha değerli olduğu bildirilmektedir. Fakat serolojik teşhis yöntemlerinin pahalı olması, donanımlı cihazlara ve floresan tekniği için floresan mikroskopuna ve deneyimli elemana gereksinim duyulması gibi çeşitli dezavantajları vardır (21,68,72,81,92).

Bölgemizde yapılan bu çalışmada ucuz, kolay ve daha pratik olması sebebiyle Kinyoun asit-fast boyama yöntemi tercih edilmiştir. Asit-fast boyaları ile bu parazitin diğer parazitlerden kolayca ayrılması, maliyetinin düşük olması, pratik ve kısa sürede sonuç alınabilmesi, laboratuarda kullanımının kolay olması ve belli bir deneyime sahip kişiler tarafından tanının kolaylıkla konulabilmesi gibi sebeplerle, bu boyama yöntemlerinin rutin klinik laboratuarda diğer yöntemlere tercih edilebileceği görüşündeyiz.

MacPherson ve ark. (77), 1993 yılında yaptıkları bir araştırmada altı teşhis metodunun duyarlılık oranlarını ve her bir testin maliyetini karşılaştırarak, Tablo 9'da verilen sonuçları elde etmişlerdir. Bu araştırmacılar, *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisi için kullanılan 6 bu altı metodun tercih sırasını Ziehl Neelsen boyama,

Auramin-rhodamin boyama, Modifiye şekerli yüzdürme yöntemi, Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi, Giemsa ve IFA yöntemi olarak belirtmişlerdir.

Tablo 9. Çeşitli teşhis yöntemlerinin duyarlılık ve maliyet yönünden karşılaştırılması (77)

Teşhis Yöntemleri	Duyarlılık %'si	Bir testin maliyeti (Kanada \$)
Auramin-rhodamin	94.4	0.89
İndirekt immün floresan	83.3	2.57
Ziehl-Neelsen	75.9	0.75
Modifiye şekerli yüzdürme	66.7	0.10
Giemsa	64.8	0.28
Sheather şekerli yüzdürme	87	0.84

Yine Kehl ve ark. (81) tarafından yapılan başka bir çalışmada *Cryptosporidium*'un teşhisi için 129 dışkı örneğinde üç farklı metot; duyarlılık, özgüllük ve toplam maliyet yönünden karşılaştırılmış ve Tablo 10'da yer verilen sonuçlar bulunmuştur.

Tablo 10. Çeşitli teşhis yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük ve toplam maliyet yönünden karşılaştırılması (81).

Boyama metodu	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Toplam maliyet US(\$)
Kinyoun asit-fast	96.4	99	1.17
ELISA	94.5	100	15.93
Direct immünfloresan	96.4	100	12.60

Bölgemizde yapılan bu araştırmayla, *C. parvum* ookistlerinin mikroskopik incelemede rahatlıkla görülebildiği, dikkatli çalışıldığı takdirde gözden kaçırılmayacağı ve bu durumda diğer tanı yöntemlerine gerek kalmayacağı kanaatine varılmıştır. Ayrıca boyama yönteminin ucuz olması maliyet yönünden, kullanımının kolay olması ve kısa sürede sonuç alınabilmesi zaman ve işgücü yönünden hastanemize tasarruf sağlamıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak;

Afyonkarahisar bölgesindeki risk gruplarında *C. parvum* araştırılması amacıyla yaptığımız bu çalışmada 250 kişiye ait dışkı örneğinden 10'unda *C. parvum* türü saptanmış olup, elde ettiğimiz parazit oranı %4 olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu %4'lük oran, yöremizdeki parazitöz sorununu bir kez daha gözler önüne sermiştir. Bu çalışma, özellikle bakımevlerinde kalan çocuklarda ve diğer risk grupları için, ishalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*'un enterik patojen olarak önemsenmesi ve ayırt edici tanıya gidilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle parazitoloji laboratuvarında, bu parazitin rutin incelemeye dahil edilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Öneriler:

Oluşabilecek *C. parvum* enfeksiyonlarının engellenmesi ve insan sağlığının korunması, daha sağlıklı alanların oluşturulması ve verimliliğin artırılmasıyla ilgili olarak;

- Öncelikle yaşanan bölgede parazitin var olup olmadığının saptanması ve bu konuda bölge halkının bilgilendirilmesi,
- Başta hastane, bakımevi olmak üzere çeşitli toplu yaşam alanlarında hijyen kurallarına özen gösterilmesi, çocukluk çağından itibaren iyi bir tuvalet eğitimi verilmesi, doğru ve yeterli beslenme şeklinin öğretilmesi,
- Bu tür toplu yaşam yerlerinde *Cryptosporidium* ookistini öldürmek için %3'lük hidrojen peroksit ve %1'lik amonyum içeren dezenfektanlar kullanılması, özellikle de kreşlerde çocukların kullandığı eşyaların dezenfeksiyonunda amonyumun istenmeyen kokusuna karşılık %3'lük hidrojen peroksit kullanılması,
- *C. parvum* ookistlerine karşı hidrojen peroksit gaz plazma sterilizasyon yönteminin etkili bir yöntem olması sebebiyle, hastane kaynaklı bulaşları azaltmada özellikle endoskopi cihazı gibi tıbbi materyallerin bu yolla dezenfekte edilmesi,

- Evcil hayvan besleyenlerin ve hayvancılıkla uğraşanların, hayvanların rutin kontrollerini yaptırması,
- Veterinerlik, laboratuvar faaliyetleri vb mesleklerde olanların çalışmalarında kontamine koşullara dikkat etmeleri, sterilizasyon ve dezenfeksiyon kurallarına uymaları,
- Bölgedeki kanalizasyon sistemlerinin vb alt yapı düzenlemelerinin iyileştirilmesi,
- İçme suyu ve havuzların arıtılma çalışmalarında kullanılan çeşitli dezenfektanların konsantrasyonlarının ve sürelerinin iyi ayarlanması, yaygın şekilde kullanılan ‘nominal 1 mikron’ filtrelerinin oozistlerine karşı işe yaramaması sebebiyle şişelenmiş sularda ‘absolüt 1 mikron’ kelimelerinin aranması,
- Çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi yetersiz olan kişiler özellikle de HIV ile enfekte hastalar *C. parvum* açısından risk gruplarını oluşturdukları için, bu kişiler tarafından suların kaynatılmış veya şişelenmiş halde kullanılması, sebzelelerin iyice yıkandıktan sonra pişirilerek tüketilmesi, taze meyva suyu yerine, pastörize edilmiş olanların tercih edilmesi, yine bu kişilerin enfekte kişilerle, çiftlik veya ev hayvanları ile temasının engellenmesi,
- Daha önce parazitle enfekte olmuş HIV’li hastalarda, parazit taşıyıcılığı uzun süreli olup, tekrar enfeksiyon oluşturma potansiyeli olması sebebiyle, bu kişilerin hamam, yüzme havuzu vb yerleri kullanmasının engellenmesi,
- Enfeksiyonun görüldüğü epidemik bölgelere gerekmedikçe yolculuk yapılmaması,
- Uzun süreli ishal, karın ağrısı, halsizlik, kusma, iştahsızlık, kilo kaybı, kas ağrıları vb durumlarda hemen kliniklere başvurulması gibi önlemlerin alınması gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Gödemerdan A, Kalkan A, Özkellekçi A, Erensoy A, Kılıç S. Sırrı (1999) İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklığı, *Türkiye Parazitoloji Derg.* **23(2)**.
2. Altıntaş, K. (2002) Tıbbi Parazitoloji, Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları, 170-172
3. Köktürk O. (2002) Parazit Hastalıkları Grup Başk., Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, *Toraks Derg.*, Cilt 3, Ek 5.
4. Terzi G. (2005) Gıda Kaynaklı Protozoon Enfeksiyonların İnsan Sağlığı Açısından Önemi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı-Samsun, *YYÜ Vet. Fak. Derg.* **16(2)**, 47-55.
5. Jokipii L., S. Pohjola, A. Jokipii (1983) *Cryptosporidium*: A frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms, *Lanset ii*: 358-360.
6. Ergüven S., Arıkan S., Akyön Y., Yurdakök K., Günalp A. (1998) Hipogama-globulinemili bir hastada *Cryptosporidium*, *Giardia* ve *Hymenolepis* koenfeksiyonu, *Ankara Mikrobiyoloji Bülteni Derg.* **32(1)**, 85-91.
7. Çetinkaya Figen (2004) *Cryptosporidium parvum*'un bulaşmasında su ve gıdaların rolü, *Uludağ Üniv. J. Fac Vet. Med.* **23 (1-2-3)**, 103-109.
8. Miller D.L., Ligett A., Radi Z.A., Branch L.O. (2003) "Gastrointestinal Cryptosporidiosis in a puppy", *Vet. Parasitol.* **115**, 199-204.
9. Ok Ü.Z., Üner A., Korkmaz M. (1995) "Cryptosporidiosis. In: Immun yetmezlikte önemi artan hastalıklar", *Türkiye Parazitoloji Derg.* **12**, Ege Üniv. Basımevi, Bornova, İzmir, 23-42.
10. Current W.L., Bick P.H. (1989) Immunology of *Cryptosporidium* sp., *Pathol Immunopathol Res.* **8**, 141-160.
11. Fayer R, Ungar B.L.P. (1986) *Cryptosporidium* sp and Cryptosporidiosis, *Microbial Rev.* **50**, 458-483.

12. Sears C.L., Kirckpatrick, B.D. (2001) In: “Cryptosporidiosis and Isosporiosis”, *Principles and Practise of Clinical Parasitology*, John Wiley & Sons Ltd. Pres., 139-164.
13. Spano F, Crisanti A (2000) *Cryptosporidium parvum*: The many secrets of a small genome, *Int. J. Parasitol* **30**, 553-565.
14. Tzipori S., Ward H. (2002) “Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease”, *Microbes and Infection* **4**, 1047-1058.
15. Mehlhorn H., Piekarsk G. (2002) “Grundriß der Parasitenkunde”, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, Berlin.6.Auflage, 516.
16. Xiao L., Morgan U.M., Fayer R., Thompson R.C.A., Lal A.A. (2000) *Cryptosporidium* systematics and implications for public health, *Parasitol Today* **16**, 287-292.
17. Egyed Z., Sreter T., Szell Z., Varga I. (2003) “Charecterization of *Cryptosporidium spp.*-recent developments and future needs”, *Vet. Parasitol*, 103-114.
18. Xiao L., Sulaiman I. M., Ryan U.M., Zhou L., Atwill E.R., Tischler M.L., Zhang X., Fayer R., Lal A.A. (2002) “Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health”, *Int .J. Parasitol.***32**, 1773-1785.
19. Xiao L., Alderisio K., Limor J., Royer M., Lal A.A. (2000) “Identification of species an sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a Small-Subunit rRNA based diagnostic and genotyping tool”, *App. And Env. Microbiol.* **66(12)**, 5492-5498.
20. Pereira, M.G.C., Atwill, E.D., Crawford, M.R., Lefebvre, R.C. (1998) “DNA sequence similarity between California isolates of *Cryptosporidium parvum*”, *Applied and Env. Microbiol.* **64(4)**, 1584-1586.
21. Fayer R., Morgan U., Upton S.J. (2000) “Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification”, *Int. J. Parasitol.* **30**, 1305-1322.
22. Saygı G. (1998) Temel Tıbbi Parazitoloji, Esnaf Ofset Matbacılık, Kasım, 78-80.

23. Ungar B.L.P. (1995) Infectious Diseases and Their Etiologic Agents, volume 2, section H, in Principle and Practise of Infectious Diseases Editors, Mandell G.L, Bennet J.E., Dolin R, Fourth Edition, Churchill livingstone, New York.
24. Starling C.R., Arrowood M.J. (1993) "Cryptosporidia", In: Parasitic Protozoa, vol. 6. *Academic Press*. **65**, 159-224.
25. Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (1990) "Cryptosporidiosis of man and animals", *CRC Pres*, USA, 199.
26. Robin H.J., Petry F. (1999) *Cryptosporidium parvum*: Structural compenents of the oocyst wall, *J. Parasitol* **85(5)**, 839-849.
27. Unat E.K., Yücel A, Altaş K, Samastı M. (1995) Unat'ın Tıp Parazitolojisi, *İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yay.* **15**, İstanbul.
28. Yetkin M.A. (1998) Immun yetmezlikli hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması, Gazi Üniv. Tıp Fak. Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
29. Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. (2002) Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi cilt.2, Nobel tıp Kitapevi, 1919-1920
30. Özer E (1990) Evcil hayvanlarda Cryptosporidiosis, *Ankara Üniv. Veteriner Fak. Derg.* **38(1)**, 20-31.
31. Erdoğan D.D. (2003) "İnsanlarda Cryptosporidiosis dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri", Uzmanlık Tezi, Ege Üniv. Tıp Fak. Sağ. Bil. Enstitüsü, 110s.
32. Mark A.C., Maria T.K., Byron L.B. (1999) The ultrastructure of gametogenesis of *Cryptosporidium baileyi* in the respiratory of broiler chickens, *J. Parasitol* **85(4)**, 609-615.
33. Edited R.B., O Donoghue P. (1999) Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*, *Int. J. Parasitol* **29**, 1379-1413.
34. Harp J.A., Goff J.P. (1998) "Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves", *J. Dairy Sci.* **81**, 289-294
35. Doğan N., Akgün Y. (1998) "İshalli olgularda *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması", *T. Parazitol. Derg.* **22(3)**: 243-246
36. McDonald V., R. Stabies, D.C. Warhurst, M.R. Barer, D.A. Belewet, H.D.Chapman, G.M.Conolly, P.L.Chiodini, K.P.W.C.McAdem (1990) In

- vitro Cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anti-Cryptosporidial drugs, *Antimicrob. Agents Chemoter.* **34**, 1498-1500.
37. Fichtenbaum C.J., D.J. Ritchie, W.G. Powderly (1993) Use of paromomycin from treatment of Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *Clin. Infect. Dis.* **16**, 298-300.
38. Markell E.K., Voge M, John D.T. (1992) *Medical Parasitology*, 7th Edition, WB saunders Company Philadelphia.
39. Current W. L., N.C. Reese, J.V. Ernst W.S., Bailey, M.B.Heyman, M.D. Weinstein (1983) Human *Cryptosporidiosis* in immunocompetent and immunodeficient persons studies of an outbreak and experimental transmission, *N. Engl. J. Med.* **308**, 1252-1257
40. Reese N.C., W.L. Current, J.V. Ernst, W.S. Bailey (1982) *Cryptosporidiosis* of man and calf; a case report and result of experimental infections in mice and rats, *Am.J.Trop.Med. Hyg* **31**, 226-229.
41. Tzipori S., K.W. Angus, I. Campbeli, E.W.Gray (1982) Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolated from a human patient with diarrhoea, *Gut* **23**, 71-74.
42. Alpert G., L.M. Bell, C.E. Kirkpatrick, L.d. Budnick, J.M. Campos, H.M. Friedman, S.A. Plotkin (1986) Outbreak of Cryptosporidiosis in day care center, *Pediatrics* **77**, 152-157
43. Public Health Laboratory Service Study Group (1990) Cryptosporidiosis in England and Wales; prevalence and clinical and epidemiological features, *Br. Med J.* **300**, 774-777.
44. Sarıkaya R. (2004) *Cryptosporidium* Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme, *Gazi Üniv. Kırşehir Eğitim Fak. Yayını*, cilt 5, sayı 2.
45. Martino P., G. Gentile, A. Caprioli, L. Baldassori, G. Doneli, W. Arcese, S. Fenu, A. Micozzi, M. Venditti, F. Mandelli (1998) Hospital-acquired Cryptosporidiosis in a bone marrow transplantation unit, *J. Infect. Dis.* **158**, 647-648.
46. Sterling C.R., K. Seegar, N.A. Sinclair (1986) *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea, *J. Infect. Dis.* **153**, 380-381.

47. Taylor D.N., R. Houston, D.R. Shlim, M. Bhaibulaya, B.L. Ungar, P. Echeverria (1988) Etiology of diarrhea among. Travelers and foreign residents in Nepal, *JAMA* **260**, 1245-1248.
48. Özkul İ.A., Alçıgır G., Kutsal O. (1991) “Bursal *Cryptosporidiosis* in chickens associated with marak’s disease”, *Doğa-Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, Tubitak, **16**,1-9.
49. Bonilla L.C., Gzanıpa N., Cano G., Raleigh X., Quijada L. (1992) *Cryptosporidiosis* among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulia State, Venezuela, *J. Trop. Med. Hyg.* **47(5)**, 582-586.
50. Özçelik S., Dökmetaş S., Sümer Z., İçağasıoğlu D., Dökmetaş İ. (1996) Gastroenteritlerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı, *T. Parazitol Derg.* **20(3)**, 333-337.
51. Current W.L., Garcia L.internet. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body_Cryptosporidiosis_life_cycle_Irg.htm
52. King B.C., Monis P.T. (2007) Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment, *Parasitology Rev.* **134(Pt 3)**, 309-23, Epub 2006 Nov 13.
53. Erickson M.C., Ortega Y.R. (2006) Inactivation of protozoan parasites in food, water and environmental systems, *J. Food Prot. Rev.* **69(11)**, 2786-808.
54. Özçel M.A. (1995) İmmun yetmezlikle önemi artan parazit hastalıkları, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:12, Ege Üniv. Basımevi, Bornova, İzmir
55. Over U. (1996) İshalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*’un rolü ve sağlıklı popülasyonda seroprevalansı, Marmara Üniv. Sağlık Bil. Ens, Doktora Tezi.
56. Fahey T.M.D. (2003) “*Cryptosporidiosis*”, *Infectionus Disease Update* **10(2)**, 75-80.
57. Barsoum R.S. (2006) Parasitic infections in transplant recipients, *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **2(9)**, 490-503.
58. Graaf C.D., Vonopdenbosch E., Ortaga-More L.M., Abbasi H., Peters J. (1999) A review of the importance of *Cryptosporidiosis* in farm animals, *Int. J. Prasitol* **29**, 1269-1287.

59. Clayton F., Heller T., Kotler D.P. (1994) Variation in the enteric distribution of Cryptosporidia in acquired immunodeficiency syndrome, *J. Clin. Pathol.* **102**, 420-425.
60. Abubakar I., Aliyu S.Y., Arumugam C., Hunter P.R., Umsan N.K. (2007) Prevention and treatment of Cryptosporidiosis in immunocompromised patients, *Cochrane Database Syst Rev.*24(1): CD004932.
61. Fındık D. (1994). *Cryptosporidium*, *T. Parazitol. Derg.* **18(2)**, 107-112.
62. Hashmey R., Smith N.H., Cron S., Graviss E.A., Chappell C.L., White A.C. (1997) Cryptosporidiosis in Houston, Texas a report of 95 cases, *Medicine*, **76(2)**, 118-139.
63. McDonald V. (2000) Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*, *Parasite Immunol* **22**, 597-604.
64. Chai J.Y., Guk S.M., Han H.K., Yun C.K. (1999) Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune response of mice experimentally infected with *C. parvum*, *J. Parasitol.* **85(2)**, 234-239.
65. Emre Z., Alabay M., Düzgün A., Çerçi H. (1997) “Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal specimens”, *T. J. Vet. and Animal Sci.* **21**, 293-296.
66. Clark D.P. (1999) “New insights into human Cryptosporidiosis”, *Clin. Microbiol. Rev.* **12(4)**, 554-563
67. Current W.L., L.S. Garcia (1991) Cryptosporidiosis, *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 325-358.
68. Casemore D.P. (1991) Laboratory methods for diagnosing Cryptosporidiosis, *J.Clin. Pathol.* **44**, 445-451.
69. Gasser R.B., O’Donogue O. (1999) “Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*”, *Int. J. Parasitol.* **29**, 1379-1413.
70. Erman N., Beyazıt A., Öz İ. (2000) “İzmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda Cryptosporidiosis’in yaygınlığı”, *Bornova Vet. Kontr. ve Araşt. Ens. Derg.* **25(39)**, 33-38.
71. Limor J.R., Lal A.A., Xiao L. (2002) “Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR”, *J. Clin. Microbiol.* **40(7)**, 2335-2338.

72. Weber R., Bryan R.T., Juranek D.D. (1992) "Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal spesimens", *J. Clin. Microbiol.* **30(11)**, 2869-2873.
73. Suresh, P., Rehg, J.E., "Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces", *J. Clin. Microbiol.* **34(1)**, 38-40 (1996).
74. Carey C.M., Lee H., Trevors J.T. (2004) "Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst", *Water Res.* **38**, 818-862
75. Ok Ü.Z., Girginkardeşler N., Kilimcioğlu A., Limoncu E. (1997) Dışkı inceleme yöntemleri, Bölüm 1, Parazit Hastalıklarında Tanı, Editörler: Özcel M.A., Altıntaş N., 1. Baskı, Ege Üniv. Basımevi, İzmir.
76. Akşehirli Ş.G. (1995) "Kayseri'de 0-5 yaş grubu ishallerde *Cryptosporidium*'un araştırılması", Dok. Tezi, Erciyes Üniv. Sağlık Bil. Enstitüsü, Kayseri, 80.
77. MacPherson D.W., McQueen R. (1993) "Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods", *J. Clin. Microbiol.* **31(2)**, 198-202.
78. Reisner B.S., Spring J. (2000) "Evaluation of a combined acid-fast-trichrome stain for detection of Microsporidia and *Cryptosporidium parvum*", *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**, 777-779.
79. Silva C.V., Ferreira M.S., Gonöalves-Pires M.R.F., Costa-Ruiz J.M. (2003) "Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro., **98(8)**, 1097-1099.
80. Leng X., Mosier D.A., Oberst R.D. (1996) "Simplified method for recovery and PCR detection *Cryptosporidium* DNA from bovine feces", *App. and Env. Microbiol.* **62(2)**, 643-647.
81. Kehl K.S.C., Cicirello H., Havens P.L.(1995) Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species, *J. Clin. Microbiol.* **33(2)**, 416-418.

82. Gün H., Tanyüksel M., Haznedaroğlu T. (1997) “Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması”, *T. Microbiol. Cem. Derg.* **24**, 116-119.
83. Özlem M.B., Eren H., Kaya O. (1997) “Aydın yöresi buzağılarında *Cryptosporidium*’ların varlığının araştırılması (1)”, *Bornova Vet. Kontr. ve Araşt. Enst. Md. Derg.* **22(36)**, 15-22.
84. Tanyüksel M., Haznedaroğlu T., Gün H. (1995) “Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium spp.* araştırılması”, *T. Parazitol. Derg.* **19(1)**, 56-63.
85. Garcia L.S., Shimizu R.Y. (1997) “Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens”, *J. Clin. Microbiol.* **35(6)**, 1526-1529.
86. Priest J.W., Kwon J.P., Moss D.M., Roberts J.M., Arrowood M.J., Dworkin M.S., Juranek D.D., Lammie P.J. (1999) “Detection by enzyme immunoassay of serum Immunoglobulin-G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens”, *J. Clin. Microbiol.* **37(5)**, 1385-1392.
87. Siddons C.A., Chapman P.A., Rush B.A. (1992) “evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples”, *J. Clin. Pathol.* **45**, 479-482.
88. Mtombo M.M.A., Nash A.S., Blewett D.A., Wright, S. (1992) “comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocyst in cat faecal specimens”, *Vet. Parasitol.* **45**, 49-57.
89. Morgan U.M., Thomson R.C.A. (1998) “PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward?”, *Parasitol.Today* **14**, 469.
90. Jenkins M.C., Tout J., Abrahamsen M.S., Lancto C.A., Higgins J., Fayer R. (2000) “Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucidase”, *J. Microbiol. Methods.* **43**, 97-106
91. McOrist A.L., Jackson M., Bird A.R. (2002) “A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples”, *J. Microbiol. Methods* **50**, 131-139.

92. Wittenberg D.F. (1989) Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: Results of a double-blind randomized trial, *J. Infect. Disease* **159**(1), 131-132.
93. Soave R., C.S. Wikel (1990) *Cryptosporidium* and other protozoa including *Isospora*, *sarcocystis*, *Balantidium coli* and *Blasycystis*, *Principles and practice of infectious diseases*. 3rd Edition. Ed. Mandell G.L., R.G. Douglas Jr., J.E. Bennett, *Church-ill livingstone Inc*, New York, 2122-2130.
94. Saes-Liorens X. (1989). Sipiramycin treatment of *Cryptosporidium enteritis*, *J. Infect. Disease* **160**, 342-343.
95. Naciri M., Mancassole R., Yvone P., Peeters J.E. (1993) The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves, *Vet. Parasitol.* **45**, 199-207.
96. Anand A. (1993) Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *Clin. Infect. Disease* **17**, 297-298.
97. White A.C. (1994). Paromomycin for Cryptosporidiosis in AIDS, *J. Infect. Disease* **170**, 419-429.
98. Blanshard C. (1992) Azithromycin, paromomycin and letrozuril in the treatment of Cryptosporidiosis, *Third European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV I-Infection*, Abstract Paris.
99. Hong D.K., Wong C.J., Gutierrez K. (2007) Severe Cryptosporidiosis in a seven-year-old renal transplant recipient: case report and review of the literature, *Pediatr Transplant* **11**(1), 94-100.
100. Mc Meeking A., Borkowsky W., Klesius H., Bonk S. (1990) A controlled trial of bovine dialyzable leukocyte extract for Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *J. Infect. Disease* **161**, 108-112.
101. Özcel, M.A., Altıntaş, N. (1997) Parazit hastalıklarında tanı, Türkiye Parazitoloji Derneği, yayın no,15
102. Smith A., Reacher M., Smerdon W., Adak G.K., Nichols G., Chalmers R.M. (2006) Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003, *Epidemiol. Infect.* **134**(6), 1141-9. Epub 2006 May 11.
103. Jokipi L., Pohjola A, Jokipii A (1983) A frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms, *Lancet*, 358, 360.

104. Fayer R., Andrews C., Ungar B.L.P., Blagburn B. (1989). Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of Cryptosporidiosis in neonatal calves, *J.Parasitol. Mikrobiol.* **75**, 393-397.
105. Holten- Anderson W., Gerstoft J., Henriksen A, Petersen N.S. (1984) Prevalence of *Cryptosporidium* among patients with acute enteric infection, *J. Infect* **9**, 277-282.
106. Ratnam S., Paddock J., McDonald E., Whitty D., Jong M. (1985) Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in fecal sample submitted for routine microbiological examination, *J. Clin. Microbiol* **22**, 402-404.
107. Mata L., H. Balanos, D. Pezarro, M. Viyes (1984) Cryptosporidiosis in children from some highland costa Rican rural and urban areas, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**, 24-29.
108. Shadid N.S, Rahaman A.S.H.M., Mata L.J., Sanyal S.C. (1985) Cryptosporidiosis in Bangladesh, *British Med. J.* **290**, 114-115.
109. Mathan M.M., Venkatesan S., George R., Mathew M., Mathan V.J. (1985) *Cryptosporidium* and diarrhae in Southern Indian children, *Lancet*, 1172-1175.
110. Marshall A.R., Al-Jumaili I.J., Fenwick G.A., Bint A.J., Recort C.O. (1987) Cryptosporidiosis in patients at a large teaching hospital, *J. Clin. Microbiol.* **25**, 172-173.
111. Hojlygin N., Molback K., Jepsen S. (1986) *Cryptosporidium* sp. A frequent cause of diarrhae Liberian children, *J. Clin. Microbiol* **23**, 1109-1113.
112. Thomson, M.A., J.W.T. Benson, P.A. Wright (1987) Two year study of *Cryptosporidium* infection, *Arch. Dis. Child.* **62**, 559-563.
113. Navin T.R., Hardly A.M. (1987) Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *J. Infect Disease*, 155-160.
114. Sauda F.C., L.A. Zamarioli, W.E. Filho, L. De Barros Mello (1993) Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, Sao Paula, *Brazil J. Parasitol.* **79(3)**, 454-456.
115. Roberts W. G., P.H.R. Green, J. Ma, M. Carr. (1989) Prevalence of Cryptosporidiosis in patients undergoing endoscopy: evidence for an asymptomatic carrier state, *Am. J. Med.* **87**, 537-539.

116. Üner A., Daldal N., Özbel Y., Tappeh K.H. (1991) Çocuklarda *Cryptosporidium* aranması, *T. Parazitol. Derg.* **15(4)**, 42-48.
117. Fındık D., Karabayraktar A. (1994) Gaita örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması, *T. Parazitol. Derg.* **18(4)**, 415-419.
118. Ok Ü.Z., Korkmaz M., Ok G.S., Özkan A.T., Ünsal A., Özcel M.A. (1996) Kronik böbrek yetmezliğinde Cryptosporidiosis ve Blastocystosis, *T. Parazitol. Derg.* **20(1)**, 41-49.
119. Dillingham R.A., Lima A.A., Guerrant R.L. (2002) "Cryptosporidiosis: Epidemiology and impact", *Microbes and Infection* **4**, 1059-1066.
120. Mülazımoğlu L., H. Vahapoğlu, Ö.görgün, İ. Yıldırım, İ. Semerci, B. Taşer (1993) Beş yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* **23**, 113-115.