

T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KEMOTERAPİ ALAN MALİGN SOLİD TÜMÖRLÜ  
HASTALARDA CRYPTOSPORİDİUM SPP.'NİN  
MİKROSKOBİK VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ  
MEHMET KARABEY

TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğr. Üyesi AYŞEGÜL AKSOY GÖKMEN

İZMİR  
KASIM-2019



**T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KEMOTERAPİ ALAN MALİGN SOLİD TÜMÖRLÜ  
HASTALARDA CRYPTOSPORİDİUM SPP.'NİN  
MİKROSKOBİK VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
MEHMET KARABEY**

**TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğr. Üyesi AYŞEGÜL AKSOY GÖKMEN**

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2018-TDU-TIPF-0055 proje numarası ile desteklenmiştir.

**İZMİR  
KASIM-2019**

**T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KEMOTERAPİ ALAN MALİGN SOLİD TÜMÖRLÜ  
HASTALARDA CRYPTOSPORİDİUM SPP.'NİN  
MİKROSKOBİK VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**TEZİ HAZIRLAYAN  
MEHMET KARABEY**

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma tarafımızca incelenerek her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi AYŞEGÜL AKSOY GÖKMEN  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof.Dr. Selçuk KAYA  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Metin KORKMAZ  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Barış Önder PAMUK  
Tıp Fakültesi Dekanı

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde değerli deneyimlerini, bilgilerini ve emeğini esirgemeyen, kendileriyle çalışmaktan kıvanç duyduğum başta değerli hocam Prof. Dr. Selçuk KAYA olmak üzere saygıdeğer hocalarıma;

Tez olarak sunduğum bu çalışmanın belirlenmesi, planlanması ve gerçekleşmesi aşamasında her zaman danışabildiğim, desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül AKSOY GÖKMEN'e;

Tez çalışmalarının yürütülmesinde desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli mesai arkadaşlarıma ;

Hayatımın her safhasında sonsuz fedakarlıklar göstererek beni büyüten ve bu günlere getiren canım anneme, her zaman sevgi ve destekleriyle yanımda olan ablalarıma ve kardeşime, hayatımda olmasından sonsuz mutluluk duyduğum ve her konuda desteğini ve emeğini esirgemeyen sevgili kız arkadaşım Dr. Candegir AVŞAR'a yürekten teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2. 1. Tarihçe.....	4
2. 2. Taksonomi.....	5
2. 3. Morfolojisi ve Evrimi.....	8
2. 3. 1. Ekskistasyon Dönemi.....	11
2. 3. 2. Merogoni Dönemi.....	11
2. 3. 3. Gametogoni Dönemi.....	12
2. 3. 4. Fertilizasyon Dönemi.....	12
2. 3. 5. Ookist Dönemi.....	12
2. 3. 6. Sporogoni Dönemi.....	13
2. 4. Epidemiyolojisi.....	14
2. 5. Patogenezi.....	17
2. 6. İmmunolojik ve Antijenik Yapısı.....	18
2. 7. Klinik .....	19
2. 8. Laboratuvar Tanı.....	20
2. 8. 1. Direk mikroskopi yöntemi .....	20
2. 8. 2. Serolojik Yöntemler.....	22
2. 8. 3. Moleküler Yöntemler.....	23
2. 8. 4. Histopatolojik Yöntemler.....	24
2. 8. 5. Kültür yöntemleri .....	24
2. 9. Tedavi.....	25
2. 10. Korunma.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri.....	28
3.2. Araştırmada Kullanılan Örnekler.....	28
3.3. Dışkı Örneklerinin Saklanması.....	28

3.4. Direkt mikroskopik inceleme.....	28
3. 5. Formol- Etil Asetat Çöktürme Yöntemi .....	29
3. 6. Kinyoun Asit-Fast Boyama Yöntemi.....	30
3. 7. ELISA Yöntemi .....	31
3. 7. 1. Yıkama Solüsyonu ve Örneklerin Hazırlanması.....	32
3. 7. 2. Testin Çalışılması.....	32
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ.....	42
7. ÖZET.....	43
8. ABSTRACT.....	45
9. KAYNAKLAR.....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>gr</b>	Gram
<b>kg</b>	Kilogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>mg</b>	Miligram
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milimetre Küp
<b>nm</b>	Nanometre
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Defeciency Syndrome
<b>AML</b>	Akut Myeloid Lösemi
<b>AO</b>	Acridine Orange
<b>AR</b>	Auramin-Rhodamine
<b>DFA</b>	Direkt Floresan Antikor
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent assay
<b>FITC</b>	Flourescein Isothiocyanate
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>IFA</b>	İmmun Floresan Antikor
<b>IFAT</b>	İndirekt Floresan Antikor Tekniği
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	İnterferon Gama



<b>Ig A, Ig G</b>	İmmunglobulin A, İmmunglobulin G
<b>Ig M, IgE</b>	İmmunglobulin M, İmmunglobulin E
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
<b>RABD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>HSP70</b>	Heatschock protein 70kDa
<b>ssrRNA</b>	SmallSubunit Ribosomal RNA
<b>IMS</b>	Immunomagnetik separasyon
<b>MAF</b>	Modifiye ait-fast

**ŞEKİLLER DİZİNİ****Sayfa**

<b>Şekil 1.</b> <i>Cryptosporidium spp.</i> 'nin yaşam döngüsü.....	9
<b>Şekil 2.</b> <i>Cryptosporidium</i> un yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri.....	10
<b>Şekil 3.</b> <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin bulaşıma kaynakları .....	15



<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 1.</b> Cryptosporidium spp. sınıflandırılması .....	6
<b>Tablo 2.</b> Tanımlanan Cryptosporidium türleri .....	7
<b>Tablo 3.</b> Dışkı örneklerinde mikroskopik bakı sonucunda tespit edilen diğer parazitler.....	34
<b>Tablo 4.</b> Kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile ELISA yönteminin karşılaştırılması.....	34
<b>Tablo 5.</b> ELISA yöntemi baz alınarak Kinyoun asit-fast boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmesi.....	35
<b>Tablo 6.</b> Kinyoun asit -fast boyama yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmesi.....	35
<b>Tablo 7.</b> Cryptosporidium spp. pozitif saptanan hastaların özellikleri.....	36

**RESİMLER DİZİNİ****Sayfa**

<b>Resim 1.</b> Cryptosporidium spp'nin Ookisti (100X, Modifiye Asit-Fast Boyama)...	13
<b>Resim 2.</b> Dışkı örneğini Formol- Etil Asetat ile çötürme.....	29
<b>Resim 3.</b> Formol- Etil Asetat ile çötürme sonrası lam üzerine yayılan örnek .....	30
<b>Resim 4.</b> Kinyoun Asit-Fast Boyama yönteminden elde edilen görüntü.....	31
<b>Resim 5.</b> ELISA kiti.....	31
<b>Resim 6.</b> ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü.....	33



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cryptosporidiosis etkeni *Cryptosporidium* tıbbi ve veteriner öneme sahip protozoon bir parazit olup insanında dahil olduğu çok sayıda omurgalıda gastrointestinal şikayetlere neden olmaktadır. Yirmi tür ve atmıştan fazla genotipe sahip olduğu belirtilmiş genus içerisinde *Cryptosporidium muris* (*C. muris*) ilk olarak 1910 yılında Tyzzer tarafından farelerde tanımlanmış ve iki yıl sonrada *C. parvum* tarif edilmiştir. Ancak, 1970 yılına kadar insanlarda gastrointestinal hastalıklarla ilişkisinin olduğu saptanamamıştır (1, 2). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise cryptosporidiosisin, sağlıklı bireylerde genellikle kendiliğinden geçebilen gastrointestinal semptomlara, immun sistemi baskılanmış hastalarda da yaşamı tehdit eden şiddetli diyareler yanında solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olabildiği görülmüştür (3).

Genus *Cryptosporidium*; *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Sarcocystis*, *Cyclospora* ve *Babesia* gibi insan için önemli parazit protozoonların bulunduğu bir filum olan Apicomplexa (Sporozoa)'nın bir üyesidir. Bu filuma ait diğer üyeler gibi *Cryptosporidium*'da seksüel ve aseksüel evreleri içeren kompleks bir yaşam döngüsüne sahiptir ve bulaşıcı evreleri filum isminin türevlendiği karakteristik apikal komplekse sahiptir (2).

*Cryptosporidium* türlerinin memelileri, kuşları, sürüngenleri, kurbağaları ve balıkları enfekte ettiği gösterilmiştir (4). İnsanları en fazla enfekte eden iki tür *C. hominis* ve *C. parvum*'dur. Bu iki tür arasında *C. hominis* yalnızca insanlarda görülürken *C. parvum* insanlar yanında birçok hayvanda da saptanmıştır (2). Bu iki türe ek olarak *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis*, ve *C. canis* gibi türlerde insanlardan izole edilmiştir (5).

İnsanlarda, cryptosporidiosis jejunum ve ileum bölgelerinin enfeksiyonu ile seyretmekte olup bu durum iki hafta süresince devam eden sulu ishallere neden olmaktadır (6). Kendiliğinden iyileşmenin kural olduğu ve etkili spesifik bir terapötik ajanın bulunmadığı belirtilmiştir (7). Bunun yanında bir yaş üstü çocuklarda ve immün sistemi baskılanmış olanlarda cryptosporidiosis tedavisinde nitazoxanide önerilmektedir (5).

Enfeksiyon, insandan insana, hayvandan insana, yiyecek ve suyoluyla ookistlerin alınmasıyla bulaşmaktadır. *Cryptosporidium* ookistleri morfolojik olarak düzgün,

kalın duvarlı ve renksizdir bunun dışında sporüle olduğunda içerisinde çıplak dört sporozoit içeren yuvarlak veya oval bir görüntüsü vardır. Büyüklük olarak bakıldığında ise türler arasında değişkenlik görülmekle birlikte örnek olarak, *C. parvum*'un ookistleri 4.5 x 5.0 µm'dir (2).

Cryptosporidiosis son zamanlarda birçok ülkede su kaynaklı hastalıkların başında gösterilmekte ve bulaş yolu olarak içme suları ve yüzme havuzları sorumlu tutulmaktadır. İçme suyu ile *Cryptosporidium* arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması sonucunda İngiltere'de ve Amerika'da bilim insanları immün sistemi baskılanmış olanlara içme sularını kaynatıp içmelerini tavsiye etmeye başlamışlardır (7).

Diğer taraftan *Cryptosporidium*'un dünya çapındaki insidansı iyi bilinmemekle birlikte düşük gelirli ülkelerde beş yaş altı çocuklarda şiddetli ishallere neden olan majör etken olarak tanımlanmaktadır (8). Gastroenteritli hastalarda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da %1-%4, Afrika, Asya, Avusturalya, Güney ve Merkez Amerika ise %3-%20 arasında görüldüğü belirtilmiştir. HIV pozitif hastalarda *Cryptosporidium* prevalansına bakıldığında da Avrupa ve Amerika'da %3-%4, Brezilya'da %3.5-%22.4, Afrika'da ~%50 ve Asya'da %3.6- %4.3 arasındadır (5). Türkiye'de yapılan çalışmalara baktığımızda da çeşitli hasta grupları arasında *Cryptosporidium* spp sıklığı %0 ile yaklaşık olarak %35 arasında değişmektedir.

İnsanlarda *Cryptosporidium* spp. tanısı için halen altın standart olarak kabul edilen bir tanı yöntemi bulunmamaktadır. Bu sebeple rutin tanıda birden fazla yöntem kullanılarak en doğru sonuca ulaşılmaktadır. Cryptosporidiosis tanısı için rutin olarak dışkı, balgam ve safra örneklerinde; mikroskopik, dışkı kültürü, antijen saptama, flowsitometri ya da DNA saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Genelde özel boyalar ile yapılan boyama teknikleri içeren mikroskopi bakı ile tanımlama yöntemleri ve antijen arama yaygın olarak tek yada birlikte kullanılmakla, salgınların olduğu durumlarda enfeksiyon sebebinin saptanmasında ve tür ayrımının yapılmasında moleküler yöntemler devreye girmektedir (3).

Birçok çalışmadan elde edilmiş prevalans değerleri kullanılan tanı yöntemine, çalışmaya dahil edilen hasta sayısına, hasta grubuna ve coğrafik bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca Türkiye'de yapılan çalışmalardan elde edilen prevalans değerleri sonuçlarının da tek bir dışkı örneği incelemesi ile genellikle bir, daha az sıklıkla iki yöntemin kullanılmasıyla ortaya çıktığı görülmüştür. Bu durum

saptanan prevalans değerlerinin doğruluğunda sapmalara neden olmaktadır. Bu gerekçelerle tez çalışmamızda her bir ishaller hastadan tanı için alınan dışkı örneğinin *Cryptosporidium* spp varlığının iki tanı yönteminin (modifiye kinyoun asit-fast boyama ve ELISA) bir arada kullanılması araştırılmıştır. Bu sayede; ishaller hastalarda cryptosporidiosis sıklığı doğru bir şekilde ortaya çıkarılabilecek, her bir yöntem ile saptanan pozitiflik değerleri karşılaştırılarak kullanılan yöntemlerin birbirlerine göre üstünlükleri saptanacaktır. Sonuç olarak cryptosporidiosis tanısı için izlenilecek bir yol haritası önerilecektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

*Cryptosporidium* spp, insanları ve büyük bir omurgalı ailesinin solunum ve sindirim sistemindeki epitellerin mikrovillüslerine intraselüler ve ekstrastoplazmik yerleşim gösteren, zoonotik öneme sahip protozoonlardır (3). *Cryptosporidium* spp. ookistleri, 4-6 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) çapında koksidian bir protozoon olup zorunlu hücre içi parazittir. *Cryptosporidium* spp. , hem immünkompetan kişilerde hem de immüsupresif olan kişilerde enfeksiyon oluşturmaktadırlar. Sağlıklı bireylerde asemptomatik enfeksiyon veya kendiliğinden iyileşen ishallere neden olurken, immüsupresif kişilerde ağır seyirli ve kronik ishallere, safra, pankreas ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olabilmekte ve hastalık ölümlerde sonuçlana bilmektedir (7).

### 2.1. Tarihçe

*Cryptosporidium* spp. ilk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilerek “ fare midесinin epitelleri üzerindeki spor kümeleri” olaraktan Tyzzer tarafından 1907 yılında tanımlamıştır ve 1910 yılında ise *Cryptosporidium muris* olarak ism, cins ve de tür olarak tarif edilmiş ve evrimini açıklanmıştır. 1912 yılında ise *Cryptosporidium parvum* keşfedilmiştir. Öncedende bilinen coccidia parazitlerinin tersine ookistlerinin içinde bulunan sporozoitler ve bunları saran sporokistlerinde olmayışı sebebiyle *Cryptosporidium* 'lar (gizli sporokist) olarak adlandırılmıştır (3, 9). 1976 yılında *Cryptosporidium* ile ilgili ilk insan olgusu bildirilmiştir. İshal şikayeti olan 3 yaşındaki kız çocuğunda ve sonra da immüsupresyon oluşturan ilaçlar kullanmış bir çiftçide görülmüştür ve tespit edilen ilk olgu bir çiftlikteki hayvanlardan ortaya çıkan enfeksiyonla eş zamanlı olarak tespitte dilmiştir. Bu sebeple cryptosporidiosisin zoonotik bir hastalık olabileceğide düşünülmüştür. 1981 ve 1982 yıllarında'da AIDS'li hastalarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonları tespit edilmiş ve şiddetli gastroenterite sebep olduğu bildirilmiştir. Bu bireylerde ortaya çıkan uzun süren, zayıflama, sıklıklada bol sulu ishal, gibi belirtilerin olduğu enfeksiyonun fırsatçı bir patojen olarak değerlendirilmesi gerektiği de düşünülmüştür. Sonraki yıllardaki yapılan çalışmalarda ise turistlerde, hayvan bakıcılarında ve bağışıklık sistemi sağlam bireylerde bile salgınların sebebi olduğu bildirilmiştir (3, 10-12).



## 2.2. Taksonomi

*Cryptosporidium*, Apikomplexa şubesinin bir üyesi olan Cryptosporididae ailesine aittir. Son zamanlardaki filogenetik çalışmalar *Cryptosporidium*'un coccidiyandan ziyade gregarinlere daha yakın olduğunu göstermektedir. *Cryptosporidium*, Sporozoa sınıfı, Coccidia alt sınıfı, Eucoccidia takımı, Eimerina alt takımı, Cryptosporidiidae ailesi mensubu bir protozoondur (12). *Cryptosporidium*'un araştırmalar sonucunda belirlenmiş sınıflandırılması Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir (13).

Farklı konaklardan izole edilen *Cryptosporidium* türlerinin sporozoit antijenleri ve ookist duvarı karşılaştırılarak incelenmiş ve türler arasında tespit edilen farklılıklar gösterilmiştir (13).

*Cryptosporidium* türleri; morfolojileri, konak özgüllükleri, konakta yerleşim yerleri ve son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler ile belirlenen moleküler özelliklerine göre isimlendirilmiştir. Bugüne kadar bu cinse ait farklı omurgalı konaklarda parazitlenen 16 ayrı tür tanımlanmıştır (14).

*Cryptosporidium* türlerinin aralarında bulunan ilişkinin ortaya çıkarılması ancak moleküler biyoloji alanında ortaya çıkan yenilikler ve bu alandaki uygulamalar polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), western-blot, random amplified polymorphic DNA (RABD) gibi tetkikler ile mümkün olmuştur. Heatschock protein 70kDa (HSP70), small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) ve aktini kodlayan genlerin bütün elde edilen *Cryptosporidium* türlerindeki varlığı tespit edilmiş olup ilgili genlerdeki genomda 400-500 baz çiftindeki bir bölgede yerleştikleri anlaşılmıştır(15). Memelileri enfekte eden *C. parvum* türünün ookistlerinde bulunan sporozoitlerin çeşitli nükleik asit ve enzimlerini (18 ssrRNA ve HSP70 gibi)kodlayan genlerin moleküler analizlerine göre konakta adapte olmuş yedi farklı genotipinin bulunduğu bildirilmiştir(16).

**Tablo 1.** *Cryptosporidium* spp. sınıflandırılması (13).

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik özellikleri
<b>Alem</b>	Animalia	
<b>Şube</b>	Protista	Tek hücreli canlı, ökaryotik
<b>Alt Şube</b>	Apicomplexa	Veziküler bir çekirdeğe sahip olup tüm türleri parazittir.
<b>Sınıf</b>	Sporozoa	Seksüel ve aseksüel üreme, Ookist oluşturma, hücreye giren parazitin kayma kontraksiyon şeklinde hareketi gibi özellikleri vardır.
<b>Alt sınıf</b>	Coccidia	Biyolojik yolları merogoni, gametogoni ve sporogoni olarak şekillenir. Hücre içinde Seksüel faz gerçekleşir.
<b>Takım</b>	Eucoccidia	Merogoni evresi vertebralı konakta olur.
<b>Alt takım</b>	Eimeriina	Makro ve mikro gamet oluşumu farklıdır. Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet gelişir. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet gelişir. Zigot hareketsiz olup konoid mevcuttur.
<b>Aile</b>	Cryptosporidiidae	Konak süreci hücrenin yüzey membranında monoksen gelişimi söz konusudur. Ookistler sporokistleri içermezler, çıplak dört sporozoit içerir. Mikrogametlerde flejella bulunmaz.
<b>Cins</b>	<i>Cryptosporidium</i>	

Moleküler çalışmaların son zamanlarda hız kazanması, *Cryptosporidium* spp. taksonomisi ve türlerin ayırımında yararlı olmuştur(10, 17).Özellikle PZR-RFLP ve sekans analizi gibi yöntemlerle tür ayırımı yapılabilmektedir(18, 19). Spesifik gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması ile parazitin bulaş yolu ve biyolojik özellikleri hakkında daha fazla bilgi edinilmiştir (20, 21). Bu moleküler yöntemlerden elde edilen veriler kullanılarak *Cryptosporidium* türleri yeniden değerlendirilmiş ve şu an için 26 farklı türün olduğu anlaşılmıştır(22). Bu türlerden altısı insan cryptosporidiosis olgularının en yaygın etkenleridir. Bu türler sırasıyla; *C. hominis*, *C. parvum* bunları *C. meleagridis* izler, bazen de *C. cuniculus*, *C. felis* ve *C. canis* görülür.

**Tablo 2.** Tanımlanan *Cryptosporidium* türleri(9).

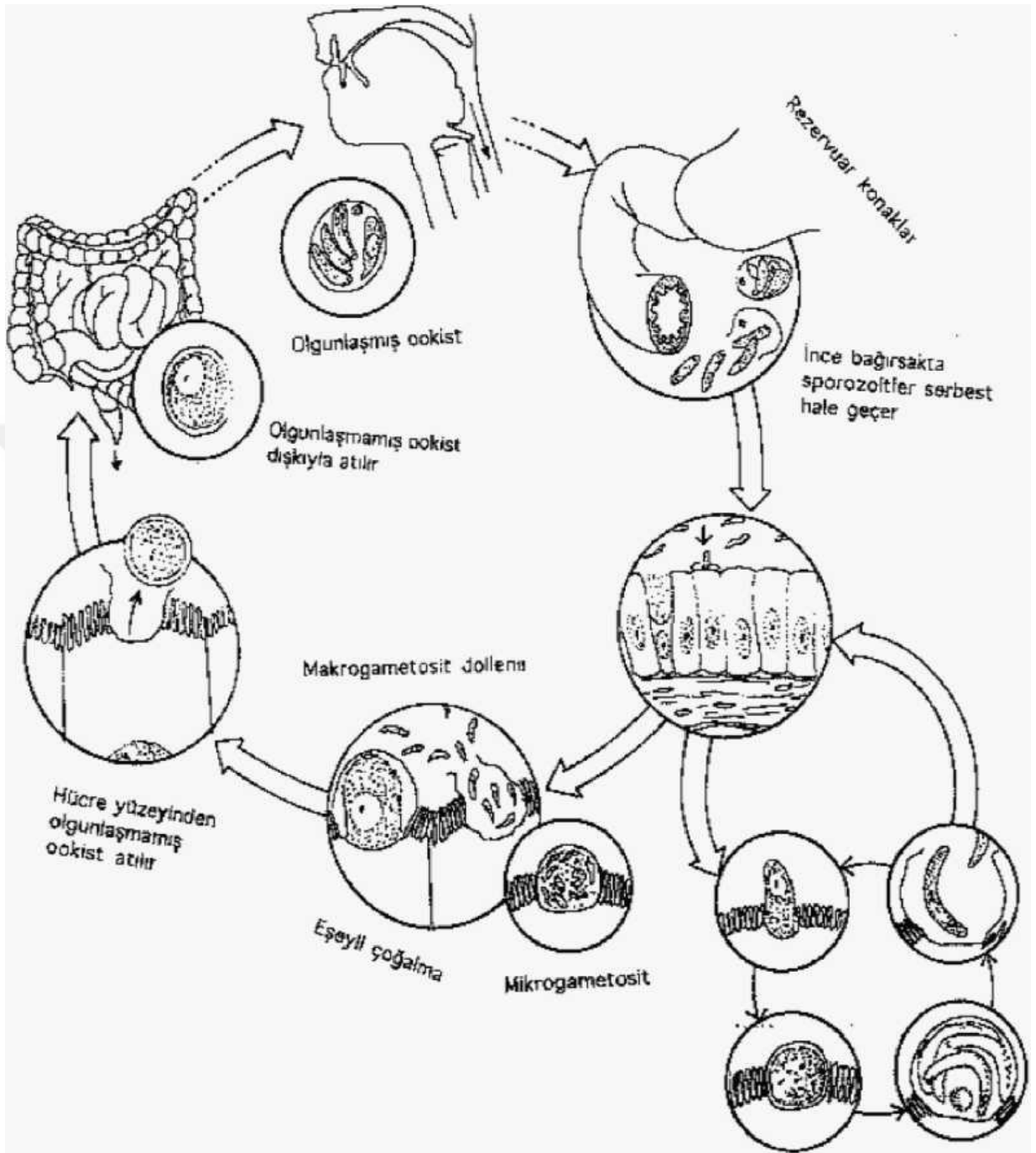
<i>Cryptosporidium</i> türleri	Konak	Yerleşim yeri
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Öküz, İnek	Mide
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Hindi	Kloak, bursa
<i>Cryptosporidium canis</i>	Köpek, İnsan	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium felis</i>	Kedi, İnsan	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium galli</i>	Kuşlar	Proventrikülüs
<i>Cryptosporidium hominis</i>	İnsan	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Kanatlılar, İnsan	Bağırsak
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Balık	Mide
<i>Cryptosporidium muris</i>	Kemirgenler, İnsan	Mide
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Geviş getirenler, İnsan	Bağırsak
<i>Cryptosporidium saurophilum</i>	Kertenkele, Yılan	İntestinal ve kloak mukoza
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Yılan, Kertenkele	Mide
<i>Cryptosporidium suis</i>	Domuz, İnsan	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Kobaylar	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Geviş getirenler	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Balık	Bağırsak

### 2.3. Morfoloji ve Evrimi

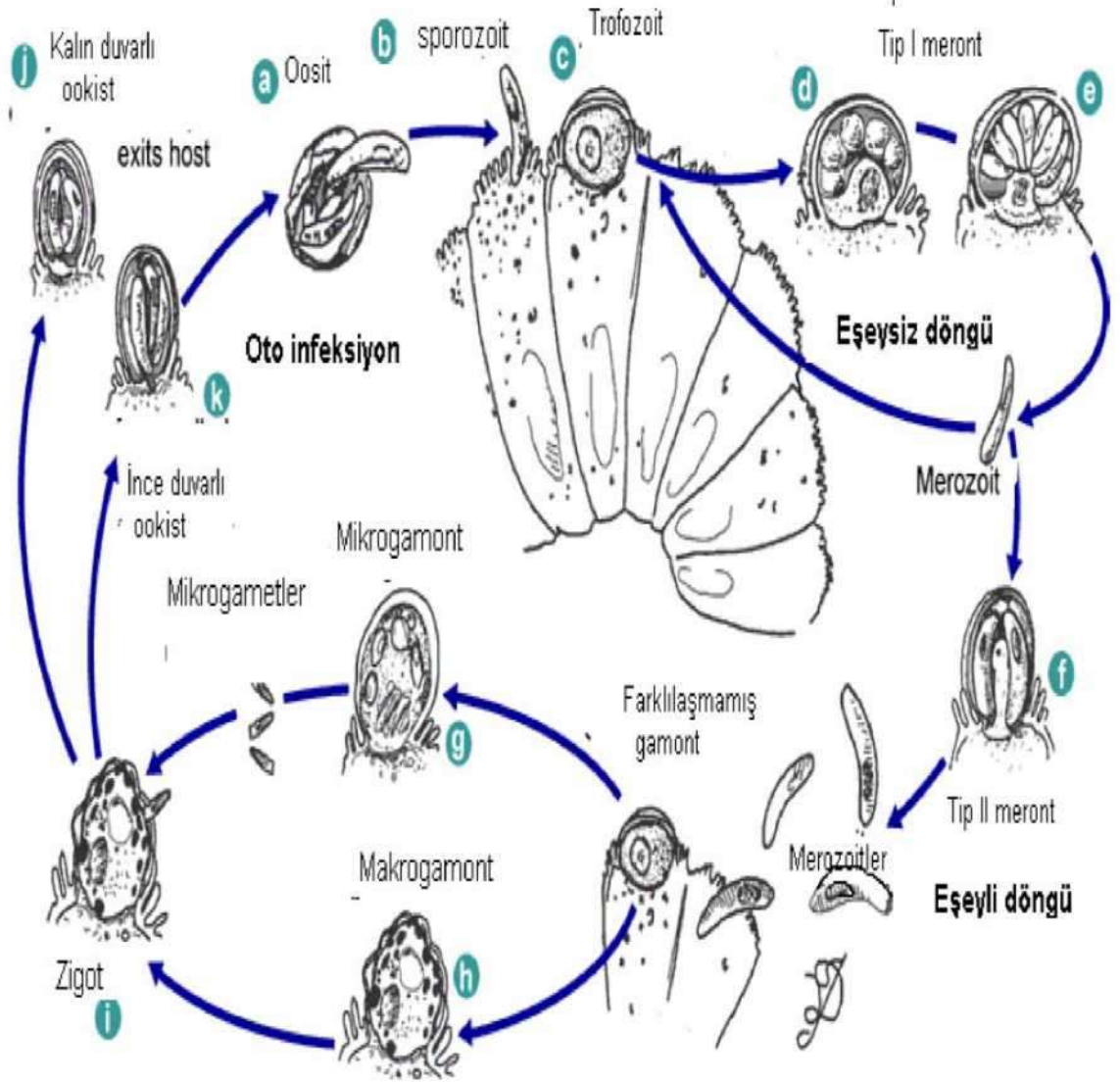
*Cryptosporidium* spp'nin gelişimi midede ve bağırsakta epitelyum hücreleri fırça kenarları içinde olur. Hücredeki gelişim yerinden dolayı hücre içi yerleşim gösteren başka parazitler den ayrılırlar. Diğer parazitler hücrelerin sitoplazmasında yerleşerek *Cryptosporidium* türleri hücrelerin ekstrastoplazmik alanına yerleşerek sırasıyla eşeyli ve eşeysiz ürerler. Yaşam siklusunu tek bir konakta tamamlar(23, 24). *Cryptosporidium* spp. ookistleri 4-6 µm çapında, kalın bir duvarla çevrilmiş, sferik ve içerisinde dört sporozoit bulunan yapılardır ve sporokistleri bulunmamaktadır. Sporozoitler rhoptri, mikronem ve yoğun granüller içeren, konak hücreye invazyonu sağlayan apikal kompleks adı verilen bir organelle sahiptir. Hareketli sporozoitler ince bağırsak epitelyum hücrelerinin yüzey reseptörlerine parazitlerin bazı bağları (gp900, CP47, Cpg40/15 gibi) ile bağlanırlar. Bağlanma sonrası parazitler aktin polimerizasyonuna neden olur ve ince bağırsak epitel hücre membranında bir çıkıntı oluşur. Bu membran sporozoiti sarar ve epitel hücresinin mikrovillus tabakasında parazitofor vakuölü meydana getirir (25, 26).

Yaşam döngüsü memelilerde enfeksiyona neden olan *Eimeria* ve *Isospora* gibi diğer koksidian parazitlerin yaşam döngülerine benzerlik göstermektedir. *Cryptosporidium* türleri, aseksüel (şizogoni, merogoni) ve seksüel (gametogoni, sporogoni) döllenme şekillerinin değişimi ile karakterize yaşam döngüsünü tek bir konakta (monoksen) tamamlar. Yaşam döngüsü memelilerde enfeksiyona neden olan *Eimeria* ve *Isospora* gibi diğer koksidian parazitlerin yaşam döngülerine benzerlikler göstermektedir. Buna göre başlıca altı gelişim evresi bulunmaktadır: Ekskistasyon, merogoni, gametogoni, döllenme, ookist ve sporogoni dönemi (24, 27).

Şekil 1. *Cryptosporidium* spp.'nin yaşam döngüsü(24).



Şekil 2. *Cryptosporidium*ün yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri(28).



### 2.3.1. Ekskistasyon Dönemi

*Cryptosporidium* spp.'nin dışkı ile atılan şekli, enfektivite kazanmış ve sporlanmış ookist formlarıdır. Ookistlerin enfekte olmuş konaktan atılması, sindirim yoluyla konak hücreye alınması ve normal şartlar altında ince bağırsakta açılması ‘‘ ekskistasyon’’ evresi olarak adlandırılır (23). Dışkıyla atılan ookistler, kalın duvarlı, 2-6 µm çapında olup, ookistlerin içinde dört sporozoit, zara bağlı kürecikler ve bir çok küçük tanecikler içerirler. *Cryptosporidium* ookistleri yiyecekler, içecekler veya bazı farklı çevresel etkenler ile ağız yoluyla, konjunktiva ile veya inhalasyon ile alınabilmektedir (29).

Kistin açılmasında rol oynayan faktörler arasında çeşitli proteolitik enzimler, pankreatik enzimler, vücut ısısı, safra tuzları, ve sindirim sisteminde bulunan değişik indirgeyici etkenler sayılabilir. Oral yolla alınan ookistlerin uygun konaklardaki sindirim yolunda açılırlar ve sporozoitler ookistlerden dışarıya salınırlar (23, 30).

### 2.3.2. Merogoni Dönemi

Konak hücre yüzeyine tutunan sporozoit ilk önce apikal kompleksi aracılığı ile özellikle de mikronem kaynaklı olarak membran eritici faktörü salgılar. Böylece konak mikrovillusların ve membranı ile kendisini sararak koruma alanı oluşturan vakuolü oluşturur. Etkene intraselüler fakat ekstrasitoplazmik bir konum kazandıran bu yapı ‘‘parazitik vakuol’’olarak adlandırılır (29, 31). Vakuol içerisinde yuvarlaklaşp trofozoit halini alan protozoon eşeysiz olarak (merogoni=şizogoni) çoğalarak tip I merontları oluşturmaktadır. Şizogoni sırasında trofozoitin çekirdeği ard arda iki veya üç kez bölünerek 6-8 çekirdekli şizontu oluşturur. Takip eden dönemde her bir çekirdek, şizont duvarında farklı kısımlardan dışa doğru evagine olur. Böylece kendi plazmasına kavuşur ki sonuçta merozoitler şekillenmiş olur (32). Şekillenen merozoitler konak hücreyi parçalayarak barsak lümenine dökülürler ve civardaki tahrip olmamış sağlam hücrelere tutunurlar (31). Merozoitler burada yeni bir şizogoni aşamasına girerek ya tip I ya da tip II şizontları oluştururlar. Her iki şizontun da oluşumu aynı tarzda gerçekleşir. Ancak, tip I şizonttan altı ila sekiz merozoit şekillenirken tip II şizonttan sadece dört merozoit oluşur. Bu noktadan itibaren, Tip I şizontlardan oluşan merozoitler konaktaki yeni hücreleri enfekte eder ve tekrar bir merogoni başlatırlar. *Cryptosporidiosis*te, özellikle de immünsüpresif hastalarda, Tip I

şizont oluşumunun sürekli tekrarı söz konusu olabilmektedir ki persistensliğin temelinde yatan ana etkenin de bu olduğu bildirilmektedir (29).

### 2.3.3. Gametogoni Dönemi

Şizogoni döneminde tip-II Merontların içerisinde bulunan dört merozoit, hücrenin parçalanmasıyla serbest kalarak yeni konak hücrelerine yerleşerek eşeyli üreme fazı olan gametogoniye başlatılmaktadırlar. Gametogoni ile birlikte bu merozoitler, mikro veya makro gametositlere, daha sonra da mikro ve makrogametlere dönüşmektedirler (9). Her bir mikrogamonttan kamçısı bulunmayan onaltı mikrogamet ve her bir makrogamonttan da sadece bir makrogamet meydana gelmektedir (33).

### 2.3.4. Fertilizasyon Dönemi

Yaşam döngüsündeki dördüncü evrede, bağırsak lümeninde serbest halde bulunan ve ince yapı, kamçısız ve 0.4-0.5 µm büyüklüğünde mikrogametlerden birisinin, 4-6 µm büyüklüğündeki makrogameti döllemesi ile zigot oluşmaktadır (34).

### 2.3.5. Ookist Dönemi

Bu dönemde zigot ookist duvarıyla çevrilir , bu duvar iki veya üç farklı tabakanın birleşmesiyle oluşur (35). *Cryptosporidium*'un ookist duvarı kimyasal ve mekanik etkilere karşı dirençlidir. Ookistin elektron mikroskobu ile fark edilebilen en büyük özelliklerden biri, ookistin duvarında bulunan ve ookistlerin yarısı veya üçte birlik kısmını çevreleyen ince bant şeklindeki bir yapının varlığıdır. ince bağırsaklarda sporozoitler bu yapıdan dışarı çıkar. Ookistin içerisinde sporokistler bulunmaz, sadece dört sporozoit bulunur (23, 36). Duvarın dış tabakası asidik özellikli glikoproteinlerin filamentleriyle kaplıdır. Orta kısımdaki ise mikobakteriyel lipidleri ve balmumuna benzer sert kompleks lipidler içeren tabaka mevcuttur. İçteki tabakada ise glikoproteinlerden oluşmuştur. Hücre duvarıda yüksek oranlarda lipid içermesi, karbol fuksinle boyandıktan sonra asit alkol dekolorizasyonundan etkilenmeme özelliği kazandırır (23).



**Resim 1.** *Cryptosporidium* spp'nin Ookisti (100X, modifiye asit-fast boyama)



### 2.3.6. Sporogoni Dönemi

Ookistlerin içindeki sporlanmayla dört enfektif sporozoit ( $4.9 \times 1.2 \mu\text{m}$  boyutlarında, çekirdeklerinin üçte birlik arka bölümündedir ve hücrenin çeperi ise 50 nm kalınlığa sahip, renksiz ve düzgündür) meydana gelir (9, 37). *Cryptosporidium* spp'nin eşeyli üremesi ile elde edilen iki farklı ookist oluşumu gözlenir. Oluşan ookistlerin yaklaşık%20'si ince duvarlı, %80'i kalın duvarlı bir yapı gösterir. Çeperleri ince ookistlerin içerisinde dört adet sporozoit bulunur. Bu ookistlerin konağın bağırsak boşluğuna atılmaları ile bağırsağın içerisinde açılırlar. Bağırsakta serbest hale gelen sporozoidler ise yeni epitel hücrelerinin içine yerleşirler ve konakta meydana gelmiş olan enfeksiyonun devam etmesinden sorumludurlar (32). Kalın çeperli 2. tip ookist yapıları ise sporlanırlar sonrasında konağın dışkılamasıyla dışarı atılmış olurlar ve böylece konaktan konağa bulaşma meydana gelir. Bu ookistler hem dış oto enfeksiyon ile hem kişiler arası direkt temas ile hem de yiyecek ve içeceklerle oral yoldan alınırlar ve bu şekilde parazit insanlar arasında bulaşma gösterir. Sonuç olarak bulaş fekal-oral yol ile ara konağa gerek kalmadan gerçekleşmektedir. Bu ookistler iklim ve çevre şartlarına uzun süre dayanabilirler (38, 39).

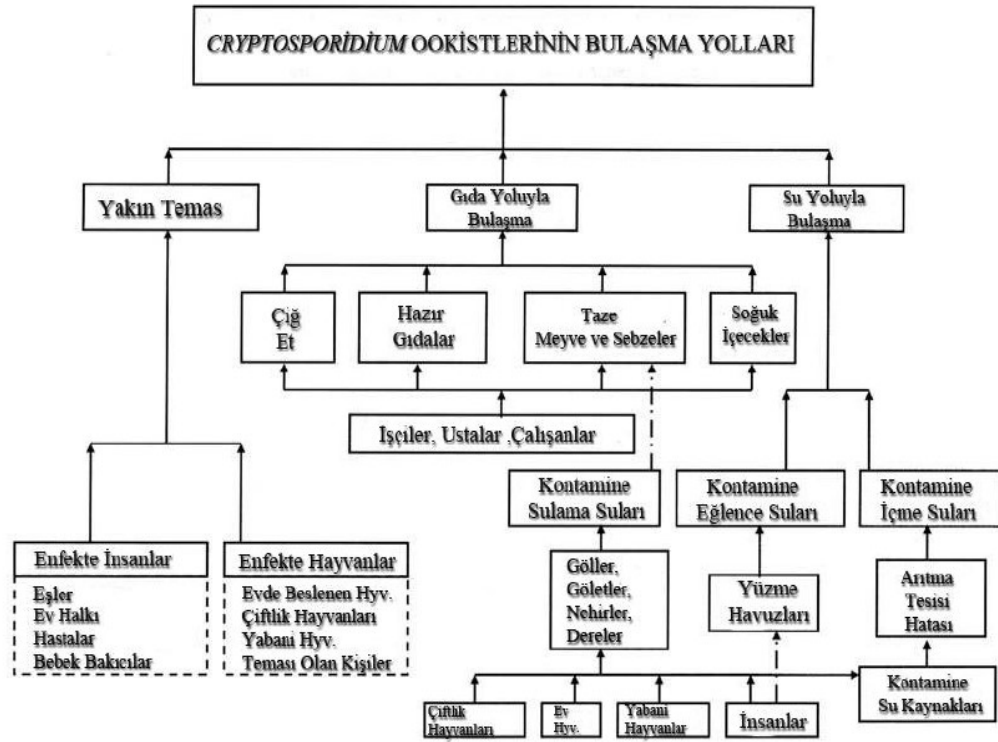
## 2.4. Epidemiyolojisi

Cryptosporidiosis zoonotik bir enfeksiyon olarak , dünya genelinde bir dağılım gösterir. İnsana bulaşmasında besi hayvanların ve evcil hayvanlarının, özellikle de buzağı dışkısının rolü büyüktür. Enfekte insan ve hayvanların dışkıları ile atılan, dirençli ookistler ile *Cryptosporidium spp.* bulası gerçekleşir (40, 41). İnsandan insana bulaş da olmaktadır. İnsanla arasındaki kontaminasyon fekal-oral veya anal-oral olabilmektedir. Özellikle hastanelerde ve çocuk bakım evlerinde ortaya çıkmış olan salgınlar insandan insana bulaşın önemini gösteren önemli olaylardandır. Günümüzde Cryptosporiosis bir turist hastalığı etkeni olarak da bilinmektedir (42, 43).

*Cryptosporidium* ookistlerinin sıcakta ve özellikle nemli hava ile beraber dogada yoğunluğunun artışı ile birlikte, *Cryptosporidium* enfeksiyonları da artış göstermektedir. Ookistlerin yağışlar ile ve iklim değişikliği durumunda, karada ve suda bulunması ya da inaktive olmasındaki sürecin ilerleyeceği düşünülmektedir. Birçok bilim adamlarınca Cryptosporidiosisin ıslak ve ılık mevsimlerde görülen bir hastalık olduğunu belirtmişlerdir. Mevsimlere göre yağışın bol olması, cryptosporidiosisin içme sularında ve diğer gıdalarda bulaş riski artırmaktadır. Ülkemizde ise insanlardaki Cryptosporidiosis sıklığının baharda artarak, Eylül ve Ekimde en yüksek görülme sıklığına ulaştığı bildirilmiştir (44-46).

Yiyecekler de , içeceklerde ve çevresel etmenlerde protozon olarak adlandırılan parazit grubundan olan *Cryptosporidium spp.*'nin inaktivasyonun da çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Filtrasyon ,ısıtma, sogutma, ısınlama, çöktürme, UV ısıgı, ses dalgaları ve yüksek basınçı içeren bu fizik kuvvetlerinin parazitlerin yer değiştirmesini veya hayatta kalmaları üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (47). Bulaşma sebebi olan ookistlerin günümüzdeki dezenfektanlara, sıcak, nem ve soğuga direnç gösterirler. Birçok araştırma bu ookistlerin %50 derişik amonyak veya %10'luk formol gibi kimyasal çözeltilerde 30 dakikada, ayrıca 60 °C'da ve üzeri sıcaklıklar da yada -20 °C sıcaklık ve 30 dakikada inaktive oldukları belirtilmiştir (9).

Şekil 3. *Cryptosporidium* ookistlerinin bulaşıma kaynakları(27, 48).



Araştırma ve yöntemlerdeki farklılıklar nedeni ile sonuçların karşılaştırılması zor olsa da diyarelilerde, az gelişmiş ülkelerde, özellikle 2 yaşın altındaki çocuklarda, beslenme bozukluğu olanlarda, evcil hayvan besleyenlerde, sıcak ve nemli mevsimlerde enfeksiyonun daha sık olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyona yakalanma riskinin bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde CD4 sayısı ile doğru orantılı olduğu, enfeksiyon riskini çeşitli sosyal ve davranışsal faktörlerin de arttırdığı bildirilmiştir. Avrupa’da yapılan çok merkezli bir araştırmada, cryptosporidiosisin homoseksüellerde ilaç bağımlılarına göre daha sık görülmesi; ABD’deki benzer bir çalışmada ise, enfeksiyona HIV enfeksiyonunu cinsel yolla alanlarda diğer yollarla alanlara göre daha fazla rastlanması seksüel davranış ile cryptosporidiosisin yakın ilişki içinde olduğunu düşündürmüştür. Diğer bir çalışmada ise köpek sahibi olmanın HIV olgularında enfeksiyon riskini arttırdığı gözlenmiştir (9).

ABD’de 400. 000 kişi bir kaynak suyundan enfekte olmuştur. Su kaynaklı meydana gelen epidemiy sebepleri arasında; parazitin içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, klorlamaya direnç

göstermeleri ve Parazitin çok az sayıda olması bile enfeksiyon sebebi olabildiği gösterilmiştir. Bu sebeple günümüzde hala su arıtmada teknik yetersizlikler ve cryptosporidiosisli olguların içme suyundan ve yüzme havuzu sularından salgınların geliştiği bildirilmiştir (41, 49).

*Cryptosporidium* enfeksiyonları, altı üzerinde atmıştan çok ülkede teşhis edilmiştir. Yapılan çalışmalarda az gelişmiş ülkelerdeki prevalansın daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Kuzey Amerika ve Avrupa gibi ülkelerde oran %1-3 iken, daha az gelişmiş Asya'da %5, Afrika'da ise %10 olarak bildirilmiştir(49). Ayrıca son yıllarda organ nakli alıcılarında *C. parvum*'un hastalık nedeni olduğu bildirilmiş olup, bunun çevresel şartlardan kazanılabileceği düşünülmüştür (50). *Cryptosporidium* enfeksiyonları için risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir: İçme suyunun yeterince arıtılmış ve hijyenik olmaması, yeterli olmayan kanalizasyon sistemleri gibi kötü hijyenik koşullar, veteriner hekimlik, hayvancılıkla uğraşma ve laboratuvar faaliyetleri gibi mesleki faktörler, immun sistem yetmezliği, epidemik bölgelere yolculuk, infekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama, yetersiz beslenme, 0-4 yaş arası veya atmış yaş üstü olmak bu hastalık için risk faktörlerini oluşturur (49, 51, 52).

AIDS'li hastalarda parazitin prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda; ABD'de AIDS'li 9182 hastanın %3.6' sında cryptosporidiosis tanısı almış, 174 AIDS'li çocuğun ise %5.1'i cryptosporidiosisli olarak tespit edilmiştir (53). Küba'da yapılmış bir çalışmada dışkı örnekleri incelenmiş ve AIDS'li 67 hastanın %11.9'unda, Zambia'da dışkıları incelenmiş olan 63 AIDS'li hastanın %32'sinde, Zaire'de ise 106 kronik ishallerli AIDS hastasının %21'inde, Brezilya'da AIDS'li 131 hastanında %19.1'inde ve Venezüella'da AIDS'li 29 hastanında %41.3'ünde cryptosporidiosis saptanmıştır (9, 51).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda değişik oranlar tespit edilmiştir. Adana'da diyaresi olan çocuklarda %8.20, sağlıklı çocuklarda ise %4.08 olarak bulunmuştur(11). Mersin'de 4 ilköğretim okulunda, 8-12 yaşlarındaki çocuklardan toplanmış 72 dışkı numunesinin 4'ünde (%5) cryptosporidiosis tanısı konmuştur. Elazığ'daki bir araştırmada ise, 0-5 yaş grubu immünsüpresif olmayan ishallerli 417 olgu ele alınmış ve 19'unda (%4) *Cryptosporidium* spp. oookistleri görülmüştür (11, 36, 54). Konya'da yapılmış olan bir çalışmada 250 bireyin dışkı örneklerinin %1.6'sı cryptosporidiosis tanısı almıştır (55), Sivas'da yapılmış olan bir çalışmada 110 bireyin

dışkı numunesinin %11.8'inde cryptosporidiosis tanısı almıştır (56). İzmir'de 600 0-6 yaş aralığındaki çocuk hasta ile yapılan çalışmada ise, çocukların %0.1'inde *Cryptosporidium* ookistleri görülmüştür (57). Ankara'da Onkoloji hastanesi'nde 106 neoplastik hastayla yapılan araştırmada %16.9'unda *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (58). İzmir'de Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hemodiyaliz Ünitesinde yapılmış bir araştırmada, 46 böbrek yetmezlik hastasında %30.4 oranında *Cryptosporidium* ookisti saptanmıştır (59). Eskişehir'de 0-6 yaş grubu diyareli 607 çocuğun dışkı örnekleri incelenmiş ve %3.6'sında pozitif bulunmuştur (45).

## 2. 5. Patogenezi

*Cryptosporidium* türleri, sindirim kanalındaki tüm dokulara yerleşebilmekte, fakat en ağır enfeksiyon, etkenin jejunum bölgesine yerleşmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır (35, 60). *Cryptosporidium* spp.'nin neden olduğu enfeksiyonda, patolojik bulgular ile ilgili yapılmış bir çok çalışma bulunmakla beraber parazitin hastalık oluşturma mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır (19). Etkenin bağırsak epitelinde fonksiyon değişikliğine neden olduğu ve aynı derecede bağırsağa ait aynı yapıyı ve sinir sistemini de etkilediği, fazla sayıdaki parazit invazyonunun mikrovillüslarda fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bilinmektedir (61). Cryptosporidiosis de diyarenin nedenleri arasında ince bağırsaklardaki enterositlerin ağır hasarı veya ölümü, villüs atrofi ve lamina propriadaki hücresel enflamasyon rol oynamaktadır. Enfekte epitel hücrelerinden sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL1, IL8) salgılanarak enflamatuar ve bağışık sistem hücreleri bu bölgede toplanmaktadır. Epitel hücrelerinden prostoglandinler (PGE2), enflamasyon hücrelerinden P maddesi gibi nöropeptidler salınır. Bunun sonucu olarak Na<sup>+</sup> emiliminde azalma, epitelial permeabilitesinde ve Cl<sup>-</sup> sekresyonunda artış nedeniyle ishal ortaya çıkmaktadır(34, 62). Prostoglandinler Na<sup>+</sup> azalmasına aracılık ederken Cl<sup>-</sup> sekresyonunu, TNF- $\alpha$  ise prostoglandinlerin üretimini uyarırlar (63). Bununla ilişkili olarak cryptosporidiosisli AIDS olgularında serum sitokin düzeyleri ile semptomlar arasında bir korelasyon bulunmazken, prostoglandin inhibitörlerinin cryptosporidiosis semptonlarını ortadan kaldırmada etkili olmadığı bildirilmiştir (64). Robinson ve ark.'ları *C. parvum* ile enfekte gönüllülerde diyarenin şiddeti ve durumu ile nöropeptid P maddesi arasındaki korelasyonu göstermiştir (9, 64).

*C. parvum*'un patolojik değişiklikler oluşturabilme yeteneği ile ilgili hücre kültüründe yapılan araştırmalarda, parazitin nükleer kondansasyona ve DNA fragmentasyonu ile karakterize apoptozise neden olduğu ortaya konmuş ve enfeksiyonun birinci gününde gözlenen bu apoptik değişikliklerin bir proteaz olan caspase aracılığı ile değiştiği tespit edilmiştir (61, 65).

## 2. 6. İmmunolojik ve Antijenik Yapısı

*Cryptosporidium* spp. sebep olduğu enfeksiyonlardan korunmada hem humoral, hem de hücresele immunitenin rol aldığı belinmektedir. *Cryptosporidium* ookistleri ile enfekte olmuş bireylerin serumlarında IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar bulunmaktadır. İmmünsüpresif olan hastalarda ise uzamış ve daha ağır enfeksiyonlar vardır.

Cryptosporidiosis enfeksiyonuna karşı gelişen ilk immün yanıt, T-lenfositlerin artması sonucu oluşan barsak inflamasyonudur. Ayrıca interlökin-8, interlökin-12 (IL-12), TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinler de artış da görölmektedir (66, 67). IFN- $\gamma$ 'nın barsaklardaki salınımı, ookistlerin dışarı atılmalarının kontrol edilmesinde yer almaktadır. IFN- $\gamma$  tedavisi ile barsak epitel hücreleri aktive edilerek ve enfeksiyonu kısmende olsa temizleyerek etki ettiği bildirilmektedir. Ayrıca IL-12 ise IFN- $\gamma$ 'yı barsak epitelinden salınımını uyararak çok önemli bir etken olduğu ve inaktive edildiğinde ise kronik enfeksiyona sebep olduğu bildirilmektedir (60, 68, 69).

CD4 T lenfositleri (Sitotoksik T hücreler) ve IFN- $\gamma$  cryptosporidiosisin iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır. Cryptosporidiosisin kontrolünde, CD4 sayısı önemlidir. Çünkü CD4 sayısı 180 hücre/mm<sup>3</sup>'den daha yüksek olduğunda AIDS hastalarında enfeksiyon kendi kendini sınırlarken, 100 hücre/mm<sup>3</sup>'ün altında olduğunda enfeksiyonun kronikleştiği, 50 hücre/mm<sup>3</sup>'ün altında ise fulminan enfeksiyon tablosunun geliştiği bildirilmektedir (66, 68-70).

*Cryptosporidium* enfeksiyonlarında oluşacak reenfeksiyondan korunmada spesifik antikorların başlıca rol oynadığı düşünölmektedir. *Cryptosporidium* ile enfekte olmuş insanlarda parazite karşı antikorlar üretilmektedir. Enfeksiyonda ilk önce IgM, ardından IgG antikor yanıtı oluşmakta, IgG seviyesi ise birkaç ay içinde azalıp daha sonra yıllarca pozitif kalabilmektedir. Ayrıca IgA ve IgE antikorlarında da artış olmaktadır (19, 60, 66).

## 2.7. Klinik

*Cryptosporidium* türlerinin insanlarda enfeksiyon oluşturabilmesi için gerekli ookist sayısının 10'dan az olduğu bildirilmiştir (71). Enfeksiyonun kuluçka süresi 2-21 gün arasında değişmektedir (72). İnsanlarda enfeksiyon şiddetini belirleyen en önemli faktör hastanın immunitesidir. İmmüsupresif ve immünkompetan bireylerde en önemli belirti ishaldir. Dışkının sulu görünümünde olduğu, mukuslu olabildiği fakat kan ve lokosit içermediği bildirilmektedir. Daha az sıklıkla görülen belirtiler ise bulantı, kusma, karın ağrısı, halsizlik, iştahsızlık ve baş ağrısıdır (37, 70, 73, 74).

İmmünkompetan kişilerde cryptosporidiosis genellikle iki hafta kadar sürmekte ve sonrasında ishal şikâyetinin kendiliğinden iyileştiği görülmektedir. ishalin yanında iştahsızlık, kilo kaybı, karın ağrısı, bulantı-kusma, halsizlik ve hafif derece ateş gözlenebilir (20, 60, 72, 75).

İmmüsupresif kişilerde enfeksiyon bir iki haftalık ishalden, kronikleşen ve hasta yaşamını tehdit eden koleraya benzer bir kliniğe kadar değişebilmektedir. Cryptosporidiosis; AIDS, kızamık gibi bazı viral hastalıklar, gamma globülinlerin düştüğü hastalıklar, kemik iliği hastalıkları, böbrek yetmezliği olan hastalar, karaciğer nakli olan hastalar, insüline bağımlı diyabet hastaları, lösemi ve diğer kanser tedavisi uygulanan kişilerde şiddetli semptomlar oluşturur. Bu tür hastalarda diyare iki aydan daha uzun sürebilmekte, enfeksiyonun devam ettiği sürece şiddetli dehidratasyon, dışkıyla ookistlerin atılması, malnütrisyon ve kilo kaybı görülmektedir (28, 37, 60). CD4 hücre sayısı >180 hücre/ml olduğu AIDS'li kişiler cryptosporidiosis'i kısmi hafif geçirirken, 100 hücre/mm<sup>3</sup>'ün altında enfeksiyonun kronikleştiği ve hastalığın inatçı bir durum aldığı bildirilmektedir (10, 72, 76). Bu tür hastalarda bağışıklığı baskılayan nedenlerin ortadan kaldırılması durumunda tedavide başarı sağlanabildiği bildirilmiştir (32). Hastalarda sıvı kaybı çok aşırı olup, günlük 3 ila 6 litreyi bulmaktadır, hatta bazı hastalarda ise günlük 17 litrelik bir sıvı kaybı olabilmektedir. *Cryptosporidium* genellikle barsaklara yerleşmesine rağmen, immüsupresif hastalarda barsak dışında (mide, pankreas, safra kanalları, böbrek, solunum sistemi) farklı organlarda da görülmektedir (21, 31, 77).

## 2.8. Laboratuvar Tanı

*Cryptosporidium* türlerinin tanısı dışkı, balgam ve safra örneklerinde çeşitli yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Cryptosporidiosis tanısı için ilk başlarda bağırsak biyopsinde *C. parvum*'un gelişmesi evreler halinde gösterilerek konulmuş ve parazitin intrasellüler ve ekstrasitoplazmik yerleşim gösterdiği ortaya çıkmıştır (24, 78).

*Cryptosporidium* ookistlerinin saptanmasında kullanılan başlıca yöntemler; direkt mikroskopi yöntemi, serolojik yöntemler, moleküler yöntemler, histopatolojik yöntemler ve kültür yöntemleridir.

### 2.8.1 Direk mikroskopi yöntemi

*Cryptosporidium* spp.'nin sebep olduğu enfeksiyonlarda, klinik olarak kullanım kolaylığı ve kesin sonuçların elde edilmesi göz önüne alındığında, dışkı ile dışarı atılan ookistin tespit edilmesi olduğu gösterilmektedir (79).

Enfekte konakların dışkılarında etkeni örnekte yoğunlaştırmak amacıyla geliştirilmiş yöntemler arasında; Sheather'in yüzdürme yöntemi, formol-etil asetat ve formol-etil sedimantasyon yöntemleri, Percoll-sukroz yöntemi, doymus sodyum klorür yüzdürme ve doymus çinko sülfat teknikleri, Diyaliz ile profikasyon, Demir III sülfat flotasyonu, Immunomagnetik separasyon (IMS) yöntemi ve cam çubuk sütun profikasyonu sayılabilir. formol-etil asetat ve formol-etil çöktürme yöntemleri ile Sheather'in yüzdürme tekniği en sık kullanılan konsantrasyon teknikleri arasındadır. Çöktürme teknikleri uygulanırken başka parazitleri çöktürmekte kullanılabilen santrifüj hızları, *Cryptosporidium* spp.'nin küçük yapıdaki ookistler için yeterince hızlı olmayacağından, *Cryptosporidium*'un ookistleri tespit edilmek istendiğinde 1000-1500 rpm'de iki dakika süresince santrifüjü yapılmalıdır (78, 80, 81).

Toplanmış dışkı örnekleri, serum fizyolojik(SF) damlatılmış lam üzerinde karıştırılarak direkt taze bakı preparatı oluşturulur ve x10 ve x40 objektifler ile incelenmektedir. Taze dışkı veya yüzdürme tekniği ile çoklaştırılmış dışkı örnekleri differensiyel interferens kontrast veya faz kontrast ile nativ olarak incelendiğinde ookistlerin tespit edilmesi mümkün olmaktadır. *Cryptosporidium*'un ookistlerinin mikroskopik olarak incelenmesi esnasında mayalarla benzer yapılar göstermesi nedeniyle, hazırlanan boyasız preparatlar parazitin tanınmasını zorlaştırmaktadır.



Bundan dolayı hazırlanan preparatlarının boyama yöntemiyle incelenmesi tanımlama yapılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu boyama yöntemleri arasında modifiye asit-fast sıcak boyama yöntemi, kinyoun asit fast boyama yöntemi, Akridin orange (AO), Floresan boyama (Auramin-rhodamine (AR), Auramin-fenol floresans, Auramin-karbol fuksin), safranin-metilen mavisi ve Giemsa, karbolfuksin, nigrosin boyama yöntemleri sayılabilir (29, 31, 32, 82, 83).

Modifiye ziehl neelsen boyama yöntemi ile boyanmış olan preparatlarda *Cryptosporidium* spp. ookisti yeşil zeminde, kırmızı-pembe bir renk ile gözlenebilmektedir. Bakteriler, mantar sporları, fekal kalıntılar ve diğer asit fast özelliği olmayan yapılar mavi renkli görülürler. Karşıt boya olarak metilen mavisi kullanılmışsa, *Cryptosporidium* spp. ookistleri kırmızı, mayalar mavi renkte boyanır (79, 84).

Safranin-metilen mavisi ile boyanan preparatlarda *Cryptosporidium* spp. ookistlerin rengi kırmızı-turuncu, şeffaf bir hale ile çevrili olarak fark edilirken, fekal kalıntılar ise mavi renkte gözlenir. Dolayısıyla safranin-metilen mavisi yöntemiyle boyanan preparatlarda *Cryptosporidium* spp. ookistlerin tanısını oldukça kolaylaştırmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı ise ookistin iç yapısının iyi seçilememesi ve boyanmanın etkenin tümünü kapsamayabilmesidir (39).

Karbol fuksin boyama yönteminde *Cryptosporidium* spp. ookistleri düzgün duvarlı ,siddetli ısıtıcı özellikte olan ve oval bir objektif ile gözlenirken, zemini kırmızı renkte boyar. Karbol fuksin boyamada x40 objektifle bakılarak mikrometrelik oynamalar sonucunda, *Cryptosporidium* spp. ookistlerin içinde kırmızı renkte kalıntıl halinde sporozoitler fark edilmektedir (85, 86).

Negatif boyama yöntemlerinden nigrosin boyama, bakteriler ile zemin yeşil renge boyanırlarken, *Cryptosporidium* spp. ookistleri ile mantar sporları boya almamaktadır. Bundan dolayı bu boyama yönteminde ookistler ile mantar sporları ayırt edilebilmesi deneyim gerektiren bir iştir. Benzer şekilde karbol fuksin ve metilen mavisi-eozin boyama yöntemlerinde de, nigrosin boyamaya benzer bir durum vardır ve ortamda bulunan renk kontrastında bir yetersizlik vardır ve buda ookistlerin taramasının yapılabilmesini zorlaştırmaktadır (39).

Giemsa boyama yöntemi, kolay uygulanan ve hazırlanmış olan preparatların uzun süre saklanabildiği bir boyama yöntemidir. Fakat giemsa boyama tekniği ile hazırlanan

preparatların renk kontrastının çok zayıf olmasından dolayı *Cryptosporidium* spp. ookistlerini dışkıdaki bulunabilen diğer sporlardan ve mikroorganizmalardan ayırt etmede zorluklar görülmektedir (58).

### 2.8.2 Serolojik yöntemler

*Cryptosporidium* spp. ookistlerinin tanımlanmasında serolojik yöntemler olarak direkt immunfloresan antikor (DFA), indirekt immunfloresan antikor (IFAT), ELISA ve hızlı tanı kistleri ticari olarak kullanıma sunulmuştur (77, 87).

*Cryptosporidium* spp.'nin yüzey antijenlerini saptayabilen DFA yöntemi , modifiye asit-fast boyama yöntemine göre daha yüksek duyarlılık (%99) ve özgüllüğe (%100) sahip olması sebebiyle en sık tercih edilen referans yöntemidir . Bu tanı yönteminde taranacak materyal lam üzerine yayma yapılarak fiske edilir ve fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli monoklonal antikorlar kullanılır.

Şüpheli antijenlerin bu işaretlenmiş monoklonal antikorların oluşmasına sebep olmuş olan antijenler olup olmadığı araştırılır. Floresan mikroskopuyla *Cryptosporidium* spp. ookistlerin varlığının araştırıldığı bu teknikte hem konsantre edilmiş hem de konsantre edilmemiş dışkı örneklerine uygulanabilmektedir. Bu testlerin kullanılışı kolaydır ve tecrübeli teknisyen gerektirmezler ve zaman kaybına yol açmazlar. Bireysel laboratuvarlarda da kullanılabilirler (88, 89).

IFA yönteminde, ookistlerin yapılarında buldukları antijenik yapıların , floresan boya ile işaretlenmiş monoklonal antikorlarla bağlanması temeline dayanır. Bu teknik diğer protozoonlar, helmintler ve enterikbakteriler ile çapraz reaksiyona sebep olmayışıyla ve çok az parazit ookistler içeren dışkı örneklerinde bile uygulanabilmesi çok önemli bir avantajdır (90). Bundan dolayı IFA tekniği hastalığın erken dönemlerinde tanımlanmasında ve asemptomatik olan taşıyıcılar belirlemede de spesifik bir yöntemdir. IFA yönteminin özgüllüğü oldukça yüksek ve asit fast boyama yöntemlerinden daha duyarlı özelliktedir. Fakat bu yöntemin pahalı olması ve de uygulanmada floresan mikroskobu gerekmesi bu yöntemin dezavantajlarıdır (78, 91). Floresan boyalar ile boyanmış preparatlar floresan mikroskobu kullanılarak x100 objektif taramasında, ookistlerin siyah zeminde yuvarlak-oval, sferik yapıda ve boyanın yapısına göre sarı-turuncu ve elma yeşili rengi ile kolay bir şekilde fark edilebilirler. Fakat ookistlerin bir çoğunun yeterli derecede içlerine boyayı

alamamaları ve yapılarının bozulmuş olması gibi nedenler ile ookistlerin iç yapılarının yeterince görülememesi ve yöntemin kalite kontrol zorluğu tekniğin dezavantajlarıdır (92, 93).

ELISA yöntemi tanı amaçlı ilk 1980 yılından sonra kullanılmaya başlamıştır, bir hemaglutinasyon plağının çukurunda oluşturulmuş antijen-antikor kompleksinin üzerine, enzimle işaretlenmiş anti-insan IgM, IgG ve diğer antikörlerin konulması ve substratta eklenmesi ile pozitif örneklerde renk oluşumunun görülmesi temeline dayanan ve paraziter enfeksiyonların tanımlanmasında kullanılan güvenli bir yöntemdir. ELISA yöntemi başka bazı yöntemlere göre hem kolay, hem de hızlı uygulanabilir bir yöntemdir (9, 91). ELISA testinin duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %100'dür. ELISA, hem kolay hem de hızlı uygulanabilir. Fakat günümüz teknolojisini gerektirdiğinden ve pahalı olması testin dezavantajlarıdır (91).

*Cryptosporidium* spp, *G. Intestinalis*, *Entamoeba histolytica* ve *E. histolytica*'nın ayrı ayrı veya beraber EIA tekniği ile 15 dakika içinde değerlendirilebildiği hızlı tanı testleri de vardır. Bu tanı testlerinin en önemli özellikleri kısa sürede, kolay uygulanabilmeleri ve yine kısa süre içinde sonucu verebilmeleridir. Bu testlerin uygulanmalarında herhangi bir araca veya ekipmanlara gereksinim yoktur ve oda ısısında 1.5-2 yıl saklanabilirler (77).

### 2.8.3 Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemlerden Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR), *Cryptosporidium* spp.'nin klinik ve subklinik tüm olgularda ve çevresel kaynaklardan tespit edilmesi amacıyla günümüzde sık kullanılan bir tanımlama yöntemidir. PZR ile örneğimizdeki tek bir ookisti bile belirlenebilmekte iken, bu sayı mikroskopla preparatların taramasında 1 gram (gr.) materyalde 10.000 - 500.000 etkene ihtiyaç vardır. PZR ile yapılan identifikasyonda, örnekte bulunabilen birçok tür taranabilmektedir ve kullanılan diğer yöntemlerinde duyarlılığının kontrol edilebilmesi mümkün olabilmektedir (31, 83).

PZR için immünsüpresif hastalar, yüksek risk taşıyan bireyler veya hayvanlardan *Cryptosporidium* ookistiyle kontamine hale gelmiş dışkı örnekleri seçilir. Bu numunelerden ookistler ayrıştırılarak alınarak ookistlerin DNA' ları elde edilir. Elde edilen DNA'lar, PZR yöntemi ile RNA'nın 18s'lik gen bölgesinde bulunan

*Cryptosporidium* 'un türlerinin tanımlanması için kullanılır. PZR yöntemi ookistlerin tanımlanması, yapılmış tanımlamayı doğrulama ve tür düzeyinde ayrımını yapılabilmesi için bir basamak olarak son yıllarda giderek daha sık kullanılan bir yöntem haline almıştır. Genellikle PZR analizi laboratuvarlarda deneyim sahibi personellerin gerekli olduğu bir yöntemdir. Dışkı numunesinde etkenin teşhis edilmesinde PZR analizinin rutin olarak kullanabilmesi için oluşabilecek kontaminasyonun riskini ortadan kaldırmak ve örnekten ookistlerin saf bir şekilde özenle izole edilmesi gerekmektedir (39).

PZR yöntemi salgınlara sebep olan parazitin türünü saptanabilmesi için de iyi bir alternatif olmaktadır. Sıvı numunelerdeki ookistlerin tanımlanması konusunda ELISA yöntemine göre 103-104 kat daha duyarlı bir yöntem olan PZR, artık başka tanımlama yöntemleri karşısında yerini almış en değerli alternatiftir ve özellikle etkenin hibridizasyonu sonucu oluşan ürünlerin hedef alındığı PZR yöntemleri, IFA tekniğine kıyasla çok daha etkili olmaktadır. PZR tekniği kötü koşullar altında muhafaza edilmiş, donmuş veya içinde çok az etkenin bulunduğu örneklerin tanımlanmasında dahi kolay kullanılabilen en uygun teknik durumundadır (94-96).

#### **2.8.4 Histopatolojik yöntemler**

Histopatoloji yöntemleri özellikle 1980'den önce sıklıkla *Cryptosporidium* 'un tanımlanmasında kullanılabilen tek yöntemdir. Barsaklardan alınan biyopsiler ile mikrovillusların kenarlarına yapışmış küçük ve yuvarlak ookistleri aranır. Bu teknikte eozin ve hemotoksilen gibi boyalarla boyanarak çeşitli dönemlerindeki *Cryptosporidium* spp.'lerin teşhisi yapılabiliyorsa da, bu yöntemin tür identifikasyonu için yeterli sonuçlar alınamamıştır. Bunun yanı sıra hem invaziv girişim gereksinim olması hem de alınan biyopsi parçası için hızlı fiksasyona ihtiyaç duyulması, pahalı olması ve uygulanması için fazla zaman gerektirmesi gibi nedenlerle günümüzde de artık çok kullanılmamaktadır (35).

#### **2.8.5 Kültür yöntemleri**

*Cryptosporidium* spp.'nin konak hücredeki gelişimi ilk olarak 2004'te tanımlanmıştır. Bu da *Cryptosporidium* tanımlaması için araştırmalarda birçok görüşün kolay bir şekilde araştırılabilecek önemli bir adım olmuştur. Mevcut yapılan

konak hücre kültürlerinde *Cryptosporidium*'un gelişim evrelerini tespit etmek mümkündür; fakat çok küçük boyutlarda gerçekleştiği için yapısının tam olarak tanımlanabilmesi zordur. Kültürler, 37 °C sıcaklıkta ve %5'lik karbondioksitli ortamda 48-72 saat inkübasyona bırakılır ve sonrada çıkarılır. Çeşitli floresan boyama teknikleri işlemlerinde ise 37°C sıcaklıkta 6 gün inkübasyon yapılır (97).

*C. muris* için en ideal kültürün doğal enfeksiyon karakterlerine de uygun olarak insan mide adenokarsinom hücre kültürü olduğu ve bu kültürde *C. parvum*'u da üretebilmenin mümkün olduğu ifade edilmiştir (98).

## 2.9 Tedavi

Cryptosporidiosisli hastaların tedavisinde destek tedavi uygulamalarından, kemoterapötiklerden , antiviral tedaviden ve immunoterapiden faydalanılabilmektedir. Cryptosporidiosis karşı pek çok farklı tedavi yaklaşımı söz konusu olsa da henüz spesifik belli bir tedavi bulunmamaktadır (31).

Cryptosporidiosisli hastaların tedavisinde destek tedavi sodyum, potasyum, bikarbonat ve glukoz içeren sıvı ve elektrolit replasmanı içermelidir. Nişasta bazlı oral rehidrasyon solüsyonları glukoz bazlı solüsyonlardan daha düşük osmolariteli kaloriler sağlar ve çoğu vakada tercih edilir. Cryptosporidiosis nitrusyonel durumu kötüleştirdiği için malnutrisyon ortaya çıkar ve böylece cryptosporidiosisi daha da ağırlaşır (99, 100). Malnutrisyon immun sistemi de bozar ve enfeksiyona çok duyarlı bireyler ortaya çıkarır. Diğer taraftan yeterli hidrasyon, ishalden dolayı azalmış veya kaybolmuş önemli elementlerin replasmanı mukozal fonksiyonu tamire yardım eder, immun cevabı artırır ve mukozal hasarı takiben intestinal mukozal bariyeri onarmaya yardım eder. Bu nedenle nutrisyonel destek ishal tedavisinin önemli bir parçasıdır. İnfantlar genellikle anne sütü ile beslenmeye devam etmelidir. Yetişkinlerde laktozsuz diyet semptomları iyileştirebilir, matür epitelyal hücreler boyunca villus uçlarında üretilen laktaz hastalık seyri sırasında kaybolabilir. Son bilgiler intestinal epitel hücreler için önemli bir enerji kaynağı olarak glutamini işaret etmektedir. Çünkü glutamin bağırsakta hızlı bir şekilde azalır, alanyl-glutamin gibi formülasyonlar glutaminin daha sağlıklı bir kaynağını temin eder. Çalışmalar sıvı absorpsiyonunun genellikle alanyl-glutamin formlarında glutamin desteği ile artırılabilirdiğini gösterir (101).

Cryptosporidiosis tedavisinde günümüze dek pek çok ilaç denenmiştir. Bunların içinde en çok denenilen ilaç spiramisindir (102). *Cryptosporidium* spp. bulunan bebeklerde spiramisinin verilerek dışkılama miktarının önemli derecede azaldığını, fakat oluşan ilaç yan etkileri sebebiyle ilaç kesilmesi ile birlikte ookistlerin atılımı tekrardan arttığını bildirmişlerdir. *Cryptosporidium* spp. tedavisi için kullanılabilen bir başka ilaç, aminoglikozid grubundan olan antibiyotik paromomisin'dir. *Cryptosporidium* spp. ile enfekte olmuş beş AIDS hastasına paromomisin verilmesi ile beraber hasta bireylerdeki ishal ve diğer oluşmuş belirtilerinde azaldığı bildirilmiş ve üç ila altı ay sonra hastalarda tekrardan bu belirtilerin oluştuğu bildirilmiştir (103). Bir diğer antibiyotik azitromisin (makrolid grubu), *Cryptosporidium* spp. ile enfekte olmuş AIDS hastalarına günde 1000 mg olacak şekilde iki doz iki ila dört hafta süreyle verildiğinde de hastalarda dışkı miktarı ve sıklığında azalma olduğu, fakat bu hastalarında ookistleri çıkarmaya devam ettikleri belirtilmiştir (104).

Nitazoksanid (NTZ, geniş spektrumlu thiazolid grubu) cryptosporidiosis tedavisinde denenmiş, üç gün boyunca günde iki kez 100 mg nitazoksanid tedavisi ile HIV negatif çocukların %56'sında klinik ve parazitolojik düzelme sağlanırken, HIV pozitif çocuklarda bu ilaç etkisiz kalmıştır (106). NTZ'nin başka bir araştırmada, AIDS'li olgularda ookist atılımını ve dışkılama sayısını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (105).

Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda yüksek doz ve uzun süreli tedavilerde NTZ ile klinik semptomların düzeldiği ve dışkıda ookistlerin kaybolduğu ve parazitolojik düzelmenin hızlandığı bildirilmiştir (106).

Cryptosporidiosis enfeksiyonlarında ishali şiddeti ve süresi konağın immunitesiyle yakından ilişkili olduğu anlaşılınca, immunolojik yöntemlerde tanımlama amaçlı denenmeye başlanmıştır. Bazı olgularda immünsüpresyon oluşturan ilaçların kullanımının kesilmesi ile enfeksiyonun tamamen iyileştiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle cryptosporidiosisli 7 HIV(+) hastada *C. parvum* ile kullanılarak bağışık sağlanmış buzağuların lenf düğümündeki hücrelerden elde edilen lökosit ekstresi ağız yolu ile verildiğinde, hastaların altısında kilo almış ve barsak hareketleri de azalmıştır ve beşinde ise dışkı ile ookist atılımı durmuştur (107).

İmmün yetmezliği olan hasta grubunda temelde kullanılabilen ilaçlar; immün sistemi düzenleyicilerden ( İnterlökin 2, hiperimmün kolostrum, bovin transfer faktör),

antimikrobiklerden (spiramisin, paramomisin, nitazoksanid, azitromycin, roksitromisin, letrazuril, maduramycin, lasalocid, aprinocid) ve antidiyareiklerden (maduramycin, morfin sülfat, maduramycin, difenoksilat) tedavi amacıyla kullanılabilir(108).

## 2.10 Korunma

*Cryptosporidium* enfeksiyonlarını kontrol altına almak için de çevrede bulunan bu ookistlerin yayılımının önlenmesi önemlidir. *Cryptosporidium* ookistleri dış ortamda uzun süre canlı kalabilirler. Ookistler çevre koşullarına ve dezenfeksiyon işlemine dayanıklıdır. -20 °C'de 72 saat dondurmak veya 45 °C-55 °C'de 20 dakika ısıtma işlemi ookistlerin enfektivitelerini azaltır veya yok eder (37).

Ellerin uygun şekilde yıkanmalı, havuz sularının yutulmamasına özen gösterilmeli, insan ve hayvan kaynaklı dışkıları ile direkt temasın kesilmeli, içme suyunun güvenli olması için gereken tedbirler alınmalıdır (21, 60). Laboratuvarlar, hastaneler, gündüz bakım evleri gibi toplu yaşam alanlarında genel hijyenik kurallara dikkat edilmesinin önemli olduğu bildirilmektedir. Enfekte bireylerle temasın azaltılması, enfekte atıkların uygun şekilde imha edilmesi, şüpheli kontamine suların kullanılmadan önce kaynatılması gibi tedbirler faydalıdır (70, 109).

Enfeksiyonun önlenmesinde içme suyunun arıtılması en önemli tedbirlerdendir. Enfekte olmuş hayvanların dışkıları, yağmur ve kar sularıyla nehirlere kadar ulaşır su kaynaklı bulaşlara sebep olmaktadır. Evlerde kuyu suyu kullanımı veya yağışların etkisiyle yüzey suları kontamine olduğunda , suların filtrasyonu oldukça önem kazanır (20, 110). *Cryptosporidium* ookistleri çok sayıda kimyasal dezenfektana dirençli olduğundan enfeksiyon kontrolü için dezanfektanların kullanımı sınırlıdır (68, 70, 109). En çok tavsiye edilen dezenfektan %2.5 sodyum hipoklorit çözeltisidir. %10 formalin ve %5 amonyum solüsyonunda 4°C'de 18 saat bekletmeyle ookistlerin enfektivite özelliğinin ortadan kaldırdığı bildirilmektedir (111). Suyun 72 °C'de 1 dakika kadar ısıtılması veya suyun kaynatılması ookistlerin inaktive olması için yeterlidir (110).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Etik kurul ve proje sestek onayı bilgileri**

Bu tez çalışması 27.09.2018 tarihinde 106 karar numarası ile İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi (İKÇÜTF) Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından değerlendirmeye alınarak yazılı olarak onaylandı, 2018-TDU-TIPF-0055 proje numarası ile İKÇÜTF Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenmesi uygun bulundu. Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak tamamlandı (112).

#### **3.2. Hasta grubunun seçimi**

Çalışmaya, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi (İKÇÜTF) Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinin onkoloji bölümünde 1.02.2019-31.07.2019 tarihleri arasında takip ve tedavileri yapılan kemoterapi alan malign solid tümör tanılı, beş günden uzun süren ishal şikayeti olan toplam 94 hasta çalışmaya dahil edildi. Her gönüllüden 'bilgilendirilmiş olur formu' alındı. Hasta grubu için hastaneye geliş tarihi, hastanın yaşı, cinsiyeti, doğum yeri ve yaşadığı yer, klinik tanısı, ishalinin kaç gün sürdüğü sorgulandı.

#### **3.3. Dışkı örneklerinin saklanması**

Çalışmaya alınan dışkı örneklerine ilk önce parazitolojik inceleme yapıldıktan sonra aynı gün kinyoun asit-fast boyama işlemi uygulandı. Kalan dışkı örnekleri hiçbir koruyucu madde eklenmeden ikiye ayrılarak 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. ELISA çalışması yapılacak örnekler -80 °C' de saklandı.

#### **3.4. Direkt mikroskopik inceleme**

Dışkı taşıma kaplarında laboratuvara getirilen ishalleri dışkı örnekleri bekletilmeden ilk önce makroskopik inceleme yapıldı. Daha sonra serum fizyolojik ve lügol kullanılarak lam lamel arası preparat yapılarak x10 ve x40 objektif de (protozoon trofozoit ve kistleri ile helmint yumurtaları ) parazitolojik yönden incelendi.



### 3. 5. Formol- etil asetat çöktürme yöntemi

1. 10 ml %10'luk formol çözeltisi içinde en az 30 dakika muhafaza edilen dışkı örneği tahta bir çubuk yardımı ile homojen bir sıvı oluşuncaya kadar karıştırıldı.
2. Süspansiyon plastik süzgeç ile süzüldü, buradan da 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne (falcon tüpü) aktarıldı.
3. Süspansiyona iki ml etil asetat eklendi. Tüpün ağzı kapatılarak 30 saniye kuvvetlice çalkalandı.
4. Tüp içindeki süspansiyon 2500 rpm'de beş dakika santrifüj edildi.
5. Tüp santrifüj cihazından çıkarıldığında, oluşan karışımın dört faza ayrıldığı görüldü.

Bunlar;

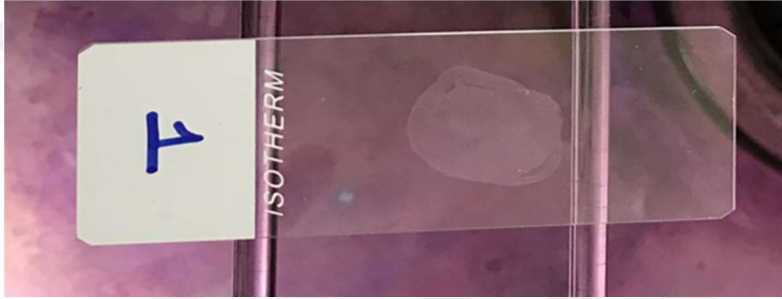
- a. En üstte etil asetat tabakası
- b. Tüpün duvarlarına yapışmış bir dışkı artığı tabakası
- c. Formol içeren tabaka
- d. Çökelti tabakası

**Resim 2.** Dışkı örneğinin formol- etil asetat ile çöktürme



6. Üstteki dışkı artığı tabakası bir gaita çubuğu vasıtasıyla gevşetildikten sonra tüp hızlıca eğilerek çökelti haricindeki diğer bölümler (üstteki üç tabaka) döküldü. Bundan sonra kenarlarda kalan sıvının az bir miktarı tekrar çökelti üzerine aktı.
7. Tüpün kenarlarında kalan sıvının çökelti içine akan kısmı çökelti ile karıştırıldı. Çökelti hala pıhtı ise birkaç damla fizyolojik serum eklenerek vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.
8. Çökeltiden pastör pipeti yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı ve hazırlanan preparat oda ısısında kurumaya bırakıldı.

**Resim 3.** Formol- etil asetat ile çöktürme sonrası lam üzerine yayılan örnek



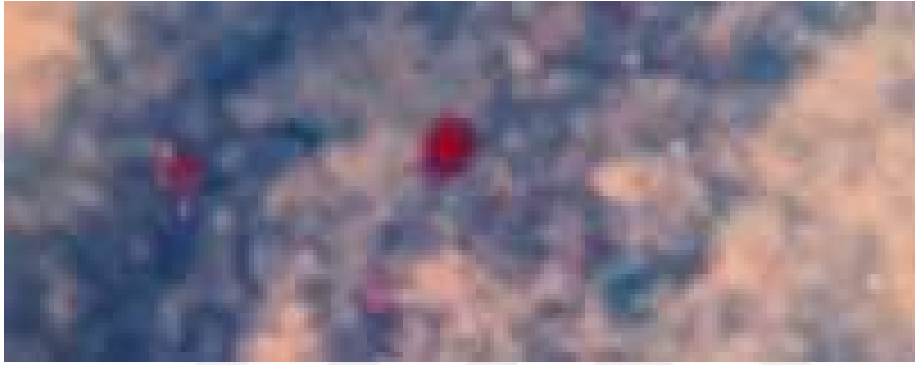
### 3. 6. Kinyoun asit-fast boyama yöntemi

Çalışmada AFB Kinyoun Kit Cold Method ( Polysciences, Inc) kiti kullanıldı ve çalışma, üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

1. Taze dışkı örneğinden formol- etil asetat çöktürme işlemi sonrası yaymalar hazırlandı.
2. Yaymalar havada kurutuldu ve lamlar alevden yavaşça geçirilerek fikse edildi ve soğumaya bırakıldı.
3. Lamlar boyama çubuklarının üzerine yere tam paralel şekilde yerleştirildi ve üzerlerine lamları tam kaplayacak şekilde karbol-fuksin ( kinyoun) boyası döküldü.
4. 2-3 dakika bekletildikten sonra fazla boya dökülüp distile su ile lamlar yıkandı.
5. Daha sonra lamlar asid-alkol ile muamele edilerek rengi giderildi ve distile su ile yıkandı.
6. Lamların üzeri metilen mavisi ile kaplanarak 1-2 dakika bekletildi sonra fazla boya dökülerek distile su ile yıkayıp kurumaya bırakıldı.
7. Daha sonra kuruyan lamlara immersiyon yağı damlatılarak, x100 büyütme ile ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

8. Mavi renge boyanmış zeminin üzerinde kırmızı-pembe renk ile boyanmış, içinde birden fazla siyah ve düzensiz olan granüller bulunan ve 4-6 µm çapında oval-yuvarlak yapılar görüldü ve bunlar *Cryptosporidium* ookistleri oldukları tespit edildi. Mavi-yeşil renge boyanmış ve ookistlerden daha büyük yapılar ise mantar olarak değerlendirildi. Kinyoun asit fast ile boyalı tüm alanlar iki kez tarandıktan sonra *Cryptosporidium* ookistleri görülmediyse negatif sonuç bildirildi.

**Resim 4.** Kinyoun asit-fast boyama yönteminden elde edilen görüntü



### 3. 7. ELISA Yöntemi

Hastalardan toplanıp bir kısmı eppendorf tüplerine konularak –80 °C’de saklanan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *C. parvum* ve *C. hominis* antijenleri arandı. Çalışmada *Cryptosporidium* (RIDASCREENR, C 1201 r-biopharm) kiti kullanıldı ve çalışma üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

**Resim 5.** ELISA kiti



### 3. 7. 1. Yıkama solüsyonu ve örneklerin hazırlanması

Kullanılmadan önce tüm reaktifler ve mikrokuyucuklu pleyt ile çalışma zamanına kadar eppendorf tüplerinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan dışkı örnekleri oda ısısına ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) getirildi. Bir kısım konsantre wash buffer ile dokuz kısım deiyonize su karıştırılarak yıkama solüsyonu hazırlandı. Her hasta için numaralandırılmış eppendorf tüpüne bir ml örnek dilüsyon solüsyonu konuldu. Sıvı olan test edilecek dışkı örneklerinden pastör pipeti ile yaklaşık  $100\ \mu\text{l}$  alındı ve bu dışkı, içinde örnek dilüsyon solüsyonu bulunan eppendorf tüplerinde süspanse edildi. Katı olan dışkılar ise bir tahta çubuk yardımıyla eşit miktarlarda ( $\sim 50-100\ \text{mg}$ ) alınıp bunlar da içinde örnek dilüsyon solüsyonu bulunan eppendorf tüplerinde süspanse edildi. Vorteks karıştırıcıda dışkı süspanسیونları homojenize edildi. Homojenize olan bu dışkı süspanسیونlarının süpernatantı direkt olarak testte kullanıldı.

### 3. 7. 2. Testin Çalışması

1. Pleytteki birinci kuyucuğa (pozitif kontrol kuyucuğu) pozitif kontrol sıvısından iki damla ( $100\ \mu\text{l}$ ), ikinci kuyucuğa (negatif kontrol kuyucuğu) örnek dilüsyon solüsyonundan iki damla ( $100\ \mu\text{l}$ ) ve hastalara ayrılan test kuyucuklarının her birine, hazırlanan dışkı örneklerinin süpernatantından  $100\ \mu\text{l}$  yerleştirildi.
2. Pleytteki tüm kuyucuklara  $100\ \mu\text{l}$  konjugat-1 eklenip yavaşça sallanarak karıştırıldı ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
3. Kuyucuklarda inkübe edilmiş içerik hipoklorid içeren bir atık kabına boşaltıldı. Ardından pleytteki kuyucuklar her seferinde  $300\ \mu\text{l}$  yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa  $100\ \mu\text{l}$  konjugat-2 eklenip yavaşça sallanarak karıştırıldı ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
5. Kuyucuklarda inkübe edilmiş içerik hipoklorid içeren bir atık kabına boşaltıldı. Ardından pleytteki kuyucuklar her seferinde  $300\ \mu\text{l}$  yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı.
6. Her kuyucuğa  $100\ \mu\text{l}$  substrat eklenip karanlıkta oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.

7. Her kuyucuğa 1 damla (50 µl) stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve pleytin kenarına hafifçe tıklatılıp dikkatlice karıştırıldı.

8. Pleytteki her bir kuyucukta oluşan renk değişimi 450 nm (nanometre) dalga boyunda fotometrik olarak bir ELISA okuyucu cihazında ölçüldü. Sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirildi.

#### **Sonuçların Yorumlanması:**

Pozitif Kontrol: Sarı renkli olmalı ve optik dansite (OD)  $\geq 0.800$  (450 nm de) olmalı.

Negatif kontrol: Renksiz olmalı ve optik dansite (OD)  $\leq 0.200$  (450nm de) olmalı

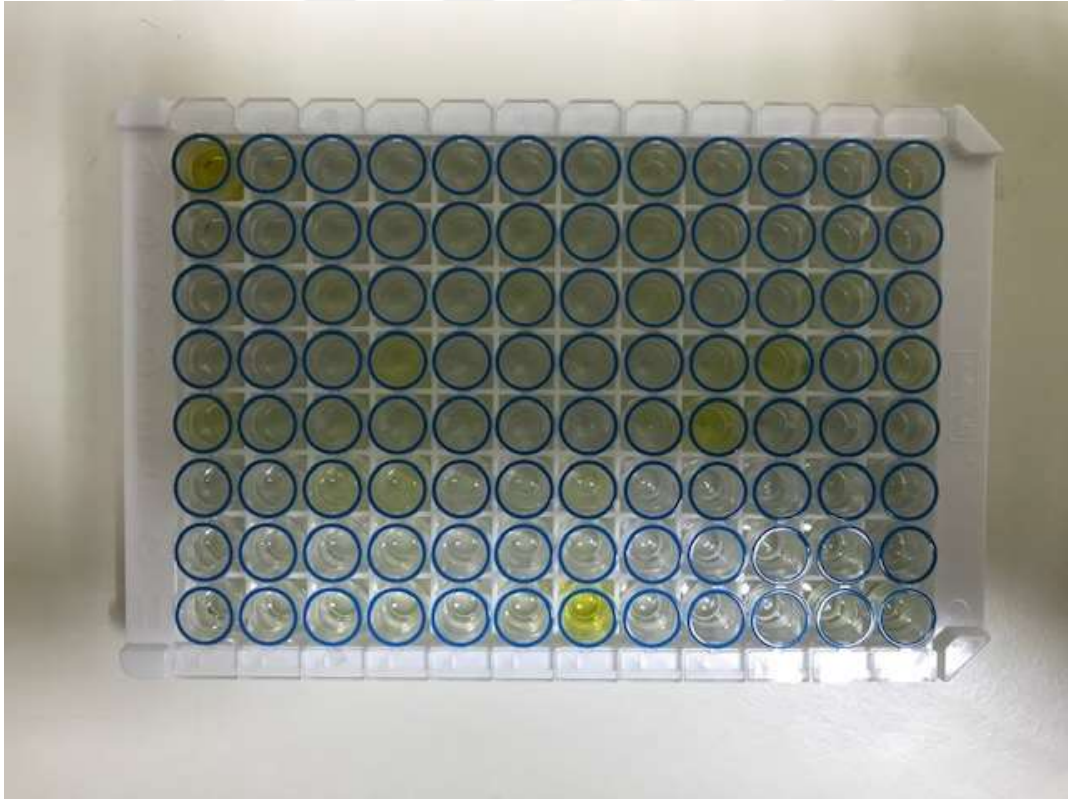
Cut off = Negatif kontrol + 0.15 = 0.068 + 0.15 = 0.218

Pozitif Numune: OD  $\geq 0.218$

Negatif Numune: OD  $\leq 0.218$

Ayrıca ELISA test pozitifliği renk değişimi ile de görülmektedir.

**Resim 6.** ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü.



Çalışmadan elde edilen verilerin analizinde SPSS 22 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama, standart sapma ve yüzde dağılımları verilmiştir. Demografik verilerin kullanılan yöntemlerle karşılaştırılması için Yates Düzeltmeli Khi-Kare testi uygulanmış olup elde edilen sonuçlar %95 anlamlılık düzeyinde ( $p<0.05$ ) değerlendirilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran, kemoterapi alan malign solid tümörlü ishal şikayeti bulunan yaşları 19 ile 85 arasında değişen toplam 94 (60'ı erkek, 34'ü kadın) hastanın dışkı örnekleri incelendi. Yaş ortalamaları  $64,11 \pm 1.58$  olarak saptandı. Tüm örnekler mikroskopik ve serolojik yönden incelenmiştir. 94 dışkı örneğinin ikisinde (%2.1) kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp.'ye ait olduğu düşünülen ookistler görüldü. Mikroskopta incelenen bu ookistler yoğunluk olarak değişkenlik gösterdi. ELISA yöntemi ile 94 hasta örneğinin beşinde (% 5.3) pozitiflik saptanmıştır. *Cryptosporidium* spp. açısından kinyoun asit-fast boyama ile pozitif tespit edilen iki hastada, ELISA ile de pozitif sonuç verdi.

**Tablo 3.** Dışkı örneklerinde mikroskopik bakı sonucunda tespit edilen diğer parazitler

Görülen Türler	Sayı	Yüzde (%)
<i>Giardia intestinalis</i>	1	1.1
<i>Blastocystis hominis</i>	7	7.4
<i>Entamoeba coli</i>	4	4.3

**Tablo 4.** Kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile ELISA yönteminin karşılaştırılması.

Yöntem	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam
<b>Kinyoun asit-fast</b>	2 (%2.1)	92 (%97.9)	94
<b>ELISA</b>	5 (% 5.3)	89(%94.7)	94

**Tablo 5.** ELISA yöntemi baz alınarak Kinyoun asit-fast boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmesi

	<b>Kinyoun asit –fast Negatif</b>	<b>Kinyoun asit –fast Pozitif</b>	<b>Toplam</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>ELISA Negatif</b>	89 (100)	0 (0)	89 (100)	36.374	0,000
<b>ELISA Pozitif</b>	3 (60)	2 (40)	5 (100)		

Kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile ELISA yönteminden elde edilen sonuçlar arasında fark olup olmadığını belirlemek için yapılan analiz sonucunda Tablo 4’de görülen değerler elde edilmiştir. Buna göre kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile pozitif olarak saptanan iki hastanın ikisinde de (% 100) ELISA yöntemiyle de *Cryptosporidium* pozitif olarak tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile negatif olarak tespit edilen 89 hastadan hiçbiri Kinyoun asit -fast boyama yöntemiyle pozitif olarak saptanmamıştır. ELISA testi baz alınarak kinyoun asit -fast boyama yönteminin duyarlılığı %40, özgüllüğü de %100, pozitif prediktif değer: %100, negatif prediktif değer: %96.7 ve Testin doğruluk oranı: %96.8 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 6.** Kinyoun asit -fast boyama yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmesi

	<b>ELISA Negatif</b>	<b>ELISA Pozitif</b>	<b>Toplam</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Kinyoun asit –fast Negatif</b>	89 ( 96.7)	3 (3.3)	92 (100)	36.374	0,000
<b>Kinyoun asit –fast Pozitif</b>	0 (0)	2 (100)	2 (100)		

Kinyoun asit -fast boyama yöntemi baz alınarak yapılan karşılaştırma neticesinde ile ELISA yöntemiyle negatif olarak tespit edilen 89 hastanın hepsi kinyoun boyama yöntemiyle negatif olarak bulundu. ELISA yöntemiyle pozitif olarak tespit edilen 5 hastadan 2’si (% 40) kinyoun asit -fast boyama yöntemiyle de pozitif olarak tespit

edilmiştir. ELISA yöntemi ile pozitif, yine kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile pozitif bulunan hastalardan tamamı ELISA yöntemiyle de pozitif bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar göstermektedir ki ELISA yöntemi kinyoun asit -fast boyama yöntemine oranla daha etkili bir yöntemdir. ELISA yönteminin duyarlılığı %100 özgüllüğü de % 96.7, pozitif prediktif değeri : %66.67, negatif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır.

**Tablo 7.** *Cryptosporidium* spp. pozitif saptanan hastaların özellikleri

	YAŞ	CİNSİYET	TANI	Kinyoun asid fast boyama	ELISA
<b>HASTA 1</b>	71	K	Duodenum kanseri	Negatif	Pozitif
<b>HASTA 2</b>	54	E	Oligodendriogliom	Pozitif	Pozitif
<b>HASTA 3</b>	74	K	Kolon kanseri	Pozitif	Pozitif
<b>HASTA 4</b>	73	E	Kolon kanseri	Negatif	Pozitif
<b>HASTA 5</b>	47	K	Kolon kanseri	Negatif	Pozitif



## 5. TARTIŞMA

Kanser sayısındaki artış, immün yetmezlik , immun yetmezlik yapan ilaçların kullanımının artması, malnütrisyon ve toplumun yaşlanması sonucunda parazit kaynaklı enfeksiyonlara yatkınlık artmıştır. Cryptosporidiosis de dünya da birçok yerde oldukça yaygın hale gelmiştir. Bunun yanısıra nosokomiyol ishallerde üçüncü en sık patojen (%7. 2) olarak yer alması önemini daha da arttırmaktadır (113, 114).

*Cryptosporidium* enfeksiyonunun ortaya çıkması ookistlerin direkt veya indirekt olarak sindirim yoluyla alınması sonucu gelişir. Ookistlerin dış koşullara dayanıklı olması, az sayıda ookistlerin enfeksiyon oluşturabilmeleri, ookistlerin 2. 5 µm çapındaki filtrelerden geçebilmesi ve klora daha dirençli olmaları, ayrıca doğada geniş bir yelpazede bulunabilmeleri cryptosporidiosisin epidemiyolojisini belirlemekte ve yayılımını kolaylaştırmaktadır (39, 61).

Cryptosporidiosisin en sık görüldüğü gruplar HIV pozitif hastalar ve immunsuprese bireylerdir. Nadir olarak sağlıklı bireylerde de görülmektedir. Farklı sonuçların çıktığı çalışmalar da bulunmaktadır ve bu farklılıkların sebebi; laboratuvar yöntemlerine, seçilen grupların farklılığına, coğrafik yerleşime ve hastalığın farklı evrelerine bağlanmaktadır. 2002 de HIV (+) bireylerde ortalama %32'lik oran bildirilmiştir (7). Batero ve ark.'ları akut lenfosittik lösemili, kronik lenfositik lösemili, HIV(+) ve diğer immünsüpresif olan 111 vakada en çok görülen parazitin *Cryptosporidium* spp. olduğu bildirmiştir (115). Ülçay ve ark.'ları (116) 2008 yılında yaptıkları bir araştırmada ishali olan immunsuprese 36 vakanın üçünde (%8.6) *Cryptosporidium* tespit edilmiştir. Tanyüksel ve ark.'ları çeşitli kanser türüne sahip 116 hastanın 18'inde (%17.0) *Cryptosporidium* spp rapor etmişlerdir (117). Refik Saydam Hıfzıssıhha merkezinde ishal şikayeti olan 72 solid tümörlü hastada *Cryptosporidium* spp. araştırılmıştır. Hasta grubundaki 72 örneğin %8.3'ünde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır (118). Çalışmamızda immunsuprese olarak kabul edilen 94 kemoterapi alan malign solid tümörlü hastanın beşinde (%5. 32) *Cryptosporidium* spp. antijeni saptandı. Sarı ve ark.'ları 2003 yılında hemodiyaliz ünitesinde tedavi gören 47 kronik böbrek yetmezliği olan hastada ve 36 sağlıklı kişinin dahil edildiği araştırmalarında; *Cryptosporidium* spp.'nin hasta grubunda %6.4, kontrol grubunda %2.1 oranında tespit edildiğini bildirmişlerdir (119). Çalışmamızda 94 malign solid tümörlü hastanın ELISA yöntemiyle beşinde *Cryptosporidium*

antijeni pozitif bulunmuşken bu örneklerden 2 tanesi hem ELISA hem de kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle pozitif bulundu.

İmmüsupresyon durumunun parazitik enfeksiyonlarına etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. İmmüsuprese hastaların her parazit türüyle enfekte olabileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (120). *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonlarında da immünte tam olarak bilinmemektedir. İmmü yanıt oluşumuyla ilgili elde edilen bilgilerin çoğunluğu hayvan üzerinde yapılan çalışmalardan öğrenilmiştir. Bu çalışmalarda enfeksiyonların önlenmesinde ve/veya iyileştirilmesinde gamma interferonun ve CD4 T lenfositleri önemli rol oynadığı bildirilmektedir (121, 122). HIV(+) hastalarda akut sınırlı enfeksiyonu olanlarda CD4 sayısı >180 hücre/mm<sup>3</sup>, iken fulminant enfeksiyonlularda CD4 sayısının <50 hücre/mm<sup>3</sup>, olduğu bildirilmiştir (123). Ayrıca IL-5 ve IL-12 gibi sitokinlerin azalmasının da *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonun şiddetlenmesinde etkili olduğu kanaatine varılmıştır (124). 1998 yılında Theodos akut ve kronik cryptosporodiosis kontrolünde CD4 T lenfositlere bağımlı sistemik hücrese bağışıklığın önemli olduğuna, Mc Donald ve Boreroff'da, hümoreal bağışık yanıtın cryptosporidiosisden korunmada rol oynadığına vurgu yapmışlardır (125). Böylece özellikle HIV pozitif olanlar ile diğere immüsuprese bireylerde cryptosporidiosisin farklı klinik tablolar oluşturabileceği yorumlanmıştır. Bizim çalışmamızda 94 immüsupresif kanser hastasının beşinde (%5. 32) *Cryptosporidium* pozitifliği saptanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda CD4 T lenfositleri sayılarına bakılmadığından çalışmamız için etkisini belirlenememektedir.

*Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun tüm dünyada görülebildiği ve sağıklı kişilerde de salgınlara yol açabildiği ortaya konmuştur (126, 127). Daha çok su kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan *Cryptosporidium* spp. ookistleri hem tatlısular da hem de tuzlu sularda aylarca enfekte olarak kalabilir (127). Rutin klor ve ozonlama işleminin ookistleri etkisiz hale getirmede ya çok az yada hiç etkisi olmamaktadır (128). Su kaynaklı *cryptosporidiosis* salgınları büyük oranda kontamine olmuş içme suyu kullanımına bağılı olduğu belirtilmiştir (21). İngiltere de salgınlarla ilişkili yapılmış bir çalışmada 1992-2003 yılları arasındaki su kaynaklı 80 salgının %69'una *Cryptosporidium* 'un sebep olduğu bildirilmiştir. Toplam 62 salgının 21'den belediye suyu 6'sından özel ambalajlı sular ve 32'sinden yüzme havuzları sorumlu tutulmuştur (126). Yine son yıllarda Avrupa ve Avusturalya, Kanada ve İngiltere de su yoluyla

*Cryptosporidium* salgınları bildirilmiştir (129). Çalışmamızda *Cryptosporidium* ookistleri saptanan hastaların tamamı hijyenlerine önem gösterilen ve içme suyu olarakta şebeke suyu kullanmadıkları bilinen takipli onkoloji hastalarıdır. Bu sebepten dolayı bulaş kaynağı tespit edilememekle beraber hastaların kontrolleri dışında kontamine olmuş su ile temasları olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde *Cryptosporidium*'u içeren salgınlarla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Mersin bölgesinde Otağ ve ark.'larının yaptığı çalışmada illerindeki çeşitli semtlerde içme suyu, kullanma suyu ve atık su ile deniz suyunda *Cryptosporidium* araştırmışlardır. İçme suyunda %11.36, deniz suyunda %2.85, atık su örneklerinde %21 oranlarında *Cryptosporidium* saptadıklarını, ve bu bölgelerde su ve kanalizasyon sisteminin yetersiz olduğunu vurgulamışlardır (130).

*Cryptosporidiosis* tanısı ve *Cryptosporidium*'un türlerini saptamak için doku biopsisi, dışkı boyama, DFA, ELISA, IFAT, PZR gibi yöntemler kullanılabilir. *Cryptosporidiosis* tanısı için en kolay yöntem boyama yöntemi ile dışkının boyanarak mikroskopta ookistlerin taranmasıdır. Toplanan dışkı örneklerinin direkt taze preparat hazırlayarak x10, x40 objektiflerde incelenebileceği ancak genel olarak boyasız preparatlarda tanıda zorluklar yaşandığı belirtilmiştir. Tanı da çeşitli dışkı boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Ookistlerin bol lipid içermesi *Cryptosporidium*'un aside dirençli boyama yöntemleriyle boyanarak tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Modifiye asit-fast boyama tekniğinin en iyi yöntemlerden biri olduğu bildirilmektedir. Mavi zemin üzerinde ookistlerin kırmızı-pembe renkte boyanarak kolay bir şekilde ayırılabilmesi, ookist içi yapıların ayrıntılı olarak görülebilmesi ve kalıcı bir boya olması nedeni ile *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde kullanılması uygun bulunmuştur (31, 32, 79, 81, 91).

Dışkıda *Cryptosporidium* ookist izolasyon şansını artırmak için modifiye çinko sülfat flotasyon tekniği veya Sheatler'in şeker flotasyon metodu önerilmektedir. Sarı ve ark.'ları kronik böbrek yetmezliği olan ancak gastrointestinal şikayeti olmayan 47 hastada, hem direkt hem de çöktürme yöntemi ile hazırladıkları preparatları incelemişler. Hastaların 3'ünde ookist saptamışlardır. Üç hastanın ikisinde çöktürme ve direkt boyamada, birinde sadece çöktürme yönteminde ookistleri gördüklerini bildirmişlerdir (119). Yapılan çalışmalarda immün yetmezliği olan ve ishalleri hastalardan elde edilen dışkı örneklerinden konsantrasyona gerek kalmadan

ookistlerin görülebildiği bildirilmektedir (131). Çalışmamızda *Cryptosporidium* ookistlerini daha sağlıklı tespit edebilmek için formol etil asetat çöktürme yöntemi kullanıldı, çöktürme yöntemi uygulamadan hazırladığımız preparatlarda ise dışkı yoğunluğunun fazla olması ve lam üzerine istenilen incelikte yayılamaması dışkı örneğinin gerektiği gibi boyanmasını engellediğinden ookistleri tespitite sağlıklı inceleme yapılamamıştır.

Prospektif ve epidemiyolojik çalışmalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının saptanmasında ve izlenmesinde ELISA kitlerinin kullanılması önerilmektedir (132). Jayalakshmi ve ark.'larının Hindistan'da yaptıkları bir araştırmada, ishali 89 HIV(+) hastanın dışkı örnekleri modifiye asit-fast boyama yöntemi ve ELISA ile incelemiş ve 11 (%12.4) hasta numunesinde pozitif sonuç elde edilmiştir. ELISA testinin duyarlılığı %99.9 ve özgüllüğü %98.7 olarak tespit edilmiştir. Cryptosporidiosis hakkında yapılmış geniş kapsamlı araştırmalarda, basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren ELISA yönteminin rutin çalışmalarda kullanılmasının faydalı olacağını bildirmişlerdir (133). Bizim çalışmamızda ise boyama yöntemini baz alarak değerlendirdiğimizde, ELISA yönteminin duyarlılığı %100 özgüllüğü de % 96.7 olarak saptandı.

Sönmez ve ark.'ları, lösemi ve lenfoma tanısı almış ve ishali olan 89 çocukta cryptosporidiosis prevalansını kinyoun asit-fast boyama ve ELISA yöntemleri ile araştırmışlar; ELISA ile 89 hastanın 11 (%12.3)'i, boyama ile 7 (%7.8)'si cryptosporidiosis tanısı almıştır. Boyama ile pozitif olan 7 hastanın tamamının ELISA yöntemi ile de pozitif olduğu belirtilmiştir (134). Bizim çalışmamızda ise ELISA ile 94 hastanın beşinde (%5.3), kinyoun asit-fast boyama ile ikisi (%2.1) *Cryposporidium* ookisti görülmüştür. ELISA yöntemini baz alarak değerlendirdiğimizde, kinyoun asit-fast boyama yönteminin duyarlılığı %40 özgüllüğü de % 100 olarak saptandı. Literatürde kinyoun asist fast boyama yöntemi altın standart olsa da bu çalışmada ookist görülme sıklığının az olma nedeni hastaların dışkılarında ookist miktarının az olması ve her hastadan tek dışkı örneğinde araştırma yapılması olabilir.

El Shazly ve ark.'ları tarafından Mısır'da yapılan bir çalışmaların da ishal şikayeti olan 1050 çocuk modifiye asit-fast boyama yöntemi ile incelenmiş ve 90 çocukta *Cryptosporidium* ookisti saptanmışken, ELISA yöntemiyle bu sayı 100 olmuştur (135). Direkel ve ark.'larının yaptıkları çalışmada Malatya Huzurevi sakinleri ile

İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'ne başvuran ve ishal şikayeti olan 92 hastanın dışkı örneklerinde, ELISA yöntemi ile *C. parvum* koproantijenlerini ve modifiye asit-fast boyama yöntemi ile ookistlerini araştırmışlardır. Toplam beş örnekte hem ELISA hem de modifiye asit-fast boyama yöntemi ile pozitiflik saptamışlardır. ELISA yönteminin duyarlılığını ve özgüllüğünü bu çalışmada %100 olarak saptamışlardır (136). Baveja ve ark.'larının Delhi hastanesinde yaptığı araştırmada, 216 dışkı numunesinde *Cryptosporidium*'u saptamak amacıyla modifiye asit-fast ve ELISA yöntemlerini kullanmıştır. *Cryptosporidium* spp.'yi saptamak için ELISA'nın duyarlılığının %100, özgüllüğünün ise %99.7 olduğunu bildirmiştir (137).

*Cryptosporidiosis* görülme sıklığı mevsimlere ve coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Doğan ve ark. larının çalışmalarında, pozitif olguların mevsimsel dağılımı incelendiğinde Temmuz - Ekim aylarında belirgin bir artışın olduğu görülmüştür (45). Amerika'da Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezinin (CDC) dört yıllık bir süreyi ve 47 eyaleti kapsayan bir çalışmasında, yaz mevsiminin son aylarında daha sık görüldüğü bildirilmiştir (138, 139). *Cryptosporidium* ookistlerinin özellikle sıcak ve nemli hava ile birlikte doğada konsantrasyonun artışıyla beraber, *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonlarında da benzer şekilde artış görülmektedir. Bilim adamlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda *cryptosporidiosis* özellikle de ılık ve yağışlı mevsimlerde daha çok hastalığa sebep olduğu konusunda fikir birliğine varmışlardır. Bu mevsimlerde, yağışın fazla olması sebebiyle parazitinde içme sularına ve diğer bazı gıdalara bulaşma riskinin artırdığı, Türkiye'de ise insanlarda *cryptosporidiosis* bahar aylarında yükseldiği, Eylül ve Ekim aylarında ise en yüksek artışını gösterdiği bildirilmiştir (44, 45). Bizim çalışmamızda örnek toplama zamanı özellikle Şubat-Temmuz dönemini kapsamıştır. Örnek toplama süremiz bütün bir yıl boyunca sürmediğinden mevsimler arasındaki farklılık konusunda bir yorum yapamamaktayız.

Bizim çalışmamızda nativ-lugol ve boyama ile değerlendirdiğimiz örneklerin toplam 14'ünde bol oranda *Candida* spp. görüldü. *Candida* spp. normal flora elemanı olarak bulunmaktadır. Ancak özellikle immunsuprese bireylerde flora hakimiyeti kazanıp fırsatçı enfeksiyonlar yaptıkları da bilinmektedir(140). Nativ- lugol preparasyon yöntemiyle örneklerin bir tanesinde *Giardia intestinalis* (%1,1), yedisinde (%4.3) *Blastocystis hominis* ve dördünde *Entamoeba coli* (%7.4) görüldü.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada kemoterapi alan malign solid tümörlü hastalarda *Cryptosporidium* spp. ELISA yöntemiyle % 5.3, kinyoun asist fast boyama yöntemiyle % 2.1 oranında saptanmıştır. Kinyoun asist fast boyama yöntemi *Cryptosporidium* spp tanısında altın standart yöntem olsa da, ookist atılımın az olduğu, tek dışkı örneği ile inceleme durumlarında ve tanıda dezavantaj sağlayabilir. ELISA yöntemi ise maliyeti yüksek olup örneklerin biriktirilerek çalışılmasını gerektiren bir test olmakla birlikte değerlendirilmesi için uzmana ihtiyaç olmayan, kolay bir yöntemdir. Özellikle onkoloji ünitesinde takip edilen, immunsupresif tedavi alan veya herhangi bir immun yetmezlik tanısı olan hastalarda *Cryptosporidium* spp. için tanıda kinyoun asist fast boyama yöntemi ve ELISA yönteminin birlikte kullanılması hastaların mortalite ve morbiditesini azaltacağı kanaatindeyiz.

## 7. ÖZET

### KEMOTERAPİ ALAN MALİGN SOLİD TÜMÖRLÜ HASTALARDA CRYPTOSPORİDİUM SPP.'NİN MİKROSKOBİK VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

**GİRİŞ VE AMAÇ:** : *Cryptosporidium spp.* gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gastroenterite sebep olan parazitler arasında çok önemli bir yere sahiptir. Klora dirençli olması, içme suyu arıtma süzgeçlerinden geçebilmesi ve çok az sayıdaki parazitin enfeksiyona sebep olabilmesi özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde hayatı tehdit eden ishallerle sebep olabilmekte ve su kaynaklı salgınların önemli sebebi olabilmektedir. Bu çalışmada, İKÇÜ Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na; kemoterapi alan malign solid tümörlü ve ishal şikâyeti nedeniyle gönderilen dışkılarda, *Cryptosporidium* ookistleri kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle aranmış ve *Cryptosporidium spp.*'nin. antijenleri ELISA yöntemiyle araştırılmıştır.

**MATERYAL VE METOD:** Bu çalışma, İKÇÜ Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde takip ve tedavileri yapılan 94 hastanın dışkı örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Dışkı örneklerinin bir kısmı eppendorflara alınarak -40 °C'de ELISA testleri için saklanmış, diğer kısmı ise bekletilmeden makroskopik ve mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Formol-etil asetat çöktürme yöntemi kullanılarak çoklaştırılan ve AFB Kinyoun Kit (Cold Method) ile boyanan örneklerde x100 objektifte ookistler aranmıştır. -80 °C'de saklanan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* (RIDASCREENR, C 1201 r-biopharm) ELISA kiti kullanılarak *C.parvum* ve *C.hominis* antijenleri aranmıştır.

**BULGULAR VE SONUÇ:** Çalışmamızda, yaşları 19 ile 85 arasında 94 (60'ı erkek, 34'ü kadın) hastanın dışkıları incelenmiştir. Yaş ortalamaları  $64,11 \pm 1,58$  olarak saptanmıştır. 94 fekal örneğin 2'sinde kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile pozitiflik saptanmıştır. Serolojik yöntemlerden ELISA yöntemi ile 94 örneğinin 5'inde (%5.3) pozitiflik saptanmıştır. Kinyoun asit-fast boyama ile *Cryptosporidium spp.* pozitif tespit edilen 2 hastada (% 2.1) ELISA yöntemi ile de pozitif sonuç alınmıştır. Kinyoun asit -fast boyama yönteminin duyarlılığı %40, özgüllüğü de %100; ELISA yönteminin duyarlılığı %100 özgüllüğü de %96,7 olarak tespit edilmiştir. ELISA testlerinin

maliyetinin yüksek olmasına rağmen tanımlamadaki zorluklara yardımcı olacağı ve cryptosporidiosis tanısında duyarlılığı arttıracığı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Crptosporodium*, solid organ tümörü, ishal, kinyoun asit-fast boyama, ELISA





## 7. ABSTRACT

### **Investigation of *Cryptosporidium* spp. by Microscopic and Serological Methods in Malignant Solid Tumor Patients Receiving Chemotherapy**

**Introduction and Aim:** *Cryptosporidium* spp. has a very important place among parasites that cause gastroenteritis in developed and developing countries. *Cryptosporidium* spp. can be a major cause of water-borne outbreaks and life-threatening diarrhea (especially in immunocompromised people) with its chlorine-resistant, the ability to pass through drinking water treatment filters and causing infections even with a small amount of parasites. In this study, stool specimens from patients with malignant solid tumors and diarrhea who received chemotherapy that sends to IKCU Faculty of Medical Atatürk Education And Research Hospital Medical Microbiology Laboratory; were investigated for *Cryptosporidium* oocysts by kinyoun acid-fast staining method and *Cryptosporidium* spp. antigens by ELISA methods.

**Material and Methods:** This study was carried out with stool samples of 94 patients who were monitoring and treated in Izmir Katip Çelebi University, Faculty of Medicine Atatürk Training and Research Hospital. Some of the stool samples were taken to eppendorf and stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  for further analysis, while the other part was macroscopically and microscopically examined. Oocysts were searched on x100 lens in samples which were multiplied using formol-ethyl acetate precipitation method and stained with AFB Kinyoun Kit (Cold Method). *C.parvum* and *C.hominis* antigens were searched for stool samples that stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  using *Cryptosporidium* (RIDASCREENR, C 1201 r-biopharm) ELISA kit.

**Results and Conclusion:** In this study, feces of 94 patients (60 male, 34 female) aged 19 to 85 years were examined. The mean age was calculated as  $64.11 \pm 1.58$ . Two of 94 (2.1 %) fecal samples were detected as positive by Kinyoun acid-fast staining method. According to staining results; 33 (97.1 %) of 34 female patients were detected as negative, 1 (2.9%) was positive and 59 (98.3 %) of 60 male patients were detected as negative and 1 (1.7 %) was positive. Serological examinations revealed positivity in 5 out of 94 samples (5.3 %) by ELISA method. The sensitivity and specificity of the kinyoun acid fast staining method were 40 % and 100 %, respectively. On the other hand, the sensitivity of ELISA method was 100% and the specificity was 96.7 %.

Although the cost of ELISA tests is high, it is believed that it will help to identify difficulties and increase sensitivity in the diagnosis of cryptosporidiosis. Since *Cryptosporidium spp.* is associated with life-threatening diarrhea, hygiene of food and drinking waters of risk groups for cryptosporidiosis should be considered. In addition, cryptosporidiosis should not be ignored when the risk groups present to the clinic with long-term diarrhea.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, solid tumor patients, diarrhea, kinyoun acid-fast staining, ELISA



## KAYNAKLAR

1. Plutzer, J. and P. Karanis, Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary parasitology*, 2009. 165(3-4): p. 187-199.
2. Leitch, G.J. and Q. He, Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of biomedical research*, 2011. 25(1): p. 1-16.
3. Can, H., et al., Demonstration of *Cryptosporidium parvum* in immune suppressed rats using nested PZR. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 2013. 37(3): p. 165.
4. Silva, S.O., et al., A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium spp.* and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. *Exp Parasitol*, 2013. 135(3): p. 551-7.
5. Chalmers, R.M. and F. Katzer, Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol*, 2013. 29(5): p. 237-51.
6. Current, W.L. and L.S. Garcia, Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 1991. 4(3): p. 325-58.
7. Hunter, P.R. and G. Nichols, Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15(1): p. 145-54.
8. Widerstrom, M., et al., Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerg Infect Dis*, 2014. 20(4): p. 581-9.
9. Özcel MA, Ö.Y., Ak M. Özcel, Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007; 363-376., Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. : No:22, İzmir,.
10. Xiao, L., et al., *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews*, 2004. 17(1): p. 72-97.
11. Elgün, G., İshalli dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* sp. antijeninin ELISA yöntemi ile araştırılması. 2009, Yüksek Lisans Tezi.
12. Özcel, M., et al., Tıbbi ve veteriner immunoparazitoloji. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları*, 2007(21).

13. Elgun, G. and I.S. Koltas, Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. Parasitology research, 2011. 108(2): p. 395-397.
14. K., A., in Tıbbi Parazitoloji. 2002, Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları.
15. Mehlhorn H, P.G., in "Grundriß der Parasitenkunde". 2002; 516., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Berlin. 6. Auflage.
16. Nina, J., et al., Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. Infection and immunity, 1992. 60(4): p. 1509-1513.
17. Thompson, R.A., et al., *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Advances in parasitology, 2005. 59: p. 77-158.
18. Xiao, L., et al., Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. International journal for parasitology, 2002. 32(14): p. 1773-1785.
19. Tzipori, S. and H. Ward, Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect, 2002. 4(10): p. 1047-58.
20. Ramirez, N.E., L.A. Ward, and S. Sreevatsan, A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect, 2004. 6(8): p. 773-85.
21. Leav BA, M.M., Ward HD., *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges., in Clinical Infectious Diseases. 2003, 36: 903-908.
22. A., J., Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe., in Journal of veterinary medicine. B., 2004, 51: 251-259., Infectious diseases and veterinary public health,.
23. C., E., Farklı Gruplardaki İmmün-Süprese Bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi ile Araştırılması., in Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi. 2011, Dicle Üniversitesi.
24. G., S., Temel Tıbbi Parazitoloji. 1998: 94-96., Baskı. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Sivas,; Sivas,.
25. Langer, R.C. and M.W. Riggs, *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. Infect Immun, 1999. 67(10): p. 5282-91.

26. Elliott, D.A., et al., *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization. *Infect Immun*, 2001. 69(9): p. 5940-2.
27. Fayer, R., C. Speer, and J. Dubey, The general biology of *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, R. Fayer. 1997, CRC Press, Boca Raton, Florida.
28. Current W.L., G.L., internet. [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body\\_Cryptosporidiosis\\_life\\_cycle\\_Irg.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body_Cryptosporidiosis_life_cycle_Irg.htm).
29. Starling C.R., A.M.J., "Cryptosporidia", In: *Parasitic Protozoa*,. 1993, vol. 6. Academic Press. 65, 159-224.
30. Harris JR, P.F., *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall., in *Journal of Parasitology*, . 1999, 85: 839-849.
31. Sears CL, K.B., Cryptosporidiosis and isosporiosis. In: *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. . 2001; s.139-164., John Wiley & Sons Ltd. Press.
32. Dubey JP, S.C., Fayer R. , *Cryptosporidiosis of man and animals*., in CRC Press, Boca Raton,. 1990. s. 199.
33. Erdoğan D. D. , "İnsanlarda Cryptosporidiosis dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri", in *Uzmanlık Tezi*, Ege Üniv. Tıp Fak. Sağ. Bil. Enstitüsü, . 2003;110.
34. M.A. Ö, Ö.Y., Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Baskı. İzmir, Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22, 2007: 363-376., Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. . 2007: 363-376., Baskı. İzmir, Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22,.
35. Fayer R, U.B., *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. , in *Microbiological Reviews*, . 1986, 50: 458-483.
36. M., Ç., 0-15 Yağ Grubu Ğshalli Çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve Diğer Bağırsak Parazitlerinin Görülme Sıklığı., in *Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabim Dalı. Yüksek Lisans*, . 2002., Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, .
37. Unat EK, Y.A., Atlas K, Samastı M. , in *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. . 1995: 595-600., 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, .
38. T.G., Gıda kaynaklı protozon enfeksiyonlarının insan sağlığı açısından önemi. 2005, 16: 47-55., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, .

39. Fayer R, M.U., Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. 2000, 30: 1305-1322., International Journal for Parasitology, .
40. O., K., Parazit Hastalıkları Grup Bask., Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, Toraks Derg. (2002), . Cilt 3, Ek 5.
41. Topçu A. , S.G., Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi cilt. 2, Nobel tıp Kitapevi, 2002;1919-1920.Topçu A., Söyletir G., Doganay M. . (2002) , .
42. Alpert G. , L.M.B., C. E. Kirkpatrick, L. d. Budnick, J. M. Campos, H. M. Friedman, S. A. Plotkin. , Outbreak of Cryptosporidiosis in day care center. Pediatrics 1986. 77, 152-157.
43. Özkul İA, A.G., Kutsal O. Tubitak, ;, "Bursal Cryptosporidiosis in chickens associated with marak's disease", Doğa-Tr.J. of Veterinary and Animal Sciences,. 1991. 16,1-9.
44. Harp J.A., G.J.P., "Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves", J. Dairy Sci. (1998) 81, 289-294.
45. Dogan N., A.Y., "İshalli olgularda *Cryptosporidium* oookistlerinin araştırılması", T. Parazitol. Derg. (1998) 22(3): 243-246.
46. King B.C., M.P.T., Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment, Parasitology Rev. . (2007) 134(Pt 3), 309-23,Epub 2006 Nov 13.
47. Erickson M.C., O.Y.R., Inactivation of protozoan parasites in food, water and environmental systems, J. Food Prot. Rev. (2006). 69(11), 2786-808.
48. AĞ., E., Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Kars: Kafkas Üniversitesi, . 2012.
49. P., U.B.L., Infectious Diseases and Their Etiologic Agents, volume 2, section H, in Principle and Practise of İnfectious Diseases Editors, Mandell G. L, Bennet J. E. , Dolin R, 1995;Fourth Edition, Churchill livingstone, New York. 1995.
50. S., B.R., Parasitic infections in transplant recipients, Nat. Clin. Pract. Nephrol. 2006;2(9):490-503. 2006.

51. Bonilla LC, G.N., Cano G, Raleigh X, Quijada L. , Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulia State, Venezuela, J Trop Med Hyg, 1992;47(5):582-586. 1992.
52. Spano F, C.A., *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome, Int J Parasitol, 2000; 30, 553-565. 2000.
53. Navin TR, H.A., Cryptosporidiosis in patients with AIDS, J Infect Disease, 1987;155-150. 1987.
54. U., Ö., İshalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*'un rolü ve sağlıklı populasyonda seroprevelansı, Marmara Üniv Sağlık Bil Ens, Doktora Tezi, . 1996.
55. Fındık D, Karabayraktar A. Gaita örneklerinde *Cryptosporidium* oookistlerinin araştırılması, T Parazitoloj Derg, 18(4): 415-419. 1994;.
56. Özçelik S, D.S., Sümer Z, İçağasıoğlu D, Dökmetaş İ. Gastroenteritlilerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı, T Parazitoloj Derg, 1996;20( 3): 333-337. 1996.
57. Üner A, D.N., Özbel Y, , Tappeh KH. Çocuklarda *Cryptosporidium* aranması, T Parazitoloj Derg, 1991;15(4):42-48. 1991.
58. Tanyüksel M, H.T., Gün H. Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırılması, T Parazitoloj Derg, 1995;19(1):56-63. 1995.
59. Ok ÜZ, K.M., Ok GS, Özkan AT, Ünsal A, Özcel MA. , Kronik böbrek yetmezliğinde crptosporidiosis ve blastocystosis, T Parazitoloj Derg, 1996;20(1): 41-49. 1996.
60. S., U., İshalli Dığkılarda Microsporidium Spp. ve *Cryptosporidium* Spp.'nin Saptanması PZR Yöntemi ile Tür Tayininin Yapılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ėzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi,. 2009.
61. S., K., *Cryptosporidium parvum*'un Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Üremenin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, . 2007.
62. AC., W., Cryptosporidiosis İn:Principles and Practice of Infectious Diseases. Baskı. New York, Churchill Livingstone Inc., : 3215-3228. 2005.

63. Kandil HM, B.H., Argenzio RA. , Tumour necrosis factor alpha changes porcine intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. *Gut*, 1994, 35: 934-40. 1994.
64. Robinson P, O.P., Chappell CL, Lewis DE, Shahab I, Janecki A, White AC, Jr. , Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejunum of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infection and Immunity*, 2001, 69: 1172-1174. 2001.
65. Ojcius DM, P.J., Bonnin A, Laurent F. , Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes and Infection*, 1999, 1: 1163-1168. 1999.
66. Host, M.V., cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunology*, . 2000, 22: 597-604.
67. Chai JY, G.S., Han HK, Yun CK. , Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology*, . 1999, 85: 234-239.
68. Mandel GL, B.J., Dolin R. , *Cryptosporidiosis* In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Baskin. Philadelphia, Churchill Livingstone Inc., 2005: 3215-3228.
69. Laurent F, M.D., Eckmann L, Kagnoff MF. , Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection*, . 1999, 1: 141-148.
70. Chen XM, L.N., Human intestinal and biliary cryptosporidiosis. *World Journal of Gastroenterology*, . 1999, 5: 424-429.
71. Laberge I, G.M., Griffiths MW. , Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *International Journal of Food Microbiology*, . 1996, 32: 1-26.
72. Markel EK, V.M., John DT. , *Medical Parasitology*. Baskin. Philadelphia, WB Saunders Company,. 1992: 85-88.
73. *Cryptosporidium*:, F.R., a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*,. 2004, 126: 37-56.
74. Marshall MM, N.D., Ortega Y, Sterling CR., Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiological Reviews*, . 1997, 10: 67-85.



75. parasitology., C.F.H.o.h., Clinical Microbiological Reviews, . 2002, 15: 595-612.
76. DP., C., New insights into human cryptosporidiosis. Clinical Microbiological Reviews, . 1999, 12: 554-563.
77. Garcia LA, B.D., Diagnostic Medical Parasitology, Parasitic İnfections in The Compromised Host. Baskı. Washington DC, ASM press, . 1997: 355-374.
78. D.P., C., Laboratory methods for diagnosing Cryptosporidiosis, J.Clin. Pathol. 44, 445-451. (1991).
79. Emre Z., A.M., Düzgün A., Çerçi H. , “Comparison of staining and concantration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal spesimens”, T. J. Vet. and Animal Sci. 21, 293-296. (1997).
80. 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).
81. Ok Ü.Z., G.N., Kilimcioglu A., Limoncu E., Dıskı inceleme yöntemleri, Bölüm 1, Parazit Hastalıklarında Tanı, Editörler: Özcel M.A., Altıntas N., 1. Baskı, Ege Üniv. Basımevi, izmir. (1997)
82. S.G., A., “Kayseri’de 0-5 yas grubu ishallerde *Cryptosporidium*’un araştırılması”, Dok. Tezi, Erciyes Üniv. Sağlık Bil. Enstitüsü, Kayseri, 80. (1995).
83. Leng X., M.D.A., Oberst R.D., “Simplified method for recovery and PZR detection *Cryptosporidium* DNA from bovine feces”, App. and Env. Microbiol. 62(2), 643-647. (1996)
84. Gün H., T.M., Haznedaroglu T. , “Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması”, T. Microbiol. Cem. Derg. 24, 116-119. (1997).
85. Erman N., B.A., Öz zmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda Cryptosporidiosis’in yaygınlığı”, Bornova Vet. Kontr. ve Arast. Ens. Derg. 25(39), 33-38. (2000).
86. Weber R., B.R.T., Juranek D.D. “Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal spesimens”, J. Clin. Microbiol. 30(11), 2869-2873. (1992).
87. Silva CV, F.M., Gonöalves-Pires MRF, Costa-Ruiz JM. , Detection of *Cryptosporidium*-spesific coproantigen in human immunodefficiency

virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. . , 2003;98(8):1097-1099.

88. Centers for Disease Control and Prevention, D.P.f.S., e. Specimens: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Diagnostic Procedures.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Diagnostic_Procedures.htm), and t. 17.02.2010.
89. Özcel MA, Ü.A., Ertuğ S. I, mmunofloresans Yöntemi. (Ed: Özcel M. A. , Altıntaş N.). Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği, Ege Üniv. Basımevi,İzmir, S. 215-239. 1997;.
90. Carey C.M., L.H., Trevors J.T. , “Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst”, Water Res. 38, 818-862. (2004).
91. Kehl K.S.C., C.H., Havens P.L. , Comparision of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species, J. Clin. Microbiol. 33(2), 416-418. (1995).
92. MacPherson D.W., M.R., “Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods”, J. Clin. Microbiol. 31(2), 198-202. (1993).
93. Mtombo M.M.A., N.A.S., Blewett D.A., Wright, S. , “comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocyst in cat faecal specimens”, Vet. Parasitol. 45, 49-57. (1992).
94. Özlem M.B., E.H., Kaya O. , “Aydın yöresi buzagılarında *Cryptosporidium*’ların varlığının araştırılması (1)”, Bornova Vet. Kontr. ve Arast. Enst. Md. Derg. 22(36), 15-22. (1997).
95. Morgan, U., et al., Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. J Clin Microbiol, 2000. 38(3): p. 1180-3.
96. Jenkins M.C., T.J., Abrahamsen M.S., Lancto C.A., Higgins J., Fayer R., “Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts usin reserve transcriptase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encading amyloglucidase”, J. Microbiol. Methods. 43, 97-106 (2000)

97. Boxell A, H.N., Monis P, Ryan U., Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Experimental Parasitology*, . 2008; 120(1): 67-72.
98. Choi MH, H.S., Park WY, Yu JR. , In vitro culture of *Cryptosporidium muris* in human stomach adenocarcinoma cell line. *Korean J.Parasitol.* . 2004; 42(1):27-34.
99. Coutinho BP, O.R., Vieira CM et al. , *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J. Parasitol.* . 2008; 94 (6): 1225-1232.
100. Guerrant RL, O.R., Moore SR, Oria MO, Lima AA., Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr. Rev.* 2008; 66(9): 487-505.
101. Lima NL, S.A., Mota RM, Monteiro HS, Guerrant RL, Lima AA. , Wasting and intestinal barrier function in children taking alanine-glutamine-supplemented enteral Formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* . 2007; 44 (3): 365-374.
102. DF., W., Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: results of a double-blind randomized trial, *J Infect Disease*, . 1989; 159, 1, 131-132.
103. A., A., Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *Clin Infect Disease*, . 1993; 17, 297-298.
104. C., B., Azithromycin, paromomycin and letrozol in the treatment of Cryptosporidiosis, Third European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV I-Infection, Abstract, . 1992, Paris.
105. Amadi B, M.M., Musuku J. , Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:1375.
106. Rossignol JF, A.A., Ayers MS. , Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis* 2001;184(1):103-6.

107. Mc Meeking A. , B.W., Klesius H. , Bonk S. , A controlled trial of bovine dialyzabe leukocyte extract for Cryptosporidiosis in patients with AIDS, J. Infect. Disease. 1990;161, 108-112.
108. Akısü Ç, K.M., Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed Özcel MA. Tıbbi Parazitoloji Derneği,Ege Üniversitesi,Yayın No:20. izmir, . 2005:40-41.
109. Joachim A. Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. Journal of veterinary medicine. B, I.d.a.v.p.h., 2004, 51: 251-259.
110. Dillingham RA, L.A., Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. Microbes and Infection, 2002, 4: 1059-1066.
111. Ungar BLP. Infectious Diseases and Their Etiologic Ajents. In Principle and Practise of Infectious Diseases İn: Mandel GL, B.J., Dolin R (eds). Baskı. New York, Churchill Livingstone, 1995: 2500-2510.
112. Research, W.M.A.D.o.H.E.P.f.M., I.H.S.W.M.A.J. 2013;310(20):2191-2194., and doi:10.1001/jama.2013.281053.
113. Börekçi G, O.F., Emekdaş G. Mersin'de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. Enfeksiyon Derg 2005;19(1):39-46.
114. Ramratnam B, F.T., Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. Postgraduate Medical Journal,. 1997, 73: 713-716.
115. Botero CA, M.M., Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations, Rev Inst Med Trop. Sao Paulo,2003;45:197-200.
116. Ülçay A, G.L., Coşkun Ö, Araz E , Acar A, Eyigün CP. İmmün yetmezlikli hastalarda intestinal protozoonların tanısı. Türkiye Parazitol. Derg. 2008;32(4):328-333.
117. Tanyüksel M. , H.G., and L. Doganci. 1995. Prevalance of *Cryptosporidium* sp. In patients with neoplasia and diarrhea. Scand. J. Infect. 1995;Dis 27:69-70.
118. Yıldız M, Ç.N., Kılıç S, Babür C, Öncül Ö, Esen B, 2000. İshali olan solid tümörlü hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2001;(1):1-8.

119. Sarı C, S.K., Ertuğ S, Kronik Böbrek Yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* sp. Ve *Blastocystis hominis* Sıklığının Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2003;27(3):187-190.
120. Lewthwaite P, G.G., Hart CA, Beeching NC, 2005. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. Curr Opin. Infect 2005;Dis, 18: 427-35.
121. com., C.D.N.T.A.Ü.T.F.K.B.v.i.H.A.h.w.o.
122. Chen W, H.J., Harmsen AG, Requirements for CD4 cells and gamma interferon in resolution and established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. Infect immun. 1993;61:3548-3551.
123. White AC. Cryptosporidiosis(*Cryptosporidium hominis*, C.p., other species). In:Principles and practise of infectious diseases, Mandell GL, and D.R.J.B.J.e.C.L.s.I.N.Y. :2005;3215-28.
124. Urban J, F.R., Chen S, Gause WC, Gately MK, Finkelman FD. IL 12 protect immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. J Immunol 1996;156, 263-268.
125. McDonald V, B.G., Immunology of intracellular parasitism. In:Chemical immunology and allergy. Liew FY,Cox FEG(eds). Karger , Basel, 1998;70:103-123.
126. Smith A. Reacher M, S.W.A.G., Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales,1992-2003. Epidemiol Infect. 2006;134(6):1141-9.
127. Mac Kenzie WR, H.N., Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl. J Med Sci. 1994;161-167.
128. Soave R, W.C., *Cryptosporidium* and other protozoa including isospora Sarcocystis, *Balantidium Coli* and *Blastocystis*. Principles and practise of infectious diseases. 3rd edition. Ed. Mendell G. L. ,Douglas RG Jr. ,Bennett J. E Churchill Livingstone Inc. New York 1990;2122-2130.
129. Jex AR, P.A., Campbell BE, Whipp M, Hogg G, Sinclair MI, Stevens M and Gasser RB, Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic *Cryptosporidiosis* by use of sequence-Based Multilocus Analysis

- following Mutation Scanning. Journal of Clinical Microbiology, July 2008;p,. 2252-2262.
130. Otağ F, A.G., Emekdaş G, Aydın E, Taylan Özkan A, Çeber K . Mersin ilinde, ilkokul öğrencilerinde *Cryptosporidium* sp. Ookistlerinin araştırılması. T Parazitol. Derg. 2007;31(1):17-19.
  131. Koturoğlu G, B.S., Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut ishallerde çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. T Klin J Pediatr 2004;13:1-19.
  132. Moss DM, B.S., Arrowood MJ, et al. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of a cryptosporidiosis outbreak on a United States Coast Guard cutter. Am J Trop Med Hyg 1998;58:110-8.
  133. Jayalakshmi J, A.B., Mahadevan K. Evaluation of an Enzyme- Linked İmmunoassay for the Detection of *Cryptosporidium* Antigen in Fecal Specimens of HIV/AIDS Patients. Indian J Pathol Microbiol, 2008; 51(1):137.
  134. Sönmez Tamer G, B.E., Erbay A. Lösemi ve Lenfoma Tanısı Alan Çocuklarda and C.P.T.P.D. 192-197.
  135. El Shazly AM, S.D., El-Sheikha HM, Sadek GS, Morsy AT. Correlation of ELISA Copro-Antigen and Oocysts Count to the Severity of *Cryptosporidium parvum* in Children. J Egypt Soc Parasitol, 2007; 37(1):107-20.
  136. Direkel Ş, Ö.İ., Durmaz R. İshallerde Hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemleriyle Araştırılması. Mersin Üniv. Sağlık Bilim Derg, 2008;1(1): 20-25.
  137. Bajeva UK. Acid fast staining versus ELISA for detection of *Cryptosporidium* in stool. J Commun Dis, -.
  138. Bern C, H.B., Lopez MB, Arrowood MJ. The contrasting epidemiology of cyclospora and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala. Am J Trop Med Hyg 2000;63(5-6):231-5.
  139. Dietz VJ, R.J., National surveillance for infection with *Cryptosporidium parvum* 1995-1998: what have we learned? Public Health Rep 2000;115(4):358-63.
  140. Alıcı Ö, A.E., Alıcı S. Kanser hastalarında fırsatçı enfeksiyonlar. Türk Onkoloji Dergisi 2008;23(3):153-162.