

**T.C.DİCLE ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI GRUPLARDAKİ İMMÜN-SÜPRESE  
BİREYLERDE CRYPTOSPORIDIUM'UN ELISA  
VE MODİFİYE ASİT-FAST BOYAMA  
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**HAZIRLAYAN**

**DR. CANAN EREN**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. ÖMER METE**

**DİYARBAKIR-2011**

**Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (DÜBAP) tarafından**

**09-TF-01. nolu proje ile desteklenmiştir.**

# İÇİNDEKİLER

İçindekiler .....	2
Projede görev alanlar .....	3
Tablolar Listesi .....	4
Şekiller Listesi .....	5
Resimler Listesi .....	5
1. GİRİŞ.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Parazit: <i>Cryptosporidium</i> sp.....	7
2.2. Tarihçe .....	7
2.3. Taksonomi .....	8
2.4. Morfoloji ve Evrim .....	10
2.5. Üretilebilme Özellikleri.....	14
2.6. Epidemiyoloji .....	15
2.7. Patogenesiz .....	18
2.8. Klinik Bulgular .....	19
2.9. İmmunolojik ve Antijenik Yapı .....	14
2.10. Tanı ve Yöntemler .....	21
2.11. Tedavi .....	25
2.12. Korunma.....	27
3. MATERYAL ve METOD .....	28
3.1. Gereç .....	28
3.2. Yöntem .....	28
4. BULGULAR .....	32
5. TARTIŞMA .....	41
6. SONUÇ.....	49
7. ÖZET .....	50
8. SUMMARY .....	52
9. KAYNAKLAR .....	54

## **PROJE ADI VE GÖREVLİLERİ**

Proje Adı: FARKLI GRUPLARDAKİ İMMÜN-SÜPRESE BİREYLERDE  
CRYPTOSPORIDIUM' UN ELISA VE MODİFİYE ASİT-FAST BOYAMA YÖNTEMİ İLE  
ARAŞTIRILMASI.

Proje No: 09-TF-01(DÜBAP)

Proje Yöneticisi: Prof. Dr.Ömer METE

Proje Araştırmacısı: Dr.Canan EREN

Proje Araştırmacısı: Prof Dr.Nezahat AKPOLAT

## TABLolar LİSTESİ

Tablo	Tanı	Sayfa No
Tablo 1.	<i>Cryptosporidium sp.</i> cinsine ait sınıflandırma	3
Tablo 2.	Şimdiye kadar saptanan türler, yerleştiği konaklar ve araştırmacılar	4
Tablo 3.	Ookistlerin bazı boyama yöntemlerinde görünümü	17
Tablo 4.	Çalışma gruplarındaki yaş ortalamaları ve kadın - erkek oranları	27
Tablo 5.	Çalışma grupları ve sayıları	27
Tablo 6.	Yaş aralıklarına göre Modifiye asit-fast boyama (+) hastaların dağılımı	28
Tablo 7.	Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile <i>Cryptosporidium spp.</i> Ookisti görülen olguların grup dağılımı.	29
Tablo 8.	Çalışma gruplarına göre <i>Cryptosporidium spp.</i> ELISA Pozitif-negatif dağılımı	30
Tablo 9.	ELISA yöntemi ile <i>Cryptosporidium spp.</i> antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı	31
Tablo 10.	Asit-fast boyama yöntemi ile ile ELISA Sonuçlarının karşılaştırılması	31
Tablo 11.	Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile ELISA Sonuçlarının karşılaştırılması.	32
Tablo 12.	Kontrol grubu ile diğer gruplardaki ELISA (+) hastaların istatistiksel karşılaştırılması	32
Tablo 13.	<i>Cryptosporidium spp.</i> ve diğer parazitlerin dağılımı.	33
Tablo 14.	Birden fazla parazitin saptandığı hasta grubu ve parazitler	33
Tablo 15.	<i>Cryptosporidium spp.</i> saptanan hastalara ait klinik ve laboratuvar bulguları.	35-36
Tablo 16.	Türkiye'de çeşitli yörelerden saptanan <i>Cryptosporidiosis</i> prevalansı	37

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	<i>Cryptosporidium parvum</i> 'un biyolojisi	5
<b>Şekil 2.</b>	<i>Cryptosporidium</i> 'un yaşam döngüsü çukuoovada	8
<b>Şekil 3.</b>	Yaşam döngüsünün evreleri	8
<b>Şekil 4.</b>	<i>Cryptosporidium</i> 'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri	9

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 1.	<i>Cryptosporidium Sp.</i> Ookistlerinin modifiye asit-fast boyamadaki görünümü (nadir ookist görünümü).	28
Resim 2.	<i>Cryptosporidium Sp.</i> Ookistlerinin modifiye asit-fast boyamadaki görünümü (yoğun ookist görünümü).	29
Resim 3.	ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü	30

## 1. GİRİŞ

Paraziter hastalıkların dünyadaki yaygınlığı ülkelerin coğrafi özellikleri, iklim koşulları, toplumun kültürel, ekonomik ve sosyal yapısı ile yakından ilgilidir. Gastrointestinal parazit enfeksiyonları özellikle sosyoekonomik seviyesi düşük ülkelerde su, besin, vektör ve kirli eşya aracılığıyla fekal-oral yoldan bulaşabilmekte ve enteritlere neden olmaktadır. Çocuklarda ve çeşitli sebeplerden dolayı immun yetmezliği olan hastalarda bağırsak parazitlerine karşı olan duyarlılık artarak, kronik ve ağır seyreden enfeksiyonlar meydana gelmektedir.

Gastroenterit etkenlerinden birisi, özellikle çocuklarda ve immunitesi yetersiz hastalarda etkili olan *Cryptosporidium* cinsi protozoonlardır. *Cryptosporidium* enfeksiyonuna çocuklar, beslenme yetersizliği olanlar ve immun sistemi baskılanmış kişiler daha duyarlıdır. Enfeksiyon *Cryptosporidium* ookistlerini içeren dışkıyla kontamine su ve besinlerin ağız yoluyla alınması veya enfekte havuz, göl ve ırmak sularında yüzme aracılığıyla bulaşmaktadır. *Cryptosporidium* enfeksiyonunun klinik belirtileri konağın immun sisteminin durumuna bağlı olarak değişmektedir. İmmun sistemi baskılanmış kişilerde günde yirmi litreye varabilen kolera benzeri ishale neden olup, yaşamı tehdit eden bir tablo oluşturabilmektedir (1,2).

1982 yılına kadar daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış grubun enfeksiyonu olarak bilinen cryptosporidiosis özellikle laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle bağışıklık sistemi sağlam toplumlarda da salgınlara yol açtığı saptanmıştır. Her geçen yıl gerek bağışıklık sistemi baskılanmış olguların sayısındaki artış gerekse bağışıklık sistemi sağlam kişilerde de salgınlara saptanması, cryptosporidiosis önemini artırmaktadır (3).

Bu çalışmada, Diyarbakır, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na; risk grubundaki immunsuprese hastalardan (Onkoloji ve diyaliz hastaları, malnütrisyonlu çocuklar) ve ishal şikâyeti nedeniyle, farklı yaş grubundaki non immunsuprese hastalardan gönderilen dışkılarda, *Cryptosporidium* sp. antijenleri ELISA yöntemiyle araştırılmış ve modifiye asit-fast boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri aranmıştır. Çalışmada hastanemizde, özellikle immunsuprese bireylerde başta olmak üzere, cryptosporidiosis ile ilgili verileri elde etmeyi ayrıca tanıda ELISA ve asit-fast boyama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüğünü değerlendirmeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. CRYPTOSPORIDIUM

*Cryptosporidium* , coccidian bir protozoon olup, 2-6 µm çapında, zorunlu hücre içi parazitidir. Bu protozoon omurgalıların sindirim ve solunum yolu epitel hücrelerinin mikrovillus bölgelerini infekte ederek hastalığa sebep olur (4).

Parazitin; memeli omurgalılarından, kuşlardan, sürüngenlerden ve balıkların değişik türlerinden 20 kadar türü izole edilmiştir. Son yıllarda AIDS’li hastalarda yaygın olarak tespit edilmesiyle birlikte *Cryptosporidium*’un insan sağlığı açısından önemi ortaya konmaya başlamıştır. İnsanlardan ve birçok memelilerden izole edilen tür *Cryptosporidium parvum*’dur (5,6).

### 2. 2. TARİHÇE

*Cryptosporidium* ilk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilerek “ fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri” şeklinde tarif edilmiş ve bundan yaklaşık 12 yıl sonra 1907 yılında Tyzzer tanımlamış ve 1910 yılında *Cryptosporidium muris* adı ile hem cinsi hem de türünü tarif etmiş ve evrimini açıklamıştır. 1912’de *Cryptosporidium parvum*’u bildirmiştir. Önceden bilinen coccidia parazitlerinin aksine ookistlerin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistlerin olmaması nedeni ile *Cryptosporidium* (gizli sporokistler) olarak isimlendirilmiştir (3,5,7,8).

1976 yılında *Cryptosporidium* ile ilgili ilk insan olgusu bildirilmiştir. gastroenteritli 3 yaşındaki bir kızda ve daha sonra da immun sistemi baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide görülmüş olup, bu olgu bir çiftlikte yaşayan hayvanlarda saptanan enfeksiyonla aynı zamanda ortaya çıkmıştır. Bu nedenle cryptosporidiosis’in bir zoonoz olabileceği düşünülmüştür. 1981-1982 yıllarında ise AIDS’li hastalarda *Cryptosporidium* sp. enfeksiyonları saptanmış ve şiddetli enterite neden olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerde görülen uzun süreli, sıklıkla bol sulu dışkı, zayıflama gibi belirtiler enfeksiyonun fırsatçı patojen olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki yıllarda yayımlanan araştırmalarda hayvan bakıcılarında, turistlerde ve bağışıklık sistemi sağlam kişilerde de salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (3,5,9-14).

### 2. 3. TAKSONOMİ

*Cryptosporidium*, Apikomplexa şubesinin bir üyesi olan Cryptosporididae ailesine aittir. Son zamanlardaki filogenetik çalışmalar *Cryptosporidium*'un coccidiyandan ziyade gregarinlere daha yakın olduğunu göstermektedir (15). *Cryptosporidium*, Sporozoa sınıfı, Coccidia alt sınıfı, Eucoccidia takımı, Eimerina alt takımı, Cryptosporidiidae ailesi mensubu bir protozoondur (16). *Cryptosporidium* 'un tablo halindeki sınıflandırması aşağıda görülmektedir.

**Tablo1.** *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma ve biyolojik özellikleri (17,18).

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik özellikleri
Alem	Animalia	
Şube	Protista	Ökaryotik, tek hücreli canlı
Alt Şube	Apicomplexa	Veziküler bir çekirdeğe sahip olup tüm türleri parazittir.
Sınıf	Sporozoa	Ookist oluşturma, seksüel ve aseksüel üreme özellikleri vardır.
Alt sınıf	Coccidia	Biyolojileri merogoni, gametogoni ve sporogoni şeklindedir. Seksüel faz hücre içinde gerçekleşir.
Takım	Eucoccidia	Merogoni vertebralı konakta geçer.
Alt takım	Eimeriina	Makro ve mikro gamet oluşumu farklıdır. Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet gelişir. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet gelişir. Zigot hareketsiz olup konoid mevcuttur.
Aile	Cryptosporididae	Konak süreci hücrenin yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez, çıplak 4 sporozoiti vardır. Mikrogametleri flajella taşımaz.
Cins	<i>Cryptosporidium</i>	

*Cryptosporidium* sporozoa sınıfından olmasına rağmen, farklı birçok özelliği göze çarpmaktadır. Bu farklılıklar içerisinde en önemlisi parazitin spesifik konak ve doku özelliğinin bulunmamasıdır. Bu özelliklerinden dolayı araştırmacılar arasında, *Cryptosporidium* 'un sınıflandırılmasında ve tür sayısında anlaşmazlıklar söz konusu



olmuştur. Fakat son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda, farklı hayvanlarda değişik *Cryptosporidium* türlerinin varlığından söz edilmektedir(18,19).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium*'un 20 farklı türünün olduğu anlaşılmıştır. Tablo 2' de bu türler belirtilmiştir (20). Bu türler arasında balıklarda *C. nasorum*, kuşlarda *C. meleagridis* ve *C. haileyi*, reptillerde *C. serpentis* ve memelilerde *C. parvum* ve *C. muris* en tanınmış olanlarıdır (21).

**Tablo 2.** Şimdiye kadar saptanan *Cryptosporidium* türleri, yerleştiği konaklar ve araştırmacılar (20).

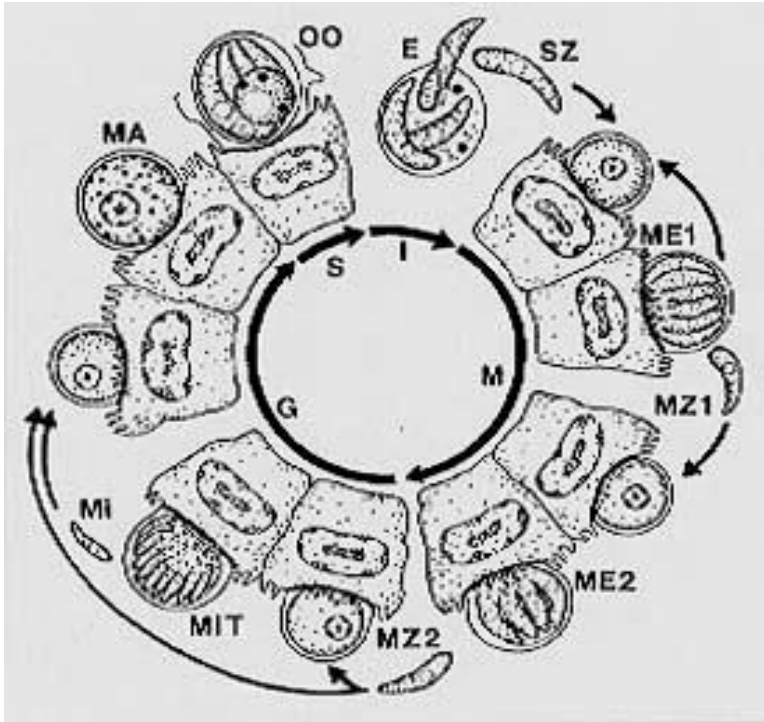
<b>Tür</b>	<b>Konak</b>	<b>Araştırmacı –tarih</b>
<i>C. muris</i>	Fare	Tyzzzer, 1907
<i>C. parvum</i>	Fare, İnsan	Tyzzzer, 1912
<i>C. crotali</i>	Yılan	Triffit, 1925
<i>C. vulpis</i>	Fox	Wetzel, 1938
<i>C. meleagridis</i>	Hindi	Slavin, 1955
<i>C. wrairi</i>	Domuz	Vatterling Jervis, Merrill, Sprinz, 1961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

## 2. 4. MORFOLOJİ VE EVRİM

*Cryptosporidium*' un gelişmesi, mide ve bağırsak mukoza epiteli hücrelerinin fırça kenarları içinde olur. Yerleşim yeri nedeniyle diğer hücre içi parazitlerden ayrılır. Çünkü, onlar hücrenin sitoplazması içinde yerleşirken, *Cryptosporidium* hücrenin ekzositoplazmik alanında yerleşir ve birbirini izleyen eşeyli ve eşeysiz üremeye çoğalır. Yaşam döngüsünü tek bir konakta tamamlar. Parazitin yerleştiği ve konak hücre orjinli bölgeye parazitofor vaküol denir (3,22).

*Cryptosporidium* türlerinin yapısı, evrim şekillerine göre değişmektedir. Bunun evriminde merogoni, gametogoni, döllenme, ookistli duvar oluşumu, sporogoni ve sporozoitlerin bağırsakta serbest kalması (ekskistasyon) gibi altı farklı olay vardır (3,5,7). Bu evreler şekil 1' de görülmektedir.

Şekil 1. *Cryptosporidium parvum*' un biyolojisi (23).



Kısaltmalar: (E) Eksitasyon (kalın duvarlı ookistlerin çevreden alınması veya bağırsak boşluğundaki ince duvarlı ookistlerin içindeki sporozoitlerin serbest kalması); (G) Gamogoni; (I) İnfektif dönem; (M) Merogoni; (ME1) 8 merozoit içeren Tip-I meront; (ME2) 4 merozoit içeren Tip-II meront; (MA) Makrogamet; (Mi) Mikrogamet; (MiT) Kamçısız 16 mikrogamet içeren mikrogametosit; (MZ1) Tip-I merozoit; (MZ2) Tip-II merozoit; (OO) ookist; (S) Sporogoni; (SZ) Sporozoit.

### **Eksitasyon (Kistlerin açılması):**

Etkenin dışı ile dışarı atılan formu, sporlanmış ve enfektivite kazanmış ookist formlarıdır. Dışkıyla dışarı atılan bu ookistler, 2-6 µm çapında, kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde dört sporozoit, bir çok küçük tanecikler ve zara bağlı kürecikler yer alır. Ookistler yiyecek, içecek veya bazı diğer çevresel etmenler aracılığıyla oral yoldan, konjunktiva aracılığıyla veya inhale edilerek alınabilmektedirler (17,24).

Sindirim yoluyla konak hücre tarafından alınan ookistlerin normal şartlarda ince bağırsakta açılması "eksitasyon" olarak da adlandırılır. Kist açılımında rol oynayan faktörler arasında pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik indirgeyici etmenler sayılabilirler. Oral yoldan alınan ookistler uygun konakların sindirim yolunda açılır ve sporozoitler serbest hale geçer (25-27).

### **Merogoni Dönemi:**

Serbest kalan sporozoitler konağın epitel hücreleri (enterosit) içine girmektedirler. Bu hücrelerin mikrovillus bölgesinde parazitofor vakuoller içinde trofozoitlere (tek nükleuslu merontlara) dönüşmekte ve daha sonra eşeysiz olarak (merogoni) çoğalarak Tip 1 merontları oluşturmaktadırlar. Tip 1 merontlar 6-8 çekirdeklidir ve her birinden 6-8 merozoit oluşur. Bu merozoitler yeni hücrelere girerek tekrar eşeysiz çoğalama ile Tip 1 merontları veya Tip2 merontları oluşturmaktadırlar (3,5,11,16).

### **Gametogoni:**

Şizogoni sonucunda Tip II merontların içinde oluşan 4 merozoit ve hücre parçalanınca serbest hale geçen bu merozoitler yeni bir döngü oluşturmazlar. Fakat bu merozoitler konak içinde yeni hücrelere girdiklerinde mikro veya makro gametositlere, daha sonra da makro ve mikrogametlere dönüşür (2). Her bir mikrogamonttan 16 tane mikrogamet ve her bir makrogamonttan ise yalnızca bir makrogamet meydana gelir (25,30,31).

### **Fertilizasyon:**

Yaşam siklusunun dördüncü evresinde barsak lumeninde serbest olarak bulunan 0. 4-0. 5 µm büyüklüğünde ve ince yapılı mikrogametlerden birisi, 2-6 µm büyüklüğündeki makrogameti döller ve zigot oluşur (4, 30).

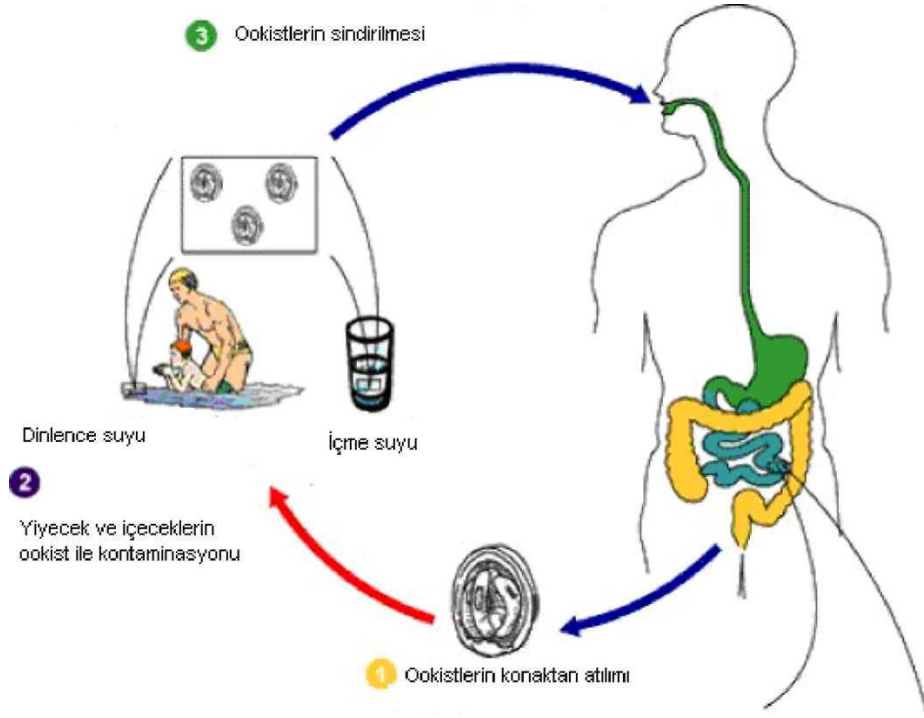
### **Ookist duvarının oluşumu:**

Zigotun etrafı iki veya üç farklı tabakanın birleşmesinden meydana gelen ookist duvarıyla çevrilir (20). *Cryptosporidium*'un ookist duvarı kimyasal ve mekanik etkilere karşı dirençlidir. Ookistin elektron mikroskopunda fark edilebilen en büyük özelliklerinden birisi, ookist duvarı üzerinde ookistin yarısını veya üçte birini kuşatan şerit şeklinde bir yapının varlığıdır. İnce bağırsaklarda sporozoitler bu yapıdan dışarı çıkar. Ookistin içerisinde sporokistler bulunmaz, sadece dört sporozoit bulunur (18,32). Duvarın dış tabakası asidik özellikte glikoprotein filamentleriyle kaplıdır. Orta kısımda mikobakteriyel lipidler ve balmumu benzeri sert yapılı kompleks lipit tabakası içerir. İç tabakası ise yine glikoproteinlerden oluşmuştur. Hücre duvarında yüksek oranda lipid olması, karbol fuksin ile boyandıktan sonra asit-alkol dekolorizasyon işleminden etkilenmemesini sağlar (32).

### **Sporogoni:**

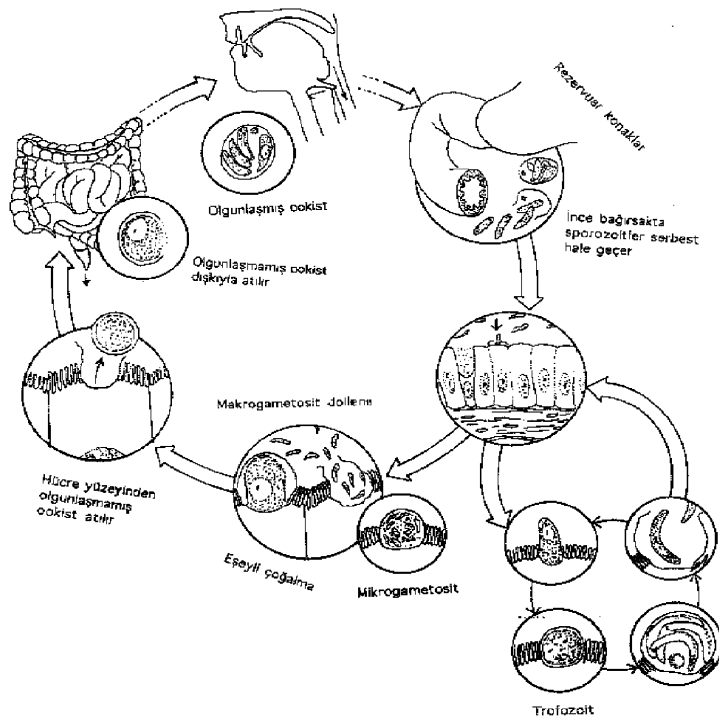
Bu dönemde konak hücrede olgunlaşan ookistlerin içinde sporlanma ile enfektif sporozoitler meydana gelir. *C. parvum* 'un eşeyli üremesi sonucunda 2 farklı tip ookist oluşumu gözlenir. Oluşan ookistlerin yaklaşık %80'i kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlı bir yapı gösterir (2,17,26). İnce çeperli ookistler içinde 4 sporozoit yer alır. Bu ookistler konak vücudu dışına çıkmadan, bağırsak boşluğuna atılıp bağırsak içinde açılırlar. İçlerinde bulunan sporozoitler serbest kalarak yeni epitel hücrelerine girerler ve konakta enfeksiyonun devamından sorumludurlar. Bu tip bulaş şekli yuvarlak solucanlardan *Strongyloides stercoralis*'in evriminde görülen duruma benzetilerek "iç oto enfeksiyon" adını almıştır (28,29,33).

Kalın çeperli yapıya sahip 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışı ile dışarıya atılırlar ve konaklar arası bulaşmada rol oynarlar. Bu tip ookistler hem dış oto enfeksiyon yoluyla, hem kişilerarası direk temasla, hem de bulaşlı yiyecek içeceklerle ağızdan alınırlar ve bu şekilde parazitoz insanlararası bulaşma gösterir. Yani bulaşma fekal-oral yolla, ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir. Bu kistler çevre ve iklim koşullarına uzun süre dayanıklı yapıdadır (24,34-36).

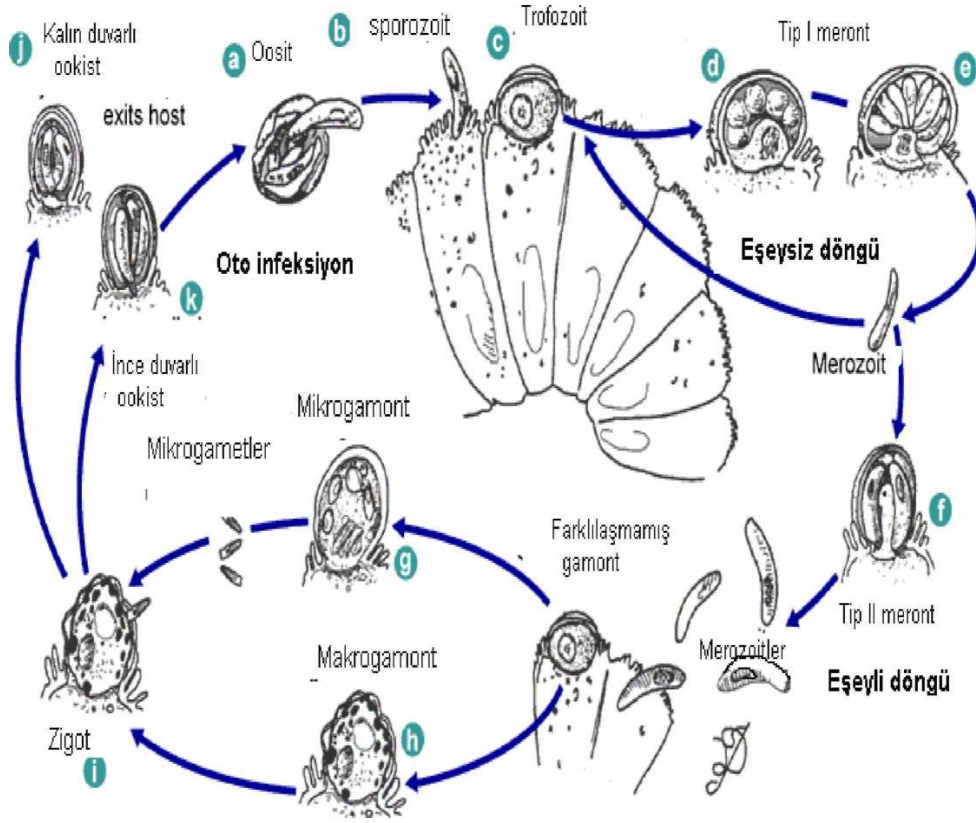


Şekil 2: *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü (37).

9



Şekil 3. Yaşam döngüsünün evreleri (28).



Sekil 4. *Cryptosporidium*'a ait vasam döngüsünde ookistlerin gelişim (38).

## 2. 5. ÜRETİLEBİLME ÖZELLİKLERİ:

*Cryptosporidium*'un tıbbi alanda öneminin artışın paralel olarak, çeşitli invivo ve invitro ortamlarda üretilme çalışmalarına ağırlık verilmiştir. Ookist ve sporozoitlerin bazı incelemeler için kemirgenlerde üretilmesine rağmen, büyük çoğunlukla deney hayvanları, buzağı ve kuzulardır. *Cryptosporidium* deneysel olarak tavuk, hindi, domuz yavruları, fare, rat, köpek, kuzu, oğlak ve buzağılarda üretilmiştir. Genellikle yeni doğmuş ve kolostrum almamış buzağılar; deneysel infeksiyonlar, etken izolasyonu ve bulaştırma deneyleri için en uygun konaktır. İnfekte buzağılar, insan infeksiyonlarında en büyük role sahiptir (18,39). Ookist saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi, *C. parvum* 'un hücre kültüründe de üretilmesine olanak sağlamıştır, fakat çok sayıda organizma elde edilmemiştir (35).

Üretilen hücreler arasında domuz ve tavuk böbrek hücreleri, sığır üreme epitel hücreleri, insan fütal akciğer hücreleri yer alır ve bunlar içerisinde en uygun olanı insan fütal akciğer hücreleridir. Hücre kültüründen izole edilen ookistlerin sayısı, tavuk embriyon korio-allantoik membranından ve süt emen farelerin bağırsaklarından izole edilen ookistlerden daha az miktardadır. Ookistlerin hücre kültüründe daha az üreme göstermesi, otoenfektif ookistlerin bu sistemde iyi gelişmemiş olmasına bağlanmıştır (39,40).

## 2. 6. EPİDEMİYOLOJİ

*Cryptosporidium* hayvanlardan insana bulaşan dünyada yaygın bir hastalıktır. Enfekte hayvan ve insanların dışkıyla atılan dirençli ookistlerle bulaşma olur. İnsana bulaşmada evcil hayvanların ve besi hayvanlarının, özellikle buzağuların dışkısının rolü büyüktür (28,29,33). İnsandan insana da bulaşma olmaktadır. İnsanlararası kontaminasyon fekal-oral veya anal-oral yolla olabilmektedir. Özellikle çocuk bakım evlerinde ve hastanelerde ortaya çıkan salgınlar insandan insana bulaşın önemini kanıtlayan en önemli olaylar arasında yer alır. Günümüzde *Cryptosporidium* bir turist hastalığı etkeni olarak da bilinir (41-47).

Su kaynaklı epidemiler de görülmektedir. Su kaynaklı epidemilere neden olarak; parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, klora dirençli olması, içme suyu süzgeçlerinden geçebilmesi ve çok az sayıda parazitin bile enfeksiyona neden olabilmesi ile gösterilmektedir. Sessiz enfeksiyonlular ve hastalık bittikten sonra hala ookist saçanlar bulaştırıcıdır. Bu parazitoza çocukların, erişkinlerden; anne sütü ile beslenmeyenlerin, anne sütü ile beslenenlerden daha sık yakalandıkları saptanmıştır. Ayrıca, ookistlerle kontamine olan çiğ süt, immun sistemin yetersizliği, yaş, meslek, beslenme bozukluğu ve enfekte kişilerle yakın temas, risk faktörlerini oluşturmaktadır. İnfeksiyon yaz ve sonbaharda daha sık görülmektedir (5,6,7,48).

Erişkinlerde *Cryptosporidium* görülme oranı, çocuklara göre daha düşüktür. Çocukluk yaş grubu içerisinde ise dört yaş altındaki ve özellikle de iki yaş altındaki çocuklarda daha sık görülür (49,50).

*Cryptosporidium* ookistlerinin özellikle nemli hava ve sıcaklıkla beraber doğada konsantrasyon artışına paralel olarak, *Cryptosporidium* enfeksiyonları da artış göstermektedir. Ookistlerin yağışlarla beraber seferber olabileceği ve iklim değişikliği durumlarında, karada ya da su çevrelerinde taşınması ya da inaktivasyonundaki seyrin devam edeceği düşünülmektedir. Bazı bilim adamları cryptosporidiosis'in özellikle ılık ve ıslak mevsimlerin hastalığı olduğunu belirtmişlerdir. Mevsimlerin bol yağış alması, parazitin içme sularına ve diğer bazı gıdalara bulaşma riskini artırmaktadır. Türkiye'de ise insanlarda cryptosporidiosis'in bahar aylarında yükselerek, Eylül ve Ekim aylarında en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (17,18,40,51,52).

Yiyecek, içecek ve çevresel sistemlerde protozoon parazitlerinden olan *Cryptosporidium*'un inaktivasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Soğutma, ısıtma, filtrasyon, çöktürme, UV ışığı, ışınlama, yüksek basınç ve ses dalgalarını içeren bu fiziksel yöntemlerin parazitin infektivitesini etkilediği bildirilmektedir (53). Bulaşmaya yol açan

ookistler günümüzde kullanılan pek çok dezenfektana, soğuğa, sığağa ve neme dirençli olup, %10'luk formolde veya %50 derişik amonyak gibi kimyasal solüsyonlarda 30 dakika içinde, ayrıca 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda veya -20°C sıcaklıkta 30 dakika bekletmekle inaktive olurlar (54).

Yapılan çalışmalar, *Cryptosporidium* ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7. 0'de iki saat içinde öldüğünü göstermiştir. Yine su dezenfeksiyonu için diğer bir popüler işlem olan ozonlamanın, *Cryptosporidium* ookistleri üzerine etkisi araştırılmış, infektivitelerinin 1 ppm konsantrasyonda 10 dakika sonra ortadan kalktığı görülmüştür. *Cryptosporidium* ookistleri aynı koşullarda, Giardia kistlerine göre ozona 30 kat, klora ise 14 kat daha fazla dirençli olduğu saptanmıştır (55). *Cryptosporidium* ookistlerinin filtrasyondan geçebilme, klor ve diğer dezenfektanlara karşı dirençli olma özellikleri vardır. Bundan dolayı günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve salgın şeklindeki cryptosporidiosis vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından kaynaklandığı bildirilmiştir (25). ABD'de bir kaynak suyundan 400. 000 kişi enfekte olmuştur. Su kaynaklı epidemi nedenleri arasında; parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, klora dirençli olması ve çok az sayıda parazitin dahi enfeksiyona neden olabilmesi gösterilmektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve cryptosporidiosis vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından salgın şeklinde geliştiği bildirilmiştir (25, 29).

*Cryptosporidium* infeksiyonları, altı kıta üzerinde 60'tan daha çok ülkede teşhis edilmiştir. Yapılan çalışmalarda prevalansın az gelişmiş ülkelere daha yüksek olduğu görülmüştür. Kuzey Amerika ve Avrupa gibi ülkelere oran %1-3 iken, daha az gelişmiş Asya'da %5, Afrika'da ise %10 olarak bildirilmiştir (25). Ayrıca son yıllarda *C. parvum*'un organ nakli alıcılarında hastalık sebebi olduğu bildirilmiş olup, bunun çevresel şartlardan kazanılabileceği düşünölmüştür (56). *Cryptosporidium* infeksiyonları için risk faktörleri řu şekilde sıralanabilir: İçme suyunun hijyenik olmaması, yetersiz kanalizasyon sistemleri gibi kötü hijyenik koşullar, hayvancılıkla uğraşma, veteriner hekimlik ve laboratuvar faaliyetleri gibi mesleğe ait faktörler, immun sistem yetmezliği, epidemik bölgelere yolculuk, infekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama, yetersiz beslenme, 0-4 yaş ve 60 yaş üstü olma gibi yaş faktörü bu hastalık için risk faktörlerini oluşturur (25,49,57).

Farklı coğrafi bölgelerde yapılan bazı araştırmalar sonucunda prevalansla ilgili olarak; Finlandiya'da 154 erişkin hastanın %9. 1'inde (58), İngiltere'de bir eğitim



hastanesinde 2197 hastanın %0. 5'inde parazit bulunmuş ve sadece risk gruplarında bakılması tavsiye edilmiştir. Yine İngiltere'de gastrointestinal sistem yakınması olan 867 hastanın %5'inde cryptosporidiosis tanısı konmuş, 5 yaşın altındaki çocuklarda bu oranın %7 olduğu bildirilmiştir (59).

Brezilya'da semptomatik 117 hastanın %8'inde infeksiyon saptanmıştır (60). Venezüella'da ise 2 yaşın altındaki akut diyareli çocuklarda infeksiyonun %10. 8 oranında olduğu saptanmıştır (61). Bangladeş'de yapılan bir araştırmada (62), semptomatik 578 hastanın %4. 3'ünde infeksiyon etkenleri görülmüştür. Hindistan'da akut diyareli 682 vakanın %13. 1'inde infeksiyon saptanmıştır (63). Liberya'da 6-9 aylık yaş grubundaki 374 çocuk diyarelilerde %8. 4, asemptomatiklerde %5. 9 oranlarında bulunmuş, infeksiyon oranı 2.5 yaşın altında ve biberonla beslenen çocuklarda yüksek, anne sütü ile beslenenlerde ise düşük düzeylerde saptandığı bildirilmektedir (64). AIDS'li hastalarda parazitin prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda; ABD'de 9182 AIDS hastasının %3. 6'sında cryptosporidiosis tanısı konulmuş, AIDS'li 174 çocukta bu oran %5. 1 olarak bulunmuştur (65). Küba'da dışkıları incelenen 67 AIDS'li hastanın %11. 9'unda, Zambia'da dışkıları incelenen 63 AIDS'li hastanın %32'sinde, Zaire'de AIDS'li ve kronik diyareli 106 hastanın %21'inde, Brezilya'da AIDS'li 131 hastanın %19. 1'inde (54) ve Venezüella'da 29 AIDS'li hastanın %41. 3'ünde (49) cryptosporidiosis saptanmıştır.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda değişik oranlar tespit edilmiştir. Adana'da ishalleri çocuklarda %8. 20, normal çocuklarda %4. 08 olarak bulunmuştur (5). Mersin'de dört ilköğretim okulunda, yaşları 8-12 olan çocuklardan toplanan 72 dışkı örneğinin 4'ünde (%5. 5) *Cryptosporidium* oocistleri görülmüştür. Yine Elazığ'da yapılan bir çalışmada, 0-5 yaş grubu immün yetmezliği olmayan 417 ishalleri olgu ele alınmış ve 19'unda (%4. 55) *Cryptosporidium* oocistleri saptanmıştır (18). Konya'da yapılan bir araştırmada 250 kişiye ait dışkı örneğinin %1. 6'sında (66), Sivas'da yapılan bir araştırmada 110 kişiye ait dışkı örneğinin %11. 8'inde *Cryptosporidium* oocistlerine rastlanılmıştır (50). İzmir'de 0-6 yaş grubu 600 çocuk üzerinde yapılan araştırmada ise, hastaların sadece %0. 1'inde etken görülmüştür (67). Ankara Onkoloji Hastanesi'nde 106 neoplastik hasta üzerinde yapılan çalışmada %16. 9 oranında oocistlere rastlanmıştır (68). İzmir'de Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hemodiyaliz Ünitesinde yapılan bir çalışmada, böbrek yetmezliği olan 46 hastanın %30. 4'ünde oocist saptanmıştır (69). Eskişehir'de 0-6 yaş grubu ishalleri 607 çocuğa ait dışkı örnekleri incelenmiş ve %3. 6'sında pozitif bulunmuştur (40).

## 2. 7. PATOGENEZ

*Cryptosporidium*' un meydana getirdiği cryptosporidiosis, bir zoonoz hastalıktır. Parazit bağırsak epitel hücrelerini tutmakta ve en çok jejunumda yerleşmektedir. Ancak, bazı hastalarda *Cryptosporidium*; yutak, mide ve kalın bağırsakta da gösterilmiştir. Otuzdan az sayıda ookistin bile sağlıklı gönüllülerde enfeksiyona neden olduğu bulunmuş olup, ortalama infeksiyöz doz 132 ookisttir. Kript ve villöz yapıda histolojik bozukluklar ortaya çıkar. Villöz atrofi, kriplerin uzaması ve lamina propria da tek çekirdekli hücre birikimi görülür. Solunum sistemini de tutabilmektedir (6,8,70,71). Etkenin özellikle immün yetmezliği olan şahıslarda hepatobiliyer sistemde, solunum sisteminde ve pankreas kanalında da hastalık oluşturabileceği saptanmıştır (25). Parazitten enterotoksin salgılanmasının etkili olabileceği düşünülmüştür. Zarar gören absorpsiyon yüzeyinin büyüklüğüne bağlı olarak B<sub>12</sub> vitamini, yağ ve D-xylose malabsorpsiyonu gelişebilmektedir (72). *Cryptosporidium* enfeksiyonunda mukozal bariyer bozukluğu olmakta ve bunun sonucunda da makro moleküllerin permabilitesi artmaktadır. Artan permabiliteye bağlı olarak barsak epitelinde bulunan iyonlar ve su tekrar barsak lumenine atılmakta ve lumen içi sıvı miktarında artış olmaktadır. Bazı olgularda kolera ve diğer enterotoksijenik mikroorganizmalarda görülen ishale benzer şekilde bol miktarda sulu ishal tablosu gelişmektedir (20,72,73).

## 2. 8. İMMUNOLOJİK ÖZELLİKLER

*Cryptosporidium* ile enfekte kişilerin serumlarında IgG, IgM ve IgA tipi antikorlar bulunur. Hem T hücre anormallikleri hem de gama-globülin eksikliklerini içeren, çeşitli immün yetmezlikleri olan hastalarda, uzamış ve daha ciddi enfeksiyonlar vardır. Özellikle AIDS'li hastalarda CD4+ hücre sayısı immün sistemin mukozal yüzeyinde *Cryptosporidium* enfeksiyonunu temizleme yeteneği için en iyi göstergedir. CD4+ hücre sayısı 180 hücre/mm<sup>3</sup>'ten yüksek olan kişilerde enfeksiyon spontan temizlenebilirken, 180'den az olanlarda %87 oranında persistan hastalık oluşur. CD4+ hücre sayısının 50 hücre/mm<sup>3</sup>'ün altında olduğu durumlarda ölüm riski vardır (8,70). Yaşlı hayvanların, gençlere oranla, cryptosporidiosis'a dirençli olduğu bilinmekte ve bu durumun önceden geçirilen enfeksiyonun verdiği bağışıklıkla ilgili olduğu, fakat yaşlanma sonucu bu direncin de gelişebildiği bildirilmektedir. Kazanılmış immünite, reenfeksiyonu önleyebilir ve primer enfeksiyonu sınırlar ama koruma mekanizması tam olarak anlaşılabilmiştir (5,7,70,74).

*Cryptosporidium parvum* ile süt emen fare, keme, pamuk kemesi, kobay ve hamsterlerde ağızdan ookist verilince ağır enfeksiyon olduğu halde bu hayvanların erişkinlerinde ya enfeksiyon yerleşmemekte veya hafif bir kriptosporidyoz olmaktadır. Timüssüz süt emen farelerde, *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonu sürgüne neden olmakta ve ölünceye kadar ookist saçtıkları halde normal kardeşleri sürgüne tutulmakta ve ancak 21-30 gün ookist çıkarmaktadırlar. Bu durum insanda da vardır. AIDS olgularında enfeksiyon süregen ve öldürücü mide-bağırsak, karaciğer ve solunum yolu hastalığına neden olduğu halde bağışık yanıtı normal olanlarda hastalık 1-2 hafta sürmektedir. Ayrıca, normal T lenfositli, fakat hipogamaglobülinemililerde de öldürücü enfeksiyon gelişebilmektedir. Bundan dolayı hastalıktan iyileşmede bağırsakta A ve G immunoglobulinleri ve hücre aracılığıyla olan bağışıklığın ortaklaşa etkisi kabul edilmektedir (7).

## 2. 9. KLİNİK BULGULAR VE TANI

Hasta insanlarda en sık rastlanan klinik görünüm enterik cryptosporidiosis' dur. Ayrıca immun sistemi baskılanmış hastalarda *Cryptosporidium parvum*'a bağlı kolesistit veya solunum sistemi enfeksiyonlar olabilir. Belirtisiz enfeksiyon da bildirilmiştir (70). Ookistlerin oral yoldan alınmasıyla hastalığa ait klinik belirtilerin ortaya çıkma süresinin 7-10 gün olabileceği belirtilmiştir. Etkenin her yaştaki insanları infekte edebileceği saptanmıştır. Hastalığın hem immun direnci sağlam, hem de immun direnci baskılanmış hastalarda en önemli klinik belirtisinin ishal olduğu gözlenmiştir. Dışkının karakteristik olarak, bol miktarda çıkarıldığı, sulu nitelikte olduğu, bazen mukus ihtiva ettiği ancak; dışkıda kan ve lökosit görülmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte abdominal ağrı, bulantı, kusma, vücut sıcaklığında hafif bir artış, kas ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi belirtilerin olduğu görülmüştür. Bu semptomların süresi ve klinik seyirin tamamen konağın bağışıklık durumu ve atılan ookist miktarı ile paralellik gösterdiği bildirilmektedir (20,34,75,77).

Cryptosporidiosisli AIDS hastalarının %10' unda kolesistit ortaya çıkar. cryptosporidia kolesistiti şimdiye kadar sadece AIDS'li hastalarda tanımlanmıştır. Hastalarda ateş, sağ üst kadranda ağrısı, ishal ile birlikte veya ishal olmaksızın bulantı ve kusma vardır. Solunum sisteminde ise, devamlı öksürük, nefes darlığı, bronş ve akciğer yangısı olarak kendini belli eder. Solunum sistemi bulgusu, *Cryptosporidium parvum*'un ishalleri ile doğrudan ilişkilendirilememiştir (7,70).

İmmün sistemi sağlam hastalarda cryptosporidiosis genellikle iki hafta süren ve kendi kendine iyileşen diyare ile karakterizedir. Bununla birlikte görülen diğer semptomların ağrı, iştahsızlık, ateş, bulantı ve zayıflama olduğu belirtilmiştir (20,75). Hastalar genellikle hastaneye yatırılma gereksinimi olmadan ayakta tedavi edilebilirler. Ancak uzun süren ishal durumunda çocuklarda dehidrasyon çok belirgin olup, malnütrisyon tablosu da gelişebildiğinden hastaneye yatırılma ihtiyacı olmaktadır. Aynı zamanda çeşitli nedenlerle oluşan malnütrisyon, kişilerin direncini zayıflattığından bu tür hastaların *Cryptosporidium* infeksiyonlarına daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. (76).

*Cryptosporidium*, immun sistemi zayıf kişilerde şiddetli semptomlarla seyreden intestinal bir patojen olarak kabul edilir. Hastanın kliniği, şahıstaki immun supresyonun tipi ve derecesi ile yakından ilgilidir. İshal orta şiddette gelişip kısa sürebildiği gibi, şiddetli belirtilerle aylarca da sürebilir (77). Cryptosporidiosis; AIDS, kızamık gibi bazı viral hastalıklar, gammaglobulinlerin düştüğü hastalıklar, kemik iliği hastalıkları, insüline bağlı diyabet hastaları, böbrek yetmezliği olan hastalar, karaciğer nakli olan hastalar, lösemi ve diğer kanser tedavisi uygulanan hastalarda şiddetli semptomlar oluşturur. CD<sub>4</sub> hücre sayısı >180 hücre/ml AIDS’li kişiler cryptosporidiosis’i nispeten hafif geçirirken, bu sayının altında olanlarda kronikleşme izlendiği ve hastalığın inatçı bir hal aldığı bildirilmiştir. Böyle şahıslarda hastalık ağırdır, sulu ishal haftalarca hatta aylarca devam eder. Sıvı kaybı oldukça fazla olup, günde 3-6 litre arasında, hatta bazı hastalarda günde 17 litreye kadar çıkabilir. Bu hastalarda dehidrasyon, kilo kaybı, ateş, kramp benzeri karın ağrısı ve bulantı gibi semptomların daha belirgin görüleceği bildirilmiştir (20,25,75).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda *Cryptosporidium* infeksiyonunun safra yollarını, pankreas kanalını ve solunum sistemini infekte edebileceği bildirilmiştir (25,75). Solunum sisteminin infekte olduğu durumlarda kısa soluk, hırıltılı nefes, ses kısıklılığı, öksürük gibi belirtiler görülür. Radyolojik belirtiler spesifik değildir. Bronşlarda infiltrasyon, asit ve pankreatitisin gelişebildiği belirtilmiştir. Ayrıca alkalen fosfataz, serum amilaz ve bilirubin değerlerinin yükseldiği saptanmıştır. Etkenin tükürükte, trakea aspirasyonunda, bronkoalveolar lavaj sıvısında ve akciğer biopsisinde teşhis edilebileceği bildirilmiştir (25,78). Safra kesesi infeksiyonu ilk olarak 1981 yılında AIDS’li bir hastada bildirilmiş olup, AIDS’li hastalardaki safra kesesi ve safra kanalı yangılarının çoğunun *Cryptosporidium*’a bağlı olarak oluştuğu ifade edilmiştir (20,25).

## **2. 10. TANI YÖNTEMLERİ**

Tanı için aşağıdaki yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **1. DİREKT MİKROSKOPİ**

- a. **Modifiye Asit-Fast boyama**
- b. **Giemsa boyama**

### **2. SEROLOJİK YÖNTEMLER**

- a. **IFA:**Immuno Floressans Antikor Testi
- b. **ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay Testi
- c. **Hızlı Immunokromatografik Yöntemler**

### **3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

- a. **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR/ PCR)**

### **4. KÜLTÜR YÖNTEMLERİ**

### **5. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

#### **2. 10. 1. DİREKT MİKROSKOPİ:**

*Cryptosporidium* sp. infeksiyonunun tanısı çoğunlukla dışkı örneklerinde ookistlerin tanımlanmasıyla yapılmaktadır. Ayrıca balgam, duodenum sıvısı ve bağırsak biyopsi örneklerinde de araştırılmaktadır. Dışkı taze iken veya %10 formalin veya polivynil alkol ile tesbit edildikten sonra incelenmelidir. Ookistler, modifiye çinko sülfat santrifüj veya Sheather's şeker yüzdürme yöntemleriyle yoğunlaştırılıp faz kontrast mikroskobu ile incelenebilmektedir. Boyama yöntemleri kullanılarak tanısı konabilmektedir (6,9,70).

Direkt mikroskopik incelemede *Cryptosporidium* ookistleri mayalarla benzerlik gösterdiğinden boyasız preparatlarda tanımak güçtür. Bu yüzden bazı boya yöntemlerinin kullanılması gerekir. Bu yöntemler arasında modifiye asit fast sıcak boyama yöntemi, Kinyoun'un asit fast soğuk boyama yöntemi, Auramin-rhodamine, Acridine orange, Giemsa ve safranin boyama yöntemleri sayılabilir (79) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Ookistlerin bazı boyama yöntemlerinde görünümü (79).

Boyama Yöntemi	Ookist	Maya
Modifiye asit fast sıcak	parlak kırmızı	mavi-yeşil
Kinyoun asit fast soğuk	kırmızı-mor	mavi-yeşil
Giemsa	Eflatun	eflatun
Acridine orange	yeşil-sarı	kırmızı-turuncu
Auramin-Rhodamin	portakal rengi	görülmez

Dışkının makroskopik bakışı hastalıkta şüphe uyandırıcı nitelikte olsa bile cryptosporidiosis'e spesifik önemli bir görünüm söz konusu değildir. Dışkıda kan olması hastalık için çok ender bir bulgu olup, bu durumun genellikle parazitle birlikte saptanan bir başka enteropatojen ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. İrin için de benzeri şeyler söylenebilir. Cryptosporidiosis ishallerinde mukusa sık olarak rastlanabilmekte ve inceleme amaçlı alınan örneğin mukuslu kısımlarından seçilmesinin daha uygun olabileceği belirtilmektedir (80,81).

Acridine orange (AO) boyama yöntemi dışkıdaki ookistlerin tanısında kullanılabilen duyarlı bir metottur. AO ile boyanıp pozitif bulunan örnekler aynı preparat üzerinde asit fast boyası yapılarak teyit edilebilir. AO boyasıyla mantarlar kırmızı turuncu boyanırken, ookistler sarı yeşil boyanır. Bir diğer boyama yöntemi olan auramin-rhodamin (AR) boyası hücre duvarındaki mikolik aside affinite gösteren bir boyadır. Zıt boya olarak potasyum permanganat kullanılır. Bazı sporozoon parazitleri de içine alacak şekilde birçok aside dirençli mikroorganizma AR ile iyi boyanır. Bu yöntemde *Cryptosporidium* ookistleri kırmızı zemin üzerinde parlak sarı renkte görülür ve bu şekilde usulüne uygun olarak boyanan ve karakteristik rengini alan ookistler maya ve mantarlarla karıştırılmazlar (82,83).

Toplanan dışkılar kısa zamanda inceleme imkanı yoksa, %10'luk formol, %2. 5'lik potasyum dikromat  $KCr_2O_7$  sodyum asetoasetik asit-formol (SAF) solüsyonları içinde taze olarak saklanabilmektedir (24). %2. 5'lik  $KCr_2O_7$  solüsyonu içerisinde +4 °C'de saklanan ookistlerin önemli bir kısmının 3 aydan uzun bir süre canlı kalabildikleri ifade edilmektedir. Ayrıca solüsyonlar içinde saklanan ookistlerin, 12 aydan fazla bir süre DNA ekstrasyonu amacı ile kullanılabilmesi bildirilmiştir. Ancak %2.5'lik  $KCr_2O_7$  solüsyonunda saklanan ve daima canlılığını kaybetmeyen ookistlerin enfeksiyon riski taşımaları sebebiyle, çalışmalar süresince dikkatli olunması gerekmektedir. Toplanan

dışkuların %10 formol solüsyonunda ise +4 °C'de veya -30 °C'de uzun süre saklanabilmeleri mümkündür (24,26,84-86).

Ookistler, hacim ve morfolojik olarak maya hücreleri, fungal ve küf sporları ve yağ globüllerine benzer. Bu yapıları ookistlerden ayırmak amacıyla güvenilir, spesifik ve tanısal değeri en yüksek olan metot asit fast boyalarıdır (79,83,87). Bu boyama yöntemleri hem taze dışkılara hem de %2.5 potasyum dikromat veya %10'luk formol eklenerek oda ısısında saklanan dışkılara uygulanabilir. Asit fast boyalarının uygulanmasının kolay olması, saklanmış dışkuları boyaması, ucuz olması, kırmızı boyanan ookistleri mavi zemin üzerinde kolay bir şekilde göstermesi, ookistlerin iç yapısını ayrıntılı göstermesi ve kalıcı bir boya olması nedeni ile *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde kullanılması uygun bulunmuştur (87,88).

Modifiye Ziehl Neelsen boyama tekniği ile boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yeşil zemin üstünde, kırmızı-pembe bir renkte gözlenebilmektedir. Bu boyalarla boyanan preparat incelemelerinde ookistin seçilemeyen kısmı, etkenin yüzeyine göre daha koyu boyanırken, mantar sporları, bakteriler, fekal kalıntılar ve diğer asit fast özellik taşımayan yapılar mavi renkte görülürler (89,90).

**Modifiye Asit-Fast Boyama:** Örnekler modifiye asit-fast yöntemiyle boyanabilmektedir. Bu boya ile ookistler, kırmızı boyanırken dışkıdaki mayalar yeşil renkte boyanırlar. Karşıt boya olarak metilen mavisi kullanılırsa, *Cryptosporidium* ookistleri kırmızı, mayalar mavi renkte boyanır (6,9).

**Giemsa Boyama:** *Cryptosporidium*, havada kurutulduktan ve metanolde tesbit edildikten sonra, giemsa boyası ile boyanan dışkı preparatında da aranabilir. Giemsa boyama yöntemi, uygulama kolaylığı olan ve hazırlanan preparatların uzun süre saklanabildiği bir yöntemdir. Ancak bu teknikle boyanan preparatlarda renk kontrastı oldukça zayıf olduğundan, ookist yapılarını dışkıda rastlanabilen spordan ve diğer mikroorganizmalardan ayırırken zorluklar yaşanmaktadır (68).

## 2. 10. 2. SEROLOJİK YÖNTEMLER

Western-blot, Latex aglütinasyon, Revers Pasif Hemaglutinasyon, IFA ve ELISA yöntemleri *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde serolojik tanı yöntemleri olarak kullanılabilir (91-92).

IFA yönteminde, ookist yapısında bulunan antijenik yapılara, floresan boya ile işaretli monoklonal antikoların bağlanması prensibi baz alınmaktadır (93). Bu yöntem diğer protozoon, helmint ve enterik bakterilerle çapraz reaksiyon vermemesi ve parazitinin

az sayıda ookist içeren dışkı örneklerinde bile teşhis edilebilmesi noktasında önemlidir. Dolayısıyla IFA yöntemi hastalığın erken döneminde tanı konulmasında ve asemptomatik taşıyıcıların belirlenmesinde spesifik bir yöntemdir. IFA testinin özgüllüğü yüksek olup, asit-fast tekniklerinden daha duyarlı özelliktedir. Ancak pahalı bir teknik olması ve uygulanması için floresan mikroskoba gereksinimin olması testin dezavantajları arasında sayılabilir (17,18,94,95). Floresan boyama teknikleriyle boyanan preparatların floresan mikroskobunda x100 objektif taramasında, ookistler siyah zemin üzerinde sferik, yuvarlak-oval yapıda ve boyaya göre sarımsı elma yeşili veya turuncu renkte kolaylıkla fark edilebilirler. Ancak ookistlerin çoğunun yeteri kadar boya almaması ve yapısının bozulmuş olması gibi nedenlerle iç yapının seçilememesi ve tekniğin kalite kontrolünün zorluğu yöntemin dezavantajlarından (96,97).

ELISA, dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. ELISA testinin duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %100'dür. ELISA, hem hızlı hem de kolay uygulanabilir. Fakat günümüz teknolojisini gerektirdiğinden ve masraflı olması testin dezavantajlarıdır (87).

Serolojik tanı yöntemi olarak 1980'den sonra kullanılmaya başlanan ELISA yöntemi, bir hemaglutinasyon plağı çukuru içinde oluşturulan antijen antikor kompleksi üzerine, enzim ile işaretli anti insan IgG, IgM ve diğer antikorların konması ve substratın eklenmesiyle pozitif olgularda renk oluşmasının gözlenmesi esasına dayanan ve parazit hastalıklarının tanısında güvenilir bir yöntemdir. ELISA diğer bazı yöntemlere nazaran hem hızlı, hem de kolay uygulanabilir bir yöntemdir(95,98).

### **2. 10. 3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

Moleküler tanı yöntemlerinden Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizinden de *Cryptosporidium* tanısında faydalanılır. PCR, *Cryptosporidium* türlerinin klinik ve subklinik olgularda ve çevresel kaynaklarda gösterilmesi amacıyla günümüzde kullanılan bir yöntemdir. PCR sayesinde numunede bulunan bir ookist bile saptanabilmektedir.

Bunun için immun sistemi baskılanmış hastalar, yüksek riskli kişiler veya hayvanlardan ookist ile kontamine olmuş dışkı örnekleri seçilir. Bu örneklerden ookistler temizlenir ve onların DNA' ları elde edilir. Bu DNA'lar, PCR analizi ile RNA' nın 18s'lik gen bölgesindeki *Cryptosporidium* türlerini tanımlamak için kullanılır. PCR tanıyı doğrulamak ve tür ayrımı yapılabilmesi için bir basamak olarak son yıllarda giderek daha fazla kullanılan bir yöntem olmuştur (17,70,99). Genel olarak PCR laboratuvarında deneyimli elemanlara gereksinim duyulan bir yöntemdir. Dışkıdan etkenin teşhisinde PCR'ı rutin bir



şekilde kullanabilmek için kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması ve numuneden ookistlerin titizlikle izole edilmesi gerekmektedir (36).

#### **2. 10. 4. KÜLTÜR YÖNTEMLERİ**

*Cryptosporidium*'un konak hücre ortamındaki gelişimi ilk olarak 2004 yılında tanımlanmıştır. Bu da *Cryptosporidium* araştırmalarında birçok görüşü kolaylaştırabilecek önemli bir adım olmuştur. Mevcut konak hücre kültürlerinde parazitin tüm evrim dönemlerini görmek mümkündür; ancak çok küçük boyutlarda olduğu için yapısının tanımlanması zordur. Kültürler, 37 °C'de ve %5'lik karbondioksitli ortamda inkübasyona bırakılır ve 48 veya 72 saat sonra alınır (100).

#### **2.10.5. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

1980 öncesinde kullanılan tek tanı yöntemi, bağırsaklardan biyopsi alınarak mikrovillusların kenarında küçük ve yuvarlak ookistlerin gösterilmesiydi. Bu yöntemle biopsi örnekleri hemotoksilen ve eozin gibi boyalarla boyanarak çeşitli gelişim safhasındaki *Cryptosporidium*'lar gösterilebilirse de identifikasyon için yeterli değildir (20,83). Bununla birlikte hem invaziv girişim gerekmesi, hem de alınan parça için hızlı fikzasyona ihtiyaç duyulması, pahalı ve yapılması için uzun zamana gereksinim duyulması nedeniyle günümüzde pek kullanılmamaktadır (20).

#### **2. 11. TEDAVİ**

Bağışıklığı sağlam ve geçici olarak baskılanmış bireylerde enfeksiyon genellikle ağır seyretmemekte ve tedavi uygulanmasına gerek kalmadan 1-2 hafta içinde kendiliğinden geçmektedir. Ancak bağışıklığı baskılanmış hastalarda ve özellikle AIDS'te ilaç tedavisine gereksinim duyulacak kadar ağır seyredebilmektedir (101). Hastalığa ait uygun bir kültür ortamının olmamasından dolayı parazitin biyokimyasal ve metabolik özellikleri üzerinde fazla çalışılmamış ve sonuçta cryptosporidiosis için hastalığın etkisini geçiren, ookistleri öldüren güvenilir bir ilaç bulunamamıştır. İmmunitesi yeterli bireylerde diyarenin genelde 20 günden az sürmesi, klinik belirtilerin ve ookist atılımının kendiliğinden ortadan kalkması nedeni ile bu tür hastalarda uygulanabilecek etkili bir tedavi yolunun bulunması üzerinde fazla durulmamıştır. Bu durumda tedavinin en önemli kısmı nonspesifik antidiyareiklerle birlikte sıvı ve elektrolit desteğiyle sağlanmaktadır (25,29).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda daha fazla oranda sıvı, elektrolit, kalori, yağ, karbonhidrat ve aminoasit replasmanı yanı sıra ilaç tedavisine de başlanmalıdır. İmmunsuprese ilaç uygulanan hastalarda (kanser, transplantasyon) bu tedavilere ara verilmelidir. Özellikle AIDS'li hastalarda CD4 hücre sayısı 180/mm<sup>3</sup>'ün altına düştüğünde criptosporidiosis yaşamı tehdit edebilmektedir. Bu gibi durumlarda criptosporidiosis için tedavi uygulanmadan önce antiretroviral tedavilerle CD4 sayısının yükseltilmesi gereklidir (102).

İnfeksiyonun sağaltımında günümüze dek pek çok ilaç denenmiştir. Bunların arasında en çok denenilen ilaç spiramisin'dir. Wittenberg ve ark. (103), *Cryptosporidium* saptanan bebeklere spiramisin vererek atılan dışkı hacminin önemli ölçüde azaldığını, ancak yan etkileri nedeniyle ilacın kesilmesiyle ookist atılımının tekrar arttığını bildirmişlerdir. Parazitin tedavisinde kullanılan bir diğer ilaç, aminoglikozid grubu antibiyotik olan paromomisin'dir. Cryptosporidiosis'e yakalanmış 5 AIDS 'li hastaya paromomisin verilmesiyle birlikte hastalardaki ishalin ve diğer belirtilerin azaldığı belirtilmiş ve 3-6 ay sonra hastalardaki belirtilerin tekrar nüksettiği bildirilmiştir (104). Bir başka makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin, *Cryptosporidium*'la enfekte AIDS'li hastalara günde 1 gr olarak iki dozda 2-4 hafta boyunca verildiğinde hastaların dışkılama sıklığı ve miktarında azalmaya sebep olduğu, ayrıca hastaların ookist çıkarmaya devam ettiği belirtilmiştir (105).

Protozoa, helmint ve bakterilere karşı etkili olan, geniş spektrumlu thiazolid grubu nitazoksanid (NTZ) cryptosporidiosis tedavisinde denenmiş, üç gün boyunca günde 2 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 (107).

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 (108).

*C. parvum* enfeksiyonunda ishalin süresi ve şiddetinin konağın immunitesi ile yakından ilişkisi olduğu anlaşılınca, cryptosporidiosis'in sağaltımı için immunolojik yöntemler denenmeye başlanmıştır. Bazı olgularda immün sistemi baskılayan ilaçların kesilmesinden bir süre sonra enfeksiyonun tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu amaçla cryptosporidiosis'li yedi AIDS hastasına *C. parvum* ile bağışıklanmış buzağı lenf düğümü hücrelerinden hazırlanan lökosit ekstresi oral olarak verildiğinde, hastaların

altısında kilo artışı ve barsak hareketlerinde azalma saptanmış ve beşinde dışkıyla ookist çıkarımı durmuştur (109).

Özet olarak, özellikle İmmun supresif hasta grubunda temelde kullanılabilen ilaçlar şunlardır: İmmun sistemi düzenleyiciler (İnterlökin 2, bovin transfer faktör, hiperimmün kolostrum), antimikrobikler (paramomisin, spiramisin, nitazoksanid, roksitromisin, letrazuril, azitromycin, lasalocid, maduramycin, aprinocid) ve antidiyareikler (morfin sülfat, somatostatin analogları, difenoksilat) tedavi amaçlı kullanılabilir (102).

## 2. 12. KORUNMA

Korunmada, insan ve hayvan dışkılarından ve bunlarla enfekte olan toprak, su ve yiyeceklerden sakınılmalıdır. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında öncelikle ookistlerin çevreye yayılmasının önlenmesi gerekir. Parazit ookistleri uzun süre dış ortamda canlılıklarını devam ettirirler ve dışarıda 4°C'de 2-6 ay canlı kalabilirler. Çevre koşullarına ve dezenfeksiyona oldukça dayanıklı yapı gösterirler. Dolayısıyla ookistleri -20°C'de 72 saat dondurma, 45-55°C'de 20 dakika ısıtma işlemleri, ookistin enfeksiyon yeteneğini azaltır veya yok eder. Parazit ookistlerine uygulanan dezenfeksiyon işleminde, dezenfektan maddenin çeşidi ile hazırlanan solüsyonun konsantrasyonu ve ookistlerle temas süresi önemlidir. Ookistlerin dezenfeksiyonunda en çok önerilen dezenfektan, sodyum hipokloridin % 2. 5'lik solüsyonudur. Ayrıca %5'lik amonyum ve % 10'luk formol solüsyonunda 4°C'de 18 saat tutulduğunda ookistlerin enfeksiyon yeteneğinin kaybolduğu gözlenmiştir (20,24,25).

Hijyen koşullarını düzeltilmesi, en çok insandan insana bulaşmayı, aynı zamanda hayvandan insana bulaşmayı azaltmaktadır; çünkü ev içi bulaşma ikincil olguların %50'sinden sorumludur. Tuvaleti kullandıktan sonra ve ishalleri hayvanlara dokunduktan sonra eller iyice yıkanmalıdır. İshalleri kişiler herhangi bir eğlence suyuna girmemelidir. Kontamine olmuş suların yutulmasından kaçınılmalıdır. Yüzme havuzları güvenlik için sürekli kontrol edilmelidir. Uluslararası seyahat sırasında yiyecek ve içeceklerin güvenilirliğine dikkat edilmelidir. Besinler iyi pişirilmeli ve sular klorlandıktan sonra kullanılmalıdır. İmmun sistemi baskılanmış kişilerin enfeksiyona yakalanma riskini azaltmak için içme sularını kaynatmaları önerilir. Riskli cinsel ilişkiden kaçınılmalı veya önlem alınmalıdır (37,70).

## 3. MATERYAL VE METOD

### 3. 1. MATERYALLER

Çalışmamızda; onkoloji (n=156), diyaliz (n=98) ve malnütrüsyonlu çocuklardan (n=21) oluşan toplam 275 immünsüprese hasta ve non-immünsüprese ancak gastroenterit şikayeti ile laboratuvarımıza gönderilen gastroenteroloji hastaları (n=22) ve pediatri hastaları (n=178) olmak üzere 200 hastadan alınan dışkı örnekleri çalışıldı. Ayrıca farklı kliniklerden gönderilen, ishal şikayeti olmayan non-immünsüprese 55 hasta dışkı örneği kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma örnekleri 1 Ocak-31 Mayıs 2010 tarihleri arasında toplandı.

Dört farklı yaş grubundan oluşan toplam 530 hastadan alınan dışkı örnekleri çalışıldı. Çalışmada, 1. grup 0-5 yaş , 2. grup 6-15 yaş ,3. grup 16-40 yaş, 4. grup 40 yaş üstü kişilerden oluşturuldu.

Hastalar hakkında gerekli bilgiler (kimlik ve klinik bilgiler) alındıktan sonra dışkı örnekleri ağız kapaklı kaplara alındı. Mikrobiyoloji laboratuvarına getirildi. Direkt mikroskopi ve boyama için preparatlar hazırlandıktan sonra, kalan dışkı örnekleri ELISA çalışılması için ependorf tüplerinde, -20°C'de saklamaya alındı.

### 3. 2. METOD

Bekletilmeden her dışkı örneğinden;

1-Makroskobik inceleme (renk, koku, kıvam, kan, mukus)

2- Fizyolojik tuzlu su ve lugol kullanılarak lam lamel arası preparat yapılarak parazitolojik olarak incelendi.

3-Yayma preparat hazırlanarak havada kurutuldu, alev ile tespit edildi, modifiye asit-fast boyası ile boyandı.

Toplanan örneklerin önce nativ-lugol preparatı hazırlanarak direkt mikroskobik incelemeleri yapıldı. Direkt mikroskobik incelemede protozoon trofozoit ve kistleri ile helmint yumurtaları araştırıldı. Her bir dışkı örneğinden ikişer preparat hazırlanarak toplam 1060 preparat modifiye asit-fast boyama yöntemi ile boyandı ve *Cryptosporidium* ookistleri açısından incelendi.

## **Modifiye asit fast sıcak boyama yöntemi (75,88).**

### **Kullanılan maddeler**

Bazik fuksin, %95'lik etil alkol, fenol kristali, konsantre hidroklorik asit, metilen mavisi.

### **Solüsyonların Hazırlanması**

#### **1. Karbol fuksin**

- a. 3. 15 gr bazik fuksin, 100 ml %95'lik etil alkol içinde eritildi.
- b. Fenol kristalleri 56°C'lik su banyosunda eritildi. 45 ml erimiş fenole toplam hacim 900 ml olana kadar distile su eklendi.

Fuksin alkol karışımı fenol solüsyonuyla karıştırılarak 1-2 gün bekletildi. Solüsyon süzülüp kullanılmak üzere renkli şişelerde saklandı.

2. Renk giderme solüsyonu: 1ml Hidroklorik asit içine dikkatli ve yavaş bir şekilde 99 ml Etil alkol ilave edildi(%1'lik HCl).
3. Karşıt boya Löffler'in alkali metilen mavisi: 0,3 gr Metilen mavisi 30 ml etil alkol içinde eritildi. Eritildikten sonra 100 ml distile su ilave edildi.

### **Dışkı preparatlarının Modifiye Asit-Fast sıcak boyama yöntemi ile boyanması**

1. Taze dışkı örneğinden elde edilen yayma preparatlar hazırlanıp havada kurutulduktan sonra, lamalar alevden yavaşça geçirilerek fikse edildi ve soğumaya bırakıldı.
2. Üzerine karbol fuksin dökülerek kaynatılmadan hafif duman çıkana kadar 5 dakika ısıtıldı.
3. Su ile yıkanıp fazla boyalar döküldükten sonra %1'lik asit-alkol lamalar üzerine dökülerek 1 dakika tutuldu renksizleştirme işlemi yapıldı.
4. Su ile yıkandıktan sonra, metilen mavisi dökülerek 1 dakika bekletildi.
5. Tekrar su ile yıkandıktan sonra oda ısısında kurumaya bırakıldı.

**Değerlendirme:** Her preparat, X100'lük büyütme ile tarandı. Mavi zemin üzerindeki koyu kırmızı renge boyanan, içinde birden fazla sayıda siyah ve muntazam olmayan granüller bulunan ve -6 µm çapında yuvarlak-oval yapılar *Cryptosporidium* ookisti olarak değerlendirildi. Mavi-yeşil boyanan ve ookistlerden daha büyük yapılar ise mantar olarak değerlendirildi.

## **ELISA testi**

Örneklerin değerlendirilmesinde *Cryptosporidium* sp. antijenlerini belirlemeye yönelik Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti (OXOID, LOT 885970) kullanıldı. ELISA çalışması üretici firmanın önerdiği biçimde uygulandı.

**Örneğin Hazırlanması:** Çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanan dışkı örnekleri oda ısısına getirildi. Bir ependorf tüpü içerisine yaklaşık 1:4 (1gr veya pirinç büyüklüğünde dışkı örneğine 3 ml dilüsyon solüsyonu ) oranında olacak şekilde yeterli miktarda dilüsyon solüsyonu ilave edildi ve vortekslenerek üstte toplanan sıvı kısım ELISA testi için kullanıldı.

**Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması (Wash Buffer):** 120X10 sulandırılarak kullanıldı. 9 kısım distile suya 1 kısım yıkama solüsyonu eklenerek sulandırılmış yıkama solüsyonu elde edildi.

### **Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti çalışma prosedürü:**

1. Her tüpe 1ml (1000 µl) numune sulandırma solüsyonundan (SDB) ilave edildi ve içine bir pirinç tanesi büyüklüğünde gaita eklenerek sert bir şekilde karıştırıldı.
2. Birinci kuyucuğa 4 damla pozitif kontrol solüsyonu eklendi.
3. İkinci kuyucuğa 4 damla negatif kontrol solüsyonu eklendi.
4. Diğer kuyucuklara dilüe edilmiş gaita numunelerinden 200 µl ilave edildi.
5. Platelerin üzeri örtüldü ve 20-25 °C'de 60 dk inkübe edildi.
6. Her kuyucuk için 350-400 µl yıkama solüsyonu kullanılarak 3 kez yıkama yapıldı. Kağıt havlu üzerine plateletleri vurarak yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
7. Her kuyucuğa 4 damla enzim konjugat ilave edildi.
8. Platelerin üzeri tekrar örtülüp 20-25 °C'de 30 dk inkübe edildi.
9. Her kuyucuk için 350-400 µl yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkama yapıldı. Kağıt havlu üzerine plateleri vurarak içindeki yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
10. Her kuyucuğa 4 damla substrate eklendi.
11. Platelerin üzeri örtüldü, 20-25 °C'de 10 dk inkübe edildi.
12. Her kuyucuğa 1 damla stop solüsyonu eklendi, hafifçe sallandı.
13. Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti çalışma prosedürüne göre pozitif ve negatif kontrol kullanılarak çalışılan örneklerin bulunduğu plak ELISA okuyucusunda (TECAN SUNRISE) 450 nm dalga boyunda okutuldu.

### **Sonuçların Yorumlanması:**

**Pozitif Kontrol:** Sarı renkli olmalı ve optimal density (O. D)  $\geq 0.300$ (450 nm de) olmalı.

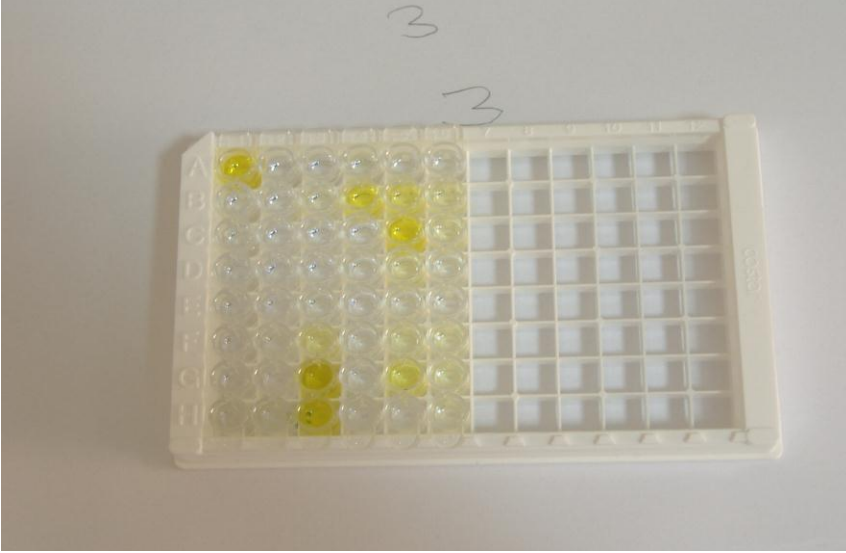
**Negatif kontrol:** Renksiz olmalı ve optimal density(OD)  $\leq 0.100$ (450nm de)olmalı

**Pozitif Numune:**  $OD \geq 0.050$

**Negatif Numune:**  $OD \leq 0.050$

Ayrıca ELISA test pozitifliği renk değişimi ile de görülmekteydi (Resim 1).

**Resim 1:** ELISA plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünümü.



### **İstatistiksel Analiz:**

Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistik değerleri için ortalama ve standart sapma kullanıldı. Kesikli değişkenler, frekans ve oranlarla verildi. Modifiye asit-fast boyama ve ELISA yöntemlerinin duyarlılıkları, özgüllükleri, pozitif ve negatif prediktif değerleri ve testlerin toplam duyarlılık oranları istatistiksel değerlendirmede hesaplanarak gösterildi. Çapraz tablo değerlendirmelerinde Yates Düzeltmeli Khi-Kare testi kullanıldı. Hipotez çift yönlü olup  $p \leq 0.05$  olduğunda anlamlı farklılık kabul edildi. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 15.0 for Windows paket program kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Çalışma gruplarının kadın-erkek oranları ve yaş ortalamaları Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4:** Çalışma gruplarındaki yaş ortalamaları ve kadın - erkek oranları.

Yaş aralığı	Kadın	Erkek	Toplam
0-5	81	94	175
6-15	54	65	119
16-40	36	31	67
40 yaş üstü	83	86	169
<b>Toplam</b>	<b>254</b>	<b>276</b>	<b>530</b>

Çalışmada yer alan hastaların yaş ortalaması  $39.97 \pm 24.42$  (min:1, max: 76) idi. 530 hastanın 254'ü immün süprese, 21'i malnütrisyonlu olmak üzere 199'u ishali pediatrik hasta, 22'si gastroenteroloji hastası ve 55'i de ishali olmayan, non immünsüprese bireylerden oluşmaktaydı. Çalışma grupları, sayıları ve yaş aralıkları tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5:** Çalışma grupları, sayıları ve yaş aralıkları.

Grup	n	Yaş aralıkları
Onkoloji	156	18-76
Diyaliz	98	20-76
Gastroenteroloji	22	16-76
Pediyatri	178	0-15
Malnütrisyonlu çocuk	21	2-15
Kontrol	55	1-70
<b>Toplam</b>	<b>530</b>	



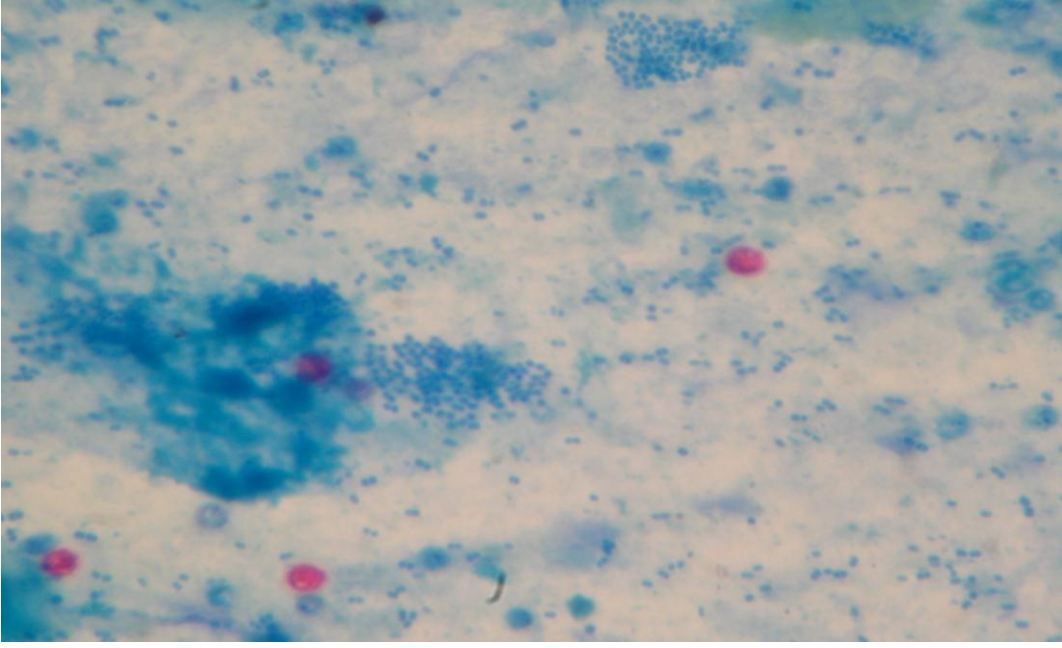
Çalışmada, toplam 530 dışkı örneğinin 17'sinde (%3.2) modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* sp. ookistleri saptandı. Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile pozitif saptanan 17 örneğin hasta gruplarına ve yaş aralıklarına göre dağılımı Tablo 6'da görülmektedir. Buna göre en fazla *Cryptosporidium* sp. ookistleri immün süprese bireylerde tespit edilmiştir(12/17 (%70.5)).

**Tablo 6:** Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* sp. ookisti görülen olguların grup ve yaş aralığına göre dağılımı.

Modifiye –Asit Fast Boyama (+)		
Hasta Grubu	Yaş aralığı	n (%)
Onkoloji	18-76	8 (1,5)
Diyaliz	20-76	4 (0,7)
Gastroenteroloji	16-76	2(0.3)
Pediyatri	0-15	3 (0,5)
Malnütrüsyonlu çocuk	-	-
Kontrol	-	-
<b>Toplam (n=530)</b>		<b>17 (3,2)</b>

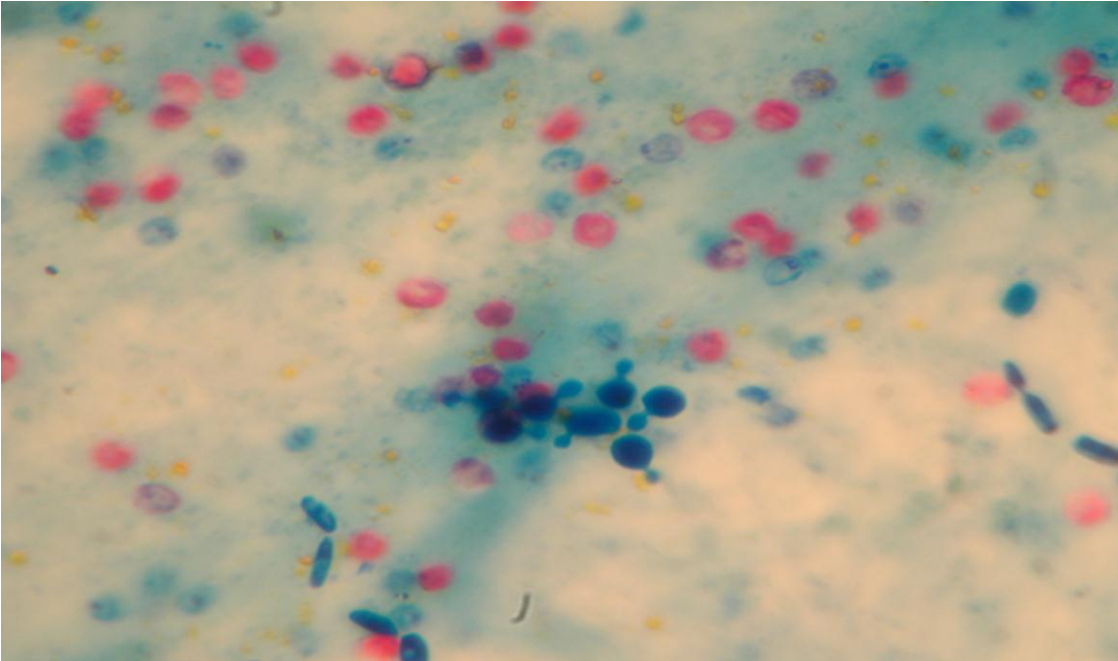
Mikroskopta X100'lik büyütmeli objektiflerde tespit edilen 17 preparattaki *Cryptosporidium* sp. ookistleri mavi zemin üzerinde, küçük parlak pembe yuvarlak-oval şekilde ve içlerindeki sporozoit yapıları, örneklerde çeşitli yoğunlukta görüldü(Resim 2-3).

**Resim 2:** *Cryptosporidium* sp. ookistlerinin modifiye asit-fast boyamadaki görünümü (nadir ookist görünümü).



(Modifiye asit-fast boyama, X100 büyütme).

**Resim 3:** *Cryptosporidium* sp. ookistlerinin modifiye asit-fast boyamadaki görünümü (yoğun ookist görünümü).



(Modifiye asit-fast boyama, X100 büyütme).

530 dışkı örneğinin ELISA yöntemi ile yapılan çalışmasında toplam 31(31/530(%5.8) hastanın dışkısında *Cryptosporidium* sp. antijeni tespit edildi.

ELISA pozitif hastaların, hastalık gruplarına göre incelemesinde onkoloji grubundaki kanserli hastaların *Cryptosporidium* sp. nin en fazla tesbit edildiği hastalık grubu olduğu görüldü. Tablo 7’de çalışma gruplarına göre *Cryptosporidium* sp. ELISA pozitif-negatif dağılımı gösterilmiştir

**Tablo 7:** Çalışma gruplarına göre *Cryptosporidium* sp. ELISA Pozitif-negatif dağılımı

Hasta grubu	ELİSA (+)		ELİSA(-)		TOPLAM
	n	%	n	%	
Onkoloji	14	2,6	142	26,7	156
Diyaliz	4	0,7	94	17,7	98
Gastroeneroloji	2	0,3	20	3,7	22
Pediyatri	8	1,5	170	32,0	178
malnütrüsyonlu çocuk	1	0,1	20	3,7	21
Kontrol	2	0,3	53	10	55
<b>Toplam</b>	<b>31</b>	<b>5,8</b>	<b>499</b>	<b>94,2</b>	<b>530</b>

ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* sp. antijeni saptanan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı tablo 8’de verilmiştir. ELISA Pozitif hastaların 8’i (%4. 5) 0-5 yaş grubunda,1’i(%0. 8) 6-15 yaş grubunda, 10’u (%14. 9) 16-40 yaş grubunda, 12’si de(%7. 1) 40 yaş üzerinde tespit edildi. Buna göre 40 yaş üstündeki immün süprese hastalar, asit-fast boyama yönteminde olduğu gibi *Cryptosporidium* sp.’ antijeninin en fazla pozitif olduğu hasta grubuydu. Modifiye asit-fast boyama yönteminde ookist saptanamayan 2 kontrol grubu, 1 malnütrüsyonlu çocuk, 6 onkoloji hastası ve 5 çocuk hastada ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* sp. antijeni saptandı .

**Tablo 8:** ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* sp. antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş aralığı	Toplam hasta sayısı	ELISA (+)
0-5	175	8 (%4. 5)
6-15	119	1(%0. 8)
16-40	67	10(%14. 9)
40 yaş üstü	169	12 (%7. 1)
<b>Toplam</b>	<b>530</b>	<b>31 (%5. 8)</b>

ELISA yöntemi baz alınarak Modifiye asit-fast boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (Tablo 9).

**Tablo 9:** Modifiye asit-fast boyama sonuçları ile ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.

Test edilen	ELISA pozitif(n)	ELISA negatif	TOPLAM
Asit-fast boyama pozitif	17	0	17
Asit-fast boyama negatif	14	499	513
<b>Toplam</b>	<b>31</b>	<b>499</b>	<b>530</b>

Duyarlılık	:54. 83
Özgüllük	: 100
Pozitif prediktif değer	: 100
Negatif prediktif değer	:94. 15
Testin Doğruluk Oranı	: 97. 35

Modifiye asit-fast boyama yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (Tablo 10).

**Tablo 10:** ELISA sonuçlarının Modifiye asit-fast boyama sonuçları ile karşılaştırılması.

Test edilen	Asit-fast boyama pozitif)		Asit-fast boyama negatif		TOPLAM
	n	%	n	%	
ELISA pozitif	17	3,2	14	2,6	31
ELISA negatif	0	0	499	94,2	499
<b>Toplam</b>	<b>17</b>	<b>3,2</b>	<b>513</b>	<b>96,8</b>	<b>530</b>

ELISA testinin duyarlılığı :  $17/(17+0) \times 100$ : 100  
 ELISA testinin özgüllüğü :  $499/(14+499)$  : 100  
 Pozitif Prediktif Değeri : 54. 83  
 Negatif Prediktif Değeri : 100. 00  
 Testin Doğruluk Oranı : 97. 36 olarak hesap edilmiştir.

Kontrol grubu ile diğer grupların ELISA sonuçları Yates Düzeltmeli Khi-Kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Hipotez çift yönlü olup  $p \leq 0. 05$  olduğunda anlamlı farklılık kabul edildi. Tablo 11’de görüldüğü gibi gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.

**Tablo 11:** Kontrol grubu ile diğer gruplardaki ELISA (+) hastaların istatistiksel karşılaştırılması

<b>Kontrol</b>	<b>ELISA testi</b>	<b>x2</b>	<b>p</b>
Kontrol (n=55)	2 (%3. 6)	0. 979	0. 322
ONKOLOJİ (n=156)	14 (%9. 0)		
KONTROL (n=55)	2 (%3. 6)	0. 00	1. 000
DİYALİZ (n=98)	4 (%4. 1)		
KONTROL (n=55)	2 (%3. 6)	0. 16	0. 685
GASTRO (n=22)	2 (%9. 1)		
KONTROL (n=55)	2 (%3. 6)	0. 00	1. 000
PEDİATRİ (n=178)	8 (%4. 5)		
KONTROL(n=55)	2 (%3. 6)	0. 000	1. 000
MAL. ÇOCUK (n=21)	1 (%4. 5)		

530 hastanın dışkı örneklerinin nativ-lugol ile yapılan incelemelerinde saptadığımız diğer parazitlerin ve *Cryptosporidium* sp.’nin hasta gruplarına göre dağılımı Tablo 12’de gösterilmiştir.

**Tablo 12:** *Cryptosporidium* sp. ve diğ er parazitlerin dağılımı.

<b>Parazit</b>	<b>Pediatric</b>	<b>İmmun supresse</b>	<b>Gastroenteroloji</b>	<b>Toplam</b>
<i>Cryptosporidium</i> sp.	3	12	2	17
<i>Giardia intestinalis</i>	14	3	1	18
<i>Entamoeba histolytica</i> /dispar	11	-	-	11
<i>Blastocystis hominis</i>	8	3	3	14
<i>Hymenolepis nana</i>	2	-	1	3
<i>Entamoeba hartmanni</i>	-	-	1	1
<b>Toplam</b>	<b>38</b>	<b>18</b>	<b>8</b>	<b>64</b>

Ayrıca 5 hastada da birden fazla parazite rastlanmıştır. Bu hastaların 4'ü pediatrik hastalardı. Birden fazla parazit saptanmış hasta grupları ve etkenler Tablo 13'te gösterilmiştir.

**Tablo 13:** Birden fazla parazitin saptandığı hasta grubu ve parazitler

<b>Parazit</b>	<b>Pediatric</b>	<b>immun supresse</b>	<b>Diğ er hastalar</b>	<b>Toplam</b>
<i>Cryptosporidium</i> sp. + <i>Giardia intestinalis</i>	1	-	-	1
<i>Cryptosporidium</i> sp. + <i>Entamoeba histolytica</i> /dispar	1	-	-	1
<i>Hymenolepis nana</i> + <i>Giardia intestinalis</i>	2	-	1	3
<b>Toplam</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>5</b>

Taranan dışkı örneklerinin 25 tanesinde nativ incelemede ve boyamalarda bol oranda *Candida* sp. 'ye rastlandı. Özellikle immün süprese hastaların 17'sinin ve pediatri grubunun 8'inin dışkı örneklerinde *Candida* sp. floraya hakim düzeyde idi.

Modifiye asit-fast boyamada ookist saptanan tüm hastaların ELISA testlerinin pozitif olduğu görüldü. ELISA testinin pozitif olduğu 31 hastanın demografik özellikleri, klinik ve laboratuvar bilgileri Tablo 14' te verilmiştir..

**Tablo 14:** *Cryptosporidium* sp. saptanan hastalara ait,demografik özellikler, klinik ve laboratuvar bulguları.

No	Yaş	♀♂	İkamet	Poliklinik	ELISA sonucu	Asit fast boyama	Dışkı mikroskopisi Lökosit, Eritrosit ve diğer parazitler	Hayvan Besleme	İçme Suyu	Seyahat	Eşlik eden hastalık	Halen aldığı tedavi	Dişıklama sayısı/Gün	İshal	Ateş	Karın ağrısı	İştansızlık	Kusma	Bulantı	Kilo kaybı
1	28	K	kulp	iç hastalıkları(kontrol)	+	-	yarı katı sarı	-	şebeke	-	-	-	1- 2	-	-	-	-	-	-	-
2	2	E	Sason	Çocuk	+	-	yumuşak kıvamlı,yeşil	-	kuyu	-	malnütrüsyon	-	2, 3	+	+	+	+	-	-	+
3	35	E	Diyarbakır	iç hastalıkları(kontrol)	+	-	Katı	-	şebeke	-	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-
4	22	E	Diyarbakır	Onkoloji	++	+	sulu,beyaz mukuslu bol lökosit	-	şebeke	-	-	-	4,5	+	+	+	+	-	-	+
5	2	K	Siirt	Çocuk	+++	+	yeşil,y. katı,yağ damlacıkları G.int.	-	kuyu	-	MSUD+Pnömoni	-	3,4	+	+	+	+	-	-	+
6	59	K	Diyarbakır	Onkoloji	++	+	sarı,katı,bol mukus keseciği,yağ damlacıkları	İnek	pet şişe	-	meme ca	KT +RT	1,2	-	-	-	+	-	-	+
7	60	K	Urfa	Onkoloji	++	+	sarı,yarı katı,bol kandida,epitel hücreleri	-	şebeke	-	Kolon ca	KT +RT	1,2	-	-	-	+	-	-	+
8	18	E	Batman	Onkoloji	+	-	sarı,katı	keçi	şebeke	-	PNET	KT	1. 00	-	-	-	+	-	-	+
9	66	E	Batman	Onkoloji	+	+	sarı,yarı katı,	-	şebeke	-	Prostat ca	KT	1,2	-	-	-	+	-	-	+
10	30	K	Mardin	Onkoloji	+	-	sarı,yarı katı	hindi,köpek	şebeke	-	Sinovyal Sarkom	KT	1,2	-	-	-	+	-	-	+
11	61	E	Batman	Onkoloji	+	+	sarı yarı katı,camcı macunu	koyun,keçi	kuyu	-	Mide ca	KT	1. 00	-	-	-	+	-	-	+
12	60	E	Şırnak	Onkoloji	+	-	yeşil,y. katı,mukuslu	-	şebeke	-	Beyin tm(GBM)	RT	0,1	-	-	-	+	-	-	+
13	52	E	Hani	Onkoloji	+	-	yeşil,yarı katı(şekilsiz)	İnek	şebeke	-	Mide ca	KT	1,2	-	-	-	+	-	-	+
14	38	K	Bingöl	Onkoloji	+	-	yeşil,y.katı,bol kandida,epitel hücreleri	koyun,	şebeke	-	Kolon ca	KT	1,2	-	-	-	+	-	-	+

No	Yaş	♀♂	İkamet	Poliklinik	ELISA sonucu	Asit fast boyama	Dışkı mikroskopisi Lökosit, Eritrosit ve diğer parazitler	Hayvan Besleme	İçme Suyu	Seyahat	Eşlik eden hastalık	Halen aldığı tedavi	Dışkılama sayısı/Gün	İshal	Ateş	Karın ağrısı	İştahsızlık	Kusma	Bulantı	Kilo kaybı
15	48	E	Diyarbakır	Onkoloji	+	-	sarı,sulu,	-	şebeke	-	Akciğer ca	KT	2,3	-	-	-	+	-	-	+
16	40	E	Diyarbakır	Onkoloji	+	+	sarı yarı katı,	-	şebeke	-	Akciğer ca	KT	1,2	-	-	-	+	-	-	+
17	76	K	Diyarbakır	Diyaliz	+	+	,kahverengi,ykatı	-	şebeke	-	KBY	Diyaliz	0,1	-	-	-	-	-	-	-
18	48	K	Diyarbakır	Diyaliz	+	+	kahverengi,ykatı	-	şebeke	-	KBY	Diyaliz	0,1	-	-	-	-	-	-	-
19	73	K	Diyarbakır	Diyaliz	+	+	kahverengi katı	-	şebeke	-	KBY	Diyaliz	0,1	-	-	-	+	-	-	-
20	22	E	Şırnak	İç hastalıkları(Gastro)	++	+	kahverengi y. katı	-	şebeke	-			2,3	-	-	+	+	-	-	-
21	49	K	Diyarbakır	Onkoloji	++	+	kahverengi katı GK(+)	-	şebeke	-	Malign mezenkimal tm	RT,KT	0,1	-	-	-	+	-	-	+
22	38	E	Diyarbakır	İç hastalıkları(Gastro)	++	+	kahverengi yumuşak ,yağ damlack	-	şebeke	-			1,2	-	-	+	+	-	-	-
23	3	E	Diyarbakır	Bebek Servisi	+++	+	kahverengi sulu		kuyu	-			4,5	+	+	+	+	-	-	+
24	4	E	Diyarbakır	Çocuk	+	-	kahverengi ykatı bol kandida		şebeke	-			2,3	+	-	+	-	-	-	-
25	2	E	Diyarbakır	Bebek Servisi	+	-	sarı sulu		şebeke	-			3,4	+	+	+	+	-	-	+
26	1	E	Diyarbakır	Acil polk	+	-	Açık sarı şekilsiz		şebeke	-			2,3	+	+	+	+	-	-	-
	4	E	Diyarbakır	Çocuk	+	-	Kahverengi şekilsiz		şebeke	-			2,3	+	+	+	+	-	-	-
28	12	K	Diyarbakır	Acil polk	+	-	Sulu sarı,E.his/dis		şebeke	-			4,5	+	+	+	+	-	+	+
29	1	E	Şırnak	Çocuk	++	+	sarı-yeşil mukuslu, sulu, bol nişasta kandida		kuyu	-			3,4	+	+	+	+	-	+	+
30	40	K	Batman	Onkoloji	+++	+	sarı-yeşil sulu, bol kandida		şebeke	-	meme ca	KT	4,5	+	+	+	+	+	+	+
31	60	k	Bitlis	Diyaliz	++	+	Kahverengi sulu		şebeke	-	DM		3,4	+	+	+	+	-	-	-



## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda kanserli olgu sayılarındaki artış, immünsüpresyon, immünsüpresif ilaçların artan kullanımı, popülasyonun yaşlanması ve malnütrüsyon sonucunda paraziter enfeksiyonlara duyarlılık artmıştır. Cryptosporidiosis de dünyanın birçok bölgesinde giderek yaygın hale gelen, immün yetmezliği bulunan ve bulunmayan bireylerde sağlık problemi oluşturan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca nosokomiyol ishallerde üçüncü en sık patojen (%7. 2) olarak yer alması önemini daha da arttırmaktadır (110-112).

İnsandan–insana, hayvandan insana ve içme sularıyla bulaşabilen *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 *cryptosporidiosis*'in epidemiyolojisini belirlemekte yayılımını kolaylaştırmaktadır. Son zamanlarda tanı yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte *Cryptosporidium* ile ilgili yapılan çalışmalar ve *Cryptosporidium* görülme oranlarında artış görülmüştür. Enfeksiyon insidansı 1997'de ( 113) Avrupa ve Amerika'da %1-3, gelişmekte olan ülkelerde %5-10 olarak bildirilirken; 2005'te (114) Avrupa ve Amerikada % 25-35, Venezuela ve Peruda % 65 oranında seropozitiflik bildirilmektedir. Ülkemizde farklı gruplarda yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* görülme oranı %. 0.13 ila %35. 5 arasında bildirilmektedir (17,110,115,116, 117). Çalışmamızda toplam 530 bireyin 31'inde (% 5. 85) *Cryptosporidium* sp. antijeni saptandı.

Cryptosporidiosis ile ilgili çalışmalarda birinci sırayı HIV pozitif grup alırken ikinci sırayı immunsuprese bireyler ve diğer gruplarda yapılan çalışmalar oluşturmuştur. Yapılan çalışma sonuçlarında farklılıklar bulunmakta ve bu farklılıklar da; coğrafik yerleşime, laboratuvar yöntemlerine, seçilen grupların farklılığına ve hastalığın farklı safhalarına bağlanmaktadır. HIV pozitif grup için 2002 yılında (118) ortalama %32'lik oran bildirilmiştir. Batero ve arkadaşları (119) akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, anti-HIV pozitif ve diğer immün yetmezliği olan 111 olguda en sık rastlanan parazitin *Cryptosporidium* sp. olduğunu bildirmişlerdir. Ülçay ve arkadaşları, 2008'de yaptıkları bir çalışmada ishallerde immunsuprese 36 olgunun 3'ünde (%8. 6) *Cryptosporidium* saptamışlardır (120). Tanyüksel ve arkadaşları 116 çeşitli kanserli hastaların 18'de (%17.

0) *Cryptosporidium* sp. rapor etmişlerdir (121). Ülkemizde yapılmış çalışma örnekleri Tablo 15’da verilmiştir.

**Tablo 15:** Türkiye’de çeşitli yörelerden saptanan Cryptosporidiosis prevalansı (68).

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

Hindistandan bildirilen kanserli 560 hastadan ookist saptanan 7 hastanın (%1.3) 5’inin hematolojik kanserli vakalar olduğuna vurgu yapılmıştır (122). Refik Saydam Hıfzısıhha merkezinde diyaresi olan solid tümörlü 72 olguda *Cryptosporidium* sp. araştırılmış ve kontrol grubu olarakda 50 sağlıklı birey çalışmaya alınmıştır. Hasta grubundaki 72 örneğin %8.3’ünde *Cryptosporidium* ookistleri görülürken kontrol grubundaki hiçbir örnekte *Cryptosporidium* ookistleri saptanmamıştır (123). Çalışmamızda immunsuprese olarak kabul edilen 98 hemodiyaliz,156 onkoloji, toplam 254 hastanın

18'inde (%7.08) *Cryptosporidium* sp. antijeni saptandı. *Cryptosporidium* sp. saptanan 18 vakanın 14'ünü kanserli hastalar, 4'ünü hemodiyaliz hastaları oluşturmaktaydı. Kontrol grubu olarak çalıştığımız 55 sağlıklı bireyin 2'de (%3.6) *Cryptosporidium* sp. antijenleri saptandı. Sarı ve arkadaşları 2003'de hemodiyaliz tedavisi gören 47 kronik böbrek yetmezlikli hasta ve 36 sağlıklı bireyin alındığı çalışmalarında; *Cryptosporidium* sp. 'nin hasta grubunda %6.4, kontrol grubunda %2.1 oranında tespit edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında Kinyoun asit- fast boyama yöntemini kullanmışlar (124). Çalışmamızda 98 hemodiyalizli hastanın %4.08'de kontrol grubunun %3.6'de *Cryptosporidium* sp. pozitif bulundu.Çalışmada diyaliz hastaları hem boyama hemde ELISA yönteminde pozitif idi..

Kontrol grubunda bulduğumuz seropozitiflik oranı (%3.6) çalıştığımız diğer grupların yüzdelerine yakın bir orandır. Bunu kontrol grubumuzun sayısının az olmasına ve yine tesadüfen belirtili yada belirtilsiz cryptosporidiosis enfeksiyonunun devam ettiği bireylerin bu grup içinde yer almış olmasına bağlayabiliriz. Örneğin Coloroda'da randomize yapılan bir çalışmada %30 bireyin *Cryptosporidium* oookistleri attıkları ve bunların ancak 3 tanesinde semptomatik hastalığın bulunduğu bildirilmektedir(125). Gülhane Tıp Akademisi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji kliniğinde başka sebeplerle endoskopi uygulanan ancak cryptosporidiosis açısından asemptomatik 100 olgunun 3'(%3) ünde *Cryptosporidium* oookistleri saptandığı bildirilmektedir(117).

İmmün yetmezlik durumunun parazitik enfeksiyonlarına etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. İmmün yetmezlikli hastaların parazitlerin tüm tipleriyle enfekte olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur (126). *Cryptosporidium* sp. enfeksiyonlarında da immün yanıt tam olarak bilinmemektedir. Bağışık yanıt hakkındaki bilgilerin çoğu hayvan modelleriyle yapılan çalışmalardan öğrenilmiştir. Bu modellerde yapılan çalışmalarda enfeksiyonun önlenmesinde ve/veya iyileşmesinde CD4 T lenfositleri ve gamma interferonun önemli rol oynadığı bildirilmektedir (125,127). HIV ile enfekte hastalarda akut sınırlı enfeksiyona sahip olanlarda CD4 sayısı >180 hücre/ mm<sup>3</sup>, iken fulminant enfeksiyonlularda CD4 sayısının <50 hücre/ mm<sup>3</sup>,olduğu bildirilmiştir. (114). Ayrıca sitokinlerden IL-5 ve IL-12'nin azalmasının *Cryptosporidium* enfeksiyonun şiddetlenmesinde etkili olduğu kanaatine varılmıştır (128). 1998'de Theodos akut ve kronik cryptosporidiosis kontrolünde CD4 lenfositlere bağımlı sistemik hücresel bağışıklığın önemli olduğuna, Mc Donald ve Borerof'ta, humoral bağışık yanıtın cryptosporidiosis'ten korunmada rol oynadığına vurgu yapmışlardır (129). Böylece özellikle HIV pozitif olanlar ile diğer immunsuprese bireylerde cryptosporidiosis'in farklı

linik tablolar oluşturabileceği yorumlanmıştır. Çalışmamızda *Cryptosporidium* pozitifliği en çok kanser hastaları olmak üzere, immüsupresif hastalarda ve daha çok 40 yaş üstü yaşlarda görülmüştür. İmmüsuprese hastalarda *Cryptosporidium* görülme oranı bu grupta 18 hasta ile(onkoloji+diyaliz) % 7. 6 olarak en yüksek oranda tespit edildi, ancak bu hastalarda CD4 T lenfositleri bakılmadı ayrıca bir hastanın dışında ciddi enterit bulgusu yoktu.

Çalışmamızda gastroenterit şikayeti ile gelen 178 çocuğun 8’de (%4. 49) *Cryptosporidium* sp. saptanmıştır. Yine malnütriyon tanısı almış 21 çocuğun 1’inde *Cryptosporidium* seropozitifliği saptanmıştır. Malnütriyonlu çocuklar arasında cryptosporodiosisin daha yaygın olduğu ve daha ciddi seyrettiği bildirilmektedir (122). İsrailde yapılan bir çalışmada 221 malnütriyonlu çocuğun %13.5’de (n=30) *Cryptosporidium* saptandığı, Hindistan’da diyareli 100 çocuktan 13’de *Cryptosporidium* saptandığı ve bu çocuklardan 6’sının malnütriyonlu çocuklar olduğu bildirilmektedir. 2000 yılında yapılan bir çalışmada 71 malnütriyonlu çocuğun 7’sinde, malnütriyonsuz 61 çocuğun 3’ünde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmış ve malnütriyonun cryptosporodiosis için risk taşımadığı sonucuna varılmıştır (130). *Cryptosporidium* antijeni saptadığımız malnütriyonlu çocuğun ishal ve karın ağrısı şikayetleri bulunmaktaydı.

Çocuklarda birçok paraziter etkenin prevalansı gibi *Cryptosporidium* prevalansı diğer yaş gruplarına göre daha yüksektir. Bu yaş grubundaki bireyler arasında fekal oral bulaşmanın daha kolay olması, temizlik kurallarına yeterli özenin gösterilmemesi ve immunitenin tam gelişmemiş olması bunun başlıca nedenleri olarak gösterilmektedir. İngilterede 867 gastrointestinal şikayeti olan 5 yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* görülme oranı %7 olarak bildirilmektedir (59). Van’da yapılmış bir çalışmada 0-3 yaş grubunda ishali 202 çocuğun 6’sında (%2. 9) boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır (18). Avusturalya da ishal nedeniyle hastaneye yatırılan 884 çocuğun %4. 1’de yeni Zelanda’da ishali 36 çocuğun %22’de, Hindistanda 15 yaşından küçük ishali 682 çocuğun %13. 1’de *Cryptosporidium* sp saptanmıştır (20). Eskişehirde 0-6 yaş grubunda ishali 607 çocuğun %3. 6’sında (40), Elazığ’da da 0-5 yaş grubu ishali 417 çocuğun %4. 55’de boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır (18). Çalışmamızda gastroenterit şikayeti ile gelen çoğunluğunu 5 yaş altı çocukların oluşturduğu 178 çocuğun 8’de (%4. 49) *Cryptosporidium* saptanmıştır.

Çalışmamızda diğer bir grup gastroenterit şikayeti üzerine gastroenterolojiye başvuran bağışık sistemi yeterli erişkin hastalardır. Bu grupta yer alan hastalarda yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* sıklığının %0.4 ile %13.5 arasında değiştiği bildirilmektedir

(131). Çalıştığımız 22 diyareli hastanın 2'(%9)inde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır. İnceboz ve arkadaşları (132) aynı gruptaki 225 hastanın %0. 4'de sadece kinyonun asit-fast boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* sp. ookistleri saptarken, Malatyada yapılan diğer bir çalışmada bu oran %1. 6'dır (133). Ankara'da çeşitli boyama yöntemleriyle 345 diyareli hastanın hiçbirinde *Cryptosporidium* saptanmazken, aynı örneklerin 159'unda ELISA yöntemiyle %3.8 (n=6) oranında pozitiflik saptanmıştır (131). Çalışma sonuçlarına bakıldığında yöntem olarak ELISA'nın kullanıldığı çalışmalarda *Cryptosporidium* görülme oranı daha yüksek bulunmuştur. Bu grupta saptadığımız iki pozitif vakanın hem ELISA hemde boyama yöntemleri sonucu pozitif idi.

*Cryptosporidium* enfeksiyonunun tüm dünyada görülebildiği ve sağlıklı bireylerde de salgınlara yol açabildiği ortaya konmuştur (134, 135). Daha çok su kaynaklı bir patojen olan *Cryptosporidium* ookistleri hem tatlı hemde tuzlu sularda aylarca enfekte olarak kalabilir (136). Rutin klorlama ve ozonlamanın ookistler üzerine etkisi çok az veya hiç bulunmamaktadır (137). Su kaynaklı *Cryptosporidiosis* salgınlarının büyük bir çoğunluğunun kontamine içme suyuna bağlı olarak geliştiği bildirilmektedir (138). İngilterede salgınlar ile ilgili yapılan bir derlemede 1992-2003 tarihleri arasında su kaynaklı 80 salgının %69'una *Cryptosporidiumun* neden olduğu bildirilmiştir. Toplam 62 salgının 21'den belediye suyu 6'sından özel ambalajlı sular ve 32'sinden yüzme havuzları sorumlu tutulmuştur (134). Yine son yıllarda Avrupa ve Avusturalya, Kanada ve İngilterede su yoluyla *Cryptosporidium* salgınları bildirilmiştir (139). Çalışmamızda *Cryptosporidium* görülen hastaların 5'inin içme suyunu kuyu suyundan sağladıkları ve bu hastalardan 4'nü gastroenterit şikayeti olan çocukların oluşturduğu saptanmıştır. Diğer bireylerden bir tanesi hariç hepsi şebeke suyunu kullanan hastalardır. Ülkemizde *Cryptosporidiumu* içeren salgınlarla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Mersin bölgesinde Otağ ve arkadaşlarının 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 (117).

*Cryptosporidium*'un tanı ve türlerini tespit etmek amacıyla doku biopsisi, dışkı boyama, IFAT, DFA, ELISA, PCR gibi teknikler kullanılabilir. *Cryptosporidiosis*'te teşhis için en kolay tekniğin boyama ile dışkı taraması olduğu bildirilmektedir. Toplanan dışkı örneklerinin direkt taze preparat hazırlayarak x10, x40 objektiflerde incelenebileceği ancak, genel olarak boyasız preparatlarda tanı zorluklar

yaşandığı belirtilmiştir. Tanı da çeşitli dışkı boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Ookistlerin bolca lipit ihtiva etmesi *Cryptosporidium*'un aside dirençli boyama yöntemleriyle boyanmasına olanak sağlamıştır. Modifiye asit-fast boyama yönteminin en iyi yöntemlerden biri olduğu bildirilmektedir. Kırmızı-pembe boyanan ookistlerin mavi zemin üzerinde kolay bir şekilde ayırd edilebilmesi, ookistlerin iç yapısını ayrıntılı görülebilmesi ve kalıcı bir boya olması nedeni ile *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde kullanılması uygun bulunmuştur (26,80,87-89). Dışkıda *Cryposporidium* ookist izolasyon şansını artırmak için modifiye çinko sülfat flotasyon tekniği veya Sheatler'in şeker flotasyon metodu önerilmektedir. Sarı ve arkadaşları 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 (124). Yapılan çalışmalarda İmmun yetmezliği olan ve ishalleri hastalardan elde edilen dışkı örneklerinden konsantrasyona gerek kalmadan ookistlerin görülebildiği bildirilmektedir (111). Çöktürme işlemi uygulamadan, ancak izolasyon şansımızı arttırmak için her örnekten ikişer hazırladığımız preparatların %3.2'inde modifiye asit- fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookistleri saptandı. Prospektif ve epidemiyolojik çalışmalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının saptanması ve izlenmesi için ELISA kitlerinin kullanılması önerilmektedir (140). Jayalakshmi ve arkadaşları Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada, ishalleri olan 89 HIV'li hastanın dışkı örneklerini ELISA ve modifiye asit-fast boyama yöntemleriyle incelemişler ve 11 (%12. 4) örnekte pozitif sonuç elde etmişlerdir. ELISA testinin duyarlılığını %99. 9 ve özgüllüğünü %98. 7 olarak bulmuşlardır. Cryptosporidiosis üzerine yapılan geniş çaplı çalışmalarda, basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren ELISA'nın rutin çalışmalarda kullanılmasının faydalı olacağını bildirmişlerdir (141). Çalışmamızda, boyama yöntemini baz alarak değerlendirdiğimizde, ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğu saptandı. Bu sonuçlar Jayalakshmi ve arkadaşlarının çalışmasına yakın değerlerdedir. Onların çalışmalarında HIV'li hastalar ön planda iken, bizim çalışmamızda da immünsüprese hastalar ön plandaydı.

Kehl ve arkadaşları ABD'de yaptıkları bir çalışmada, iki ELISA yöntemi, DFA ve asit-fast boyama yöntemlerini *Cryptosporidium* saptamak amacıyla kullanmışlardır. 129 dışkı örneği incelenerek 55 örnekte pozitif sonuç, 74 örnekte negatif sonuç elde etmişlerdir. ELISA yönteminin duyarlılığının %94.5, asit-fast boyama ve DFA birlikte kullanıldığında ise duyarlılığın %96. 4 olduğunu saptamışlardır (87). Bizim çalışmamızda

modifiye asit-fast yöntemi ile 530 hastanın 17'sinde (%3.2) *Cryptosporidium* ookistleri pozitif olarak tespit edilirken, 14'ünde ookist saptanamamıştır. Modifiye asit-fast yönteminin duyarlılığı %54. 83, özgüllüğü ise %100 olarak tespit edilmiştir.

Baveja ve arkadaşları Delhi Hastanesinde yaptığı çalışmada, 216 dışkı örneğinde *Cryptosporidium*'u saptamak amacıyla modifiye asit-fast ve ELISA yöntemlerini kullanmıştır. *Cryptosporidium* sp. 'yi saptamak için ELISA'nın duyarlılığının %100, özgüllüğünün ise %99. 7 olduğunu bildirmiştir (142). El Shazly ve arkadaşlarının Mısır'da yaptıkları çalışmalarında ishalleri 1050 çocuğun 90'ında modifiye asit-fast boyama ile ookist saptarken, ELISA ile bu sayı 100'ü bulmuştur (143). Adana'da yapılan bir çalışmada ise Elgün ve ark. ELISA testinde duyarlılığın %100, özgüllüğün de %80. 1 olduğunu saptamıştır (5). Direkel ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarında Malatya Huzurevi sakinleri ile İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'ne başvuran ishalleri toplam 92 kişiden aldıkları dışkı örneklerinde, ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium parvum* koproantijenlerini ve modifiye asit-fast boyama yöntemi ile ookistlerini araştırmışlardır. Toplam 5 örnekte hem ELISA hem de boyama yöntemi ile pozitiflik saptamışlardır. ELISA yönteminin duyarlılığını ve özgüllüğünü bu çalışmada %100 olarak saptamışlardır (144). Yılmaz ve arkadaşları, Van'da yaptıkları çalışmalarında yaşları 0-15 arasında olan, 870'i kız, 1130'u erkek olan ishalleri toplam 2000 çocuktan dışkı örnekleri temin etmişler ve aynı yaşlarda rastgele seçilen 100 çocuğu da kontrol grubu olarak kullanmışlardır. Bunları modifiye asit-fast boyama ve ELISA yöntemiyle incelemişler. Sonuçta ELISA ile 2000 çocuğun 97'sinde (%4.9), boyama ile sadece 39'unda (%1. 95) ookistleri saptamışlardır. Kontrol grubunda her iki yöntemle de parazit saptanmadığını bildirmişlerdir (145). Bu çalışmanın sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlara oldukça yakınlık göstermektedir.

*Cryptosporidium* sp. antijeni saptanan hastaların çoğunda ELISA (1+) olup, bunların dışkıları katı, yarı katı kıvamında idi. Erişkin ELISA (1+) hastaların çoğunda immunsupresyon dışında klinik bulgu yoktu. ELISA 2+ ve 3+ hastalarda klinik bulgular daha ağır ve dışkı örnekleri daha sulu ve daha bol miktarda idi. Bu olguların bazılarının dışkılarıda mukus ihtiva etmekteydi. ELISA (2+) hastalarımızın 2 tanesi Gastroenteroloji bölümü hastası olup, bunların başvuru şikayeti ishal değil karın ağrısı idi. Bunların da dışkıları yumuşak kıvamda idi. ELISA pozitif bulduğumuz pediatrik hastalarda ise başvuru şikayetleri arasında; ishal, ateş, karın ağrısı, iştahsızlık, bulantı kusma, kilo kaybı gibi şikayetlerinden birkaçı aynı anda bulunmakta idi ve pediatrik hastalarda ishal ve karın ağrısı daha ön planda idi. Hiçbir şikayeti olmayan hastalardan oluşan kontrol grubu hastalarının ikisinde de, ELISA (1+) pozitif bulundu. Bu durumlar klinik seyirin değişik

varyasyonlarda olabileceği , sessiz enfeksiyonlarında olabileceği ve hastalık bittikten sonra hala ookist atılımının devam edebileceği yada ookist atılımı olmasa da organizmada antijenik ürünlerin olabileceği şeklinde açıklanmaktadır (141).

Cryptosporidiosisin görülme sıklığı mevsimlere ve coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Bu enfeksiyonun Kuveyt'te yapılan bir araştırmada Ocak-Nisan aylarında, Guatemala'da yapılan bir çalışmada nemli ve yağmurlu mevsimlerde, Amerika'da Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezinin (CDC) 4 yıllık bir süreyi ve 47 eyaleti kapsayan bir çalışmasında, yaz mevsiminin son aylarında daha sık görüldüğü bildirilmiştir (146-148). Doğan ve ark. larının çalışmalarında, pozitif olguların mevsimsel dağılımı incelendiğinde Temmuz-Ekim aylarında belirgin bir artışın olduğu görülmüştür (40). *Cryptosporidium* ookistlerinin özellikle nemli hava ve sıcaklıkla beraber doğada konsantrasyon artışına paralel olarak, *Cryptosporidium* enfeksiyonları da artış göstermektedir. Bilim adamları araştırmaları sonucunda cryptosporidiosis'in özellikle ılık ve yağışlı mevsimlerin hastalığı olduğu konusunda fikir birliğine varmışlardır. Bu mevsimlerde, yağışın fazla olması nedeniyle parazitin içme sularına ve diğer bazı gıdalara bulaşma riskinin artırdığı, Türkiye'de ise insanlarda cryptosporidiosis'in bahar aylarında yükseldiği, Eylül ve Ekim aylarında ise en yüksek artışını gösterdiği bildirilmiştir (40-51). Bizim çalışmamızda örnek toplama zamanı özellikle Ocak-Mayıs dönemini kapsamıştır. Örnek toplama süremiz bütün bir yıl boyunca sürmediğinden mevsimler arasındaki farklılık konusunda bir yorum yapamamaktayız.

Çalışmamızda nativ preparasyon ve boyama ile değerlendirdiğimiz örneklerin toplam 25'inde bol oranda *Candida* sp. görüldü. İmmunsuprese grubun 17'sinde (%6.7) pediatri grubunun 8'inde (%4) *Candida* sp. her alanda bol oranda bulunmaktaydı. *Candida* sp. normal flora elemanı olarak bulunmaktadır. Ancak özellikle immunsuprese bireylerde flora hakimiyeti kazanıp fırsatçı enfeksiyonlar yaptıkları da bilinmektedir (149). Nativ-lugol preparasyon yöntemiyle örneklerin 61'inde (%11,5) çeşitli protozoon kistleri ve 3'ünde de (%0.5) *Hymenolepis* nana yumurtaları görüldü. En fazla parazit saptanan grup pediatri grubu idi. Halk sağlığı açısından önemli bir problem olan ve basit yöntemlerle önlenebilecek olan parazit hastalıkları, maalesef çocukluk yaş grubunda önemini hala korumaktadır.



## 6. SONUÇ

Çalışmamızda modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitif bulunan bütün örnekler ELISA yöntemiyle de pozitif bulunmuştur. ELISA yöntemi ile pozitif tespit ettiğimiz 14 olguyu modifiye asit-fast boyama yöntemi ile tespit edemedik. Dışkıda özgül antijen arayan ELISA yönteminin boyama yöntemine göre maliyetinin yüksek olmasına rağmen tanı yöntemlerindeki zorluklara yardımcı olacağı kanaatine varılmıştır.

Çalışmamız, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde, yaşlılarda, çocuk popülasyonunda ishale ve karın ağrısına neden olan etkenler arasında *Cryptosporidium* sp. ookistlerinin saptanma olasılığını göstermiştir ve *Cryptosporidium* 'un mutlaka hatırdaki tutulması gerektiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak hem immün süprese hastalarda hem de gastroenterit şikayeti ile gelen normal hastalarda *Cryptosporidiumun* da araştırılması ve boyama yönteminin negatif olduğu durumlarda ELISA gibi ikinci bir yöntemin rutinde kullanılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Tez çalışmamızdan sonra dışkıda *Cryptosporidium* sp. antijen arama ve boyama yöntemleri çalışılmaya başlanmıştır.

## 7. ÖZET

### FARKLI GRUPLARDAKİ İMMÜN-SÜPRESE BİREYLERDE CRYPTOSPORIDIUM'UN ELISA VE MODİFİYE ASİT-FAST BOYAMA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

**GİRİŞ VE AMAÇ:** Gastroenterit etkenlerinden birisi de, özellikle çocuklarda ve immunitesi yetersiz hastalarda etkili olan *Cryptosporidium* cinsi protozoonlardır. Klora dirençli olması, içme suyu süzgeçlerinden geçebilmesi dolayısıyla parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması ve çok az sayıda parazitin bile enfeksiyona neden olabilmesi su kaynaklı epidemilerin nedenleri olarak gösterilmektedir.

Bu çalışmada, Diyarbakır, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na; risk grubundaki immunsüprese hastalardan (Onkoloji ve diyaliz hastaları, malnütrisyonlu çocuklar) ve ishal şikâyeti nedeniyle, farklı yaş grubundaki non immunsüprese hastalardan gönderilen dışkılarda, *Cryptosporidium* sp. antijenleri ELISA yöntemiyle araştırılmış ve modifiye asit-fast boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri aranmıştır.

**MATERYAL VE METOD:** Çalışmada; onkoloji (n=156), diyaliz (n=98) ve malnütrisyonlu çocuklardan (n=21) oluşan toplam 275 immunsüprese hasta ve non-immunsüprese ancak gastroenterit şikayeti ile laboratuvarımıza gönderilen gastroenteroloji hastaları (n=22) ve pediatri hastaları (n=178) olmak üzere 200 hastadan alınan dışkı örnekleri çalışıldı. Ayrıca farklı kliniklerden gönderilen, ishal şikayeti olmayan non-immunsüprese 55 hasta dışkı örneği kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Dört farklı yaş grubundan oluşan toplam 530 hastadan alınan dışkı örnekleri çalışıldı. Çalışmada, 1. grup 0-5 yaş , 2. grup 6-15 yaş ,3. grup 16-40 yaş, 4. grup 40 yaş üstü kişilerden oluşturuldu. Makroskobik olarakta incelenen her dışkı örneğine lam-lamel arası preparasyon, modifiye asit-fast boyası ile boyama yapılarak *Cryptosporidium* ve diğer barsak parazitleri açısından incelendi. Ayrıca dışkı örneklerinde Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti (OXOID) ile *Cryptosporidium* sp. antijenleri arandı.

**BULGULAR VE SONUÇ:** Çalışmada, toplam 530 dışkı örneğinin 17'sinde %3.2) modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookistleri saptandı. *Cryptosporidium* ookistleri en fazla immün süprese bireylerde tespit edildi (%70.5). 530 dışkı örneğinin ELISA yöntemi ile yapılan çalışmasında toplam 31(%5.8) hastanın dışkısında *Cryptosporidium* sp. antijeni tespit edildi. ELISA yöntemi ile, 40 yaş üstü immün süprese hastalar, asit-fast boyama yönteminde olduğu gibi *Cryptosporidium* ' un en fazla pozitif olduğu hastalardı. Modifiye asit-fast boyama yönteminin duyarlılığı %54.83, Özgüllüğü %100; ELISA yönteminin duyarlılığı %100, Özgüllüğü de %100 olarak bulundu. Nativ- lugol preparasyon yöntemiyle örneklerin 61'inde (% 11,5) çeşitli protozoon kistleri ve 3'ünde de (%0.5) *Hymenolepis nana* yumurtaları görüldü. En fazla parazit saptanan grup pediatri grubu idi. Sonuç olarak hem immün süprese hastalarda hem de gastroenterit şikayeti ile gelen normal hastalarda *Cryptosporidiumun* da araştırılması ve boyama yönteminin negatif olduğu durumlarda ELISA gibi ikinci bir yöntemin rutinde kullanılmasının uygun olacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Crptosporodium* ,immunsuprese,Modifiye asit-fast boyama,ELISA

## 8. SUMMARY

### TO INVESTIGATE THE CRYPTOSPORIDIUM IN IMMUNE SUPPRESSED SUBJECTS OF DIFFERENT GROUP BY USING MODIFIED ACID-FAST PAINTING AND ELISA METHODS

**INTRODUCTION AND OBJECTIVE:** One factor of gastroenteritis is *Cryptosporidium* protozoa genus which are effective in patients with inadequate immunity and particularly in children. It is shown as the causes of water-borne epidemics, because it is resistant to chlorine, can pass interference from drinking water filters, have a high prevalence of parasite in source waters and very small number of parasite can cause infection.

In this study, *Cryptosporidium* sp. antigens were investigated by ELISA method and modified acid-fast staining of *Cryptosporidium* oocysts were sought in the feaches send to the Medical Microbiology Laboratory of Dicle University Medical Faculty Hospital Diyarbakir from immunocompromised patients at risk group (oncology and dialysis patients, malnourished children) and non-immunocompromised patients in the different age groups have diarrhea. The aim of the study is to make a determination about the situation of cryptosporidiosis, furthermore to compare the methods of ELISA and acid-fast staining and to evaluate the applicability of them.

**MATERIAL AND METHODS:** In this study, fecal samples of oncology (n = 156), dialysis (n=98) and children with malnutrition (n = 21) of the total of 275 patients, immunocompromised and non-immunocompromised patients sent to our laboratory with complaints of gastroenteritis gastroenterology patients (n = 22) and pediatric patients (n = 178) of the total of 200 patients were studied. Stool samples of non-immunocompromised 55 patients have not suffering from diarrhea were send from different clinics was enrolled as a control group in the study. Stool samples of 530 patients of four different age groups were studied. In the study, 1. group 0-5 age, 2. group 6-15 years, 3. group 16-40 age, 4. group people over the age of 40 was created. Stool samples from each studied as macroscopic solid-lamella preparation, modified acid-fast stain and were examined for intestinal parasites and other *Cryptosporidium* dyeing. In addition, Prospect

Cryptosporidium stool samples by ELISA kit (OXOID) and Cryptosporidium sp. antigens were searched.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In this study, 17% (3. 2) with modified acid-fast staining of Cryptosporidium sp. oocysts in a total of 530 stool samples were detected. Cryptosporidium sp. Oocysts were found at most immune suppressed individuals (70. 5%). In the stool of 31 (5. 8%) patients was detected Cryptosporidium sp. antigen in a total of 530 stool samples by using ELISA method. Most of the positive patients as acid-fast staining method of Cryptosporidium sp. detected by ELISA were immune-suppressed patients over 40 years. The sensitivity of modified acid-fast staining method was 54. 83%, specificity was 100%; both sensitivity and specificity of the ELISA method was found 100%. 61 (11. 5%) of samples include variety of protozoan cysts and in 3 (0. 5%) were seen Hymenolepis nana eggs by using Native-Lugol preparation method. Most parasites group was detected in pediatric group. As a result, ELISA method would be suitable for routine use to investigate Cryptosporidiumun in immune suppressed patients and also in normal patients suffering from gastroenteritis and in the cases of staining methods have been found negative.

**Key Words:** Crptosporodium , Immunocompromised, modified acid-fast staining, ELISA

## 9. KAYNAKLAR

1. John TJ, Petri AW. Markell and Voge\'s Medical Parasitology. 9, baskı, WB Saunders Company, 2006;68-71.
2. Ok ZÜ, Üner A, Korkmaz M. Cryptosporidiosis. Özcel MA(Ed) İmmun yetmezliklerde önemi artan hastalıklar. Türkiye Parazitoloji Derneği. Yayın 1995;no:12, s. 23-42.
3. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22 izmir, 2007: 363-376
4. Current WL, Bick PH. Immunology of *Cryptosporidium* sp. Pathol Immunopathol Res 1989;8:141-160.
5. Elgün G. İshalli dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* sp. antijeninin elisa yöntemi ile araştırılması,yüksek lisans tezi,Çukurova üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü parazitoloji A. D. Adana,2009.
6. Özcan K. Tıbbi Parazitoloji Ders ve Laboratuar Notları, Adana, 1998: 77-79.
7. Unat EK, Yücel A, Atlaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, 1995: 595-600.
8. Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğku E. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:21, 2007:93-97.
9. Markel EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. Sixth Edition. W. B. Saunders Company, London, 1986:72-75.
10. Döşkaya M, Dayangaç N, Kuman HA. *Cryptosporidium parvum*. T Paraziol Derg, 2003; 27(1):64-70.
11. Berger SA. Human Parasitic DiseasesSourcebook. . Jones and Bartlett Publishers, 2006;116-121.
12. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis. Microbes and Infection, 2002; 4(10):1059-1066.
13. Delibaş SB, Kurugöl Z, Pektaş B, Vardar F, Özen S, Turgay N. Diarrhea Due to *Cryptosporidium* in a Hypogammaglobulinemic Child, Acta Parasitologia Turcica, 2001; 25(2): 113-114.
14. Çetinkaya F, *Cryptosporidium parvum*'un Bulaşmasında Su ve Gıdaların Rolü. Uludağ Üniversitesi Vet. Fak. Der, 2004; 23(1-2-3): 103-109.

15. Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 1999;85:899-904.
16. Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji, Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları. 2002; 170-172.
17. Hazer Y. Afyonkarahisar bölgesindeki risk gruplarında *Cryptosporidium parvum* araştırılması. yüksek lisans tezi, afyonkarahisar Kocatepe üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü, Afyon, 2007
18. Çiçek M . 0-15 yaş grubu ishallerde *Cryptosporidium* sp ve diğer bağırsak parazitlerinin görülme sıklığı, yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, 2002.
19. Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RCA, Lal AA. *Cryptosporidium* Systematics and Implications for Public Health, *Parasitol Today* 2000;16: 287-292.
20. Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium* sp and cryptosporidiosis, *Microbiol Rev*, 1986;50, 458-483.
21. Tzipori S. , Ward H. "Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease", *Microbes and Infection* 2002;4:1047-1058.
22. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, İkinci Baskı, 1998:94-96.
23. Upton, SJ. İnternet. <http://www.ksu.edu/parasitology/basicbio>.
24. Starling C. R. , Arrowood M. J. "Cryptosporidia", In: *Parasitic Protozoa*, vol. 6. Academic Press. 1993;65:159-224.
25. Ungar B. L. P. *Infectious Diseases and Their Etiologic Agents*, volume 2, section H, in *Principle and Practise of Infectious Diseases* Editors, Mandell G. L, Bennet J. E. , Dolin R, 1995;Fourth Edition, Churchill livingstone, New York.
26. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Pres, USA, 1990;199.
27. Robin H. J. , Petry F. *Cryptosporidium parvum*: Structural compenents of the oocyst wall, *J. Parasitol* 1999;85(5), 839-849.
28. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji, Esnaf Ofset Matbacılık, Kasım, 1998;78-80.
29. Topçu A. , Söyletir G. , Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi cilt. 2, Nobel tıp Kitapevi, 2002;1919-1920.
30. Özer E Evcil hayvanlarda Cryptosporidiosis, *Ankara Üniv. Veteriner Fak. Derg.* 1990; 38(1), 20-31.

31. Erdoğan D. D. "İnsanlarda Cryptosporidiosis dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri", Uzmanlık Tezi, Ege Üniv. Tıp Fak. Sağ. Bil. Enstitüsü, 2003;110.
32. Mark AC, Maria TK, Byron LB. The ultrastructure of gametogenesis of *Cryptosporidium baileyi* in the respiratory of broiler chickens, *J Parasitol*, 1999;85, 4, 609-615.
33. Köktürk O. Parazit Hastalıkları Grup Başk. , Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, *Toraks Derg.* , 2002;Cilt 3, Ek 5.
34. Saygı G. Temel Parazitoloji. 2002;2:95.
35. Terzi G. Gıda kaynaklı protozoon enfeksiyonların insan sağlığı açısından önemi. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 2005;16(2):47-55.
36. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification, *Int J Parasitol* 2000;30:1305-1322.
37. Goldoft MJ, Todd D. Cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.* 2008; 13(7): 1-4.
38. Current W. L., Garcia 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)
39. Edited RB, O'Donoghue P. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*, *Int J Parasitol*, 1999;29:1379-1413.
40. Doğan N. Akgün Y. "İshalli olgularda *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması", *T Parasitol Derg* 1998;22(3): 243-246
41. Alpert G. , L. M. Bell, 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.
42. Public Health Laboratory Service Study Group. Cryptosporidiosis in England and Wales; prevalence and clinical and epidemiological features. *Br. Med J.* 1990;300:774-777.
43. Sarıkaya R. *Cryptosporidium* Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme, Gazi Üniv. Kırşehir Eğitim Fak. Yayını, 2004;cilt 5, sayı 2.
44. Martino P, Gentile G, Caprioli A, Baldassori L, et al. Hospital-acquired Cryptosporidiosis in a bone marrow transplantation unit, *J. Infect. Dis.* 1998;158:647-648.
45. Sterling CR, Seegar K, Sinclair NA. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea, *J. Infect. Dis.* 1986;153:380-381.



46. Taylor DN, Houston R, Shlim DR, Bhaibulaya M, Ungar BL. Ungar P E. Etiology of diarrhea among. Travelers and foreign residents in Nepal, 1988; JAMA 260, 1245-1248.
47. Özkul İA, Alçıgır G, Kutsal O. "Bursal Cryptosporidiosis in chickens associated with marak's disease", Doğa-Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, Tubitak, 1991;16,1-9.
48. Tabak F. Enfeksiyon Hastalıkları. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kiabevi, 2003:178.
49. Bonilla LC, Guanipa 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.
50. Özçelik S, Dökmetaş S, Sümer Z, İçağasıoğlu D, Dökmetaş İ. Gastroenteritlilerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı, T Parazitol Derg, 1996;20( 3): 333-337.
51. Harp J. A. , Goff J. P. "Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves", J. Dairy Sci. 1998;81: 289-294.
52. King B. C. , Monis P. T. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment, Parasitology Rev. 2007;134: 309-23,Epub 2006 Nov 13.
53. Erickson M. C. , Ortega Y. R. Inactivation of protozoan parasites in food, water and environmental systems, J. Food Prot. Rev. 2006;69(11), 2786-808.
54. Özcel MA. İmmun yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları, Türkiye Parazitoloji Derneği, 1995, No:12, Ege Üniv Basımevi, Bornava, İzmir.
55. Över U. İshalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*'un rolü ve sağlıklı populasyonda seroprevelansı, Marmara Üniv Sağlık Bil Ens, Doktora Tezi, 1996.
56. Barsoum R. S. Parasitic infections in transplant recipients, Nat. Clin. Pract. Nephrol. 2006;2(9):490-503.
57. Spano F, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome, Int J Parasitol, 2000; 30, 553-565.
58. Jokipii L, Pohjola A, Jokipii A A frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms, Lancet , 1983;358-360.
59. Marshall AR, Al-Jumaili IJ, Fenwick GA, Bint AJ, Record CO. Cryptosporidiosis in patients at a large teaching hospital, J Clin Microbiol, 1987; 25:172-173.
60. Fayer R, Andrews C, Ungar BLP, Blagburn B. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves, J Parasitol, 1989;75:393-397.

61. Fichtenbaum CJ, Ritchie DJ, Powderly WG. Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in patients with AIDS, *Clin Infect Diseases*, 1993;16, 298-300.
62. Shadid NS, Rahaman ASHM, Mata LJ, Sanyal SC. Cryptosporidiosis in Bangladesh. *British Med J* 1985;290:114-115.
63. Mathan MM, Venkatesan S, George R, Mathew M, Mathan VJ. *Cryptosporidium* and diarrhoea in Southern Indian children, *Lancet*, 1985;1172-1175.
64. Hojlygn N, Molback K, Jepsen S. *Cryptosporidium* sp. A frequent cause of diarrhoea in Liberian children, *J Clin Microbiol*, 1986;23:1109-1113.
65. Navin TR, Hardy AM. Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *J Infect Disease*, 1987;155-150.
66. Fındık D, Karabayraktar A. Gaita örneklerinde *Cryptosporidium* oookistlerinin araştırılması, *T Parazitol Derg*, 1994;18(4): 415-419.
67. Üner A, Daldal N, Özbek Y, Tappeh KH. Çocuklarda *Cryptosporidium* aranması, *T Parazitol Derg*, 1991;15(4):42-48.
68. Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H. Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* sp. araştırılması, *T Parazitol Derg*, 1995;19(1):56-63.
69. Ok ÜZ, Korkmaz M, Ok GS, Özkan AT, Ünsal A, Özcel MA. Kronik böbrek yetmezliğinde crptosporidiosis ve blastocystosis, *T Parazitol Derg*, 1996;20(1): 41-49.
70. Wilson WR. Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, 2004:824-827.
71. Tünger Ö, Tünger A. Enfeksiyon Hastalıkları Elkitabı, HYB Basım Yayın, 2007:545-546.
72. Clayton F, Heller T, Kotler DP. Variation in the enteric distribution of *Cryptosporidia* in Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J Clin Pathol* 1994;102:420-425.
73. Yetkin MA. İmmun Yetmezlikli Hastalarda Enterik Patojen Olarak *Cryptosporidium* Oookistlerinin Araştırılması, Gazi Üniv Tıp Fak Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 1998.
74. Heywarth MF. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J Infect. Dis.* 1992;166:465-472.
75. Markell EK, Voge M, John DT. *Medical Parasitology*, 7<sup>th</sup> Edition, 1992, WB saunders Company Philadelphia.

76. Hashmey R, Smith NH, Cron S, Graviss EA, Chappell CL, White AC. Cryptosporidiosis in Houston, Texas a report of 95 cases, *Medicine*, 1997;76 (2): 118-139.
77. Findik D. *Cryptosporidium*. *T Parazitol Derg* 1994;18:(2): 107-112.
78. Graaf CD, Vonopdenbosch E, Ortaga-More LM, Abbassi H, Peters J. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals, *Int J Parasitol*, 1999; 29, 1269-1287.
79. MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis Multiattribute evaluation of six diagnosis methods. *J Clin Microbiol*, 1993;31, 2, 198-202.
80. Sears CL, Kirckpatrick BD. In: *Cryptosporidiosis and Isosporiosis. Principles and Practise of Clinical Parasitology*, John Wiley & Sons Ltd. Pres. 2001;139-164.
81. Erman N, Beyazit A, Öz İ. İzmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda Cryptosporidiosis'in yaygınlığı, *Bornova Vet. Kontr. ve Araşt. Ens.* 2000;Derg. 25(39), 33-38.
82. Yetkin MA. İmmun Yetmezlikli Hastalarda Enterik Patojen Olarak *Cryptosporidium* Ookistlerinin Araştırılması, Gazi Üniv Tıp Fak Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 1998.
83. Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis, *J Clin Pathol* 1998; 44: 445-451.
84. Limor J. R. , Lal A. A. , Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7): 2335-2338.
85. Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal spesimens. *J Clin Microbiol* 1992;30(11): 2869-2873.
86. Suresh P, Rehg JE. Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. *J Clin Microbiol* 1996;34(1): 38-40.
87. Kehl KSC, Cicirello H, Havens PL. Comparision of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species, *J Clin Microbiol*, 1995;33, 2, 416-418.
88. Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E . Dışkı İnceleme Yöntemleri, Bölüm 1, *Parazit Hastalıklarında Tanı*, Editörler: Özcel MA, Altıntaş N, 1. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, 1997, İzmir.
89. Emre Z. , Alabay 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.* 1997; 21: 293-296.

90. Gün H. , Tanyüksel M. , Haznedaroğlu T. Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması. T Microbiol Cem Derg 1997; 24: 116-119.
91. Silva CV, Ferreira MS, Gonöalves-Pires MRF, Costa-Ruiz JM. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. , 2003;98(8):1097-1099
92. Garcia L. S. , Shimizu R. Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1997;35(6), 1526-1529.
93. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res 2004; 38, 818-862
94. Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing Cryptosporidiosis. J Clin Pathol 1991; 44, 445-451.
95. Kehl KSC, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. J Clin Microbiol 1995;33(2), 416-418.
96. MacPherson D. W. , McQueen R. (1993) "Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods", J. Clin. Microbiol. 1993;31(2), 198-202.
97. Mtombo MMA, Nash AS, Blewett DA, Wright S. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocyst in cat faecal specimens", Vet. Parasitol. 1992; 45, 49-57.
98. Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği, No:2, izmir, 2007: 55.
99. Moghaddam DD, Azami M, Salehi R, Salehi M. The identification of *Cryptosporidium* species by PCR-RFLP analysis of the 18s RNA gene. International Journal of Infectious Disease, 2008; 12(1): 380-381.
100. Boxell A, Hijjawi 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.
101. Kosek M, Alcantara C, Lima AAM. Cryptosporidiosis:an update. Lancet 1 2001:262-269.

102. Akısü Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed Özcel MA. Tıbbi Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi, Yayın No:20. izmir, 2005:40-41.
103. Wittenberg DF. 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.
104. Anand A. Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *Clin Infect Disease*, 1993; 17, 297-298.
105. Blanshard C. Azithromycin, paromomycin and letrozuril in the treatment of Cryptosporidiosis, Third European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV I-Infection, Abstract, 1992, Paris.
106. Amadi B, Mwiya M, Musuku J. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:1375.
107. Doumbo O, Rossignol JF, Pichard E, Traore HA. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:637.
108. Rossignol JF, Ayoub 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.
109. Mc Meeking A. , Borkowsky W. , Klesius H. , Bonk S. A controlled trial of bovine dialyzable leukocyte extract for Cryptosporidiosis in patients with AIDS, *J. Infect. Disease* 1990;161, 108-112.
110. Börekçi G, Otağ F, Emekdaş G. Mersin'de bir gecekondulu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. *İnfeksiyon Derg* 2005;19(1):39-46.
111. Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut ishallerde çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. *T Klin J Pediatr* 2004;13:1-19.
112. Ramratnam B, Flanigan TP. Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. *Postgrad Med J* 1997;73:713-6.
113. Guerrant R. Cryptosporidiosis: An emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect* 1997; 3:51-57.
114. White AC. Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, other species). In: Principles and practice of infectious diseases, Mandell GL,

- Douglas RG Jr, Bennet JE (eds. Churchill Living stone Inc New York :2005;3215-28.
115. Tamer GS, Gülenç S. Dışkıda *Cryptosporidium* sp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. T Parazitol Derg 2008;32(3):198-201.
  116. Çeliksöz A, Çelik S. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde gastroenteritli ve malnütrisyonlu hastalarda *Cryptosporidium* sp. araştırması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2003; 27(2):85-88.
  117. Otağ F, Aslan 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.
  118. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rv, 2002;15(1):145-154.
  119. Botero CA, Montoya MN, 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.
  120. Ülçay A, Görenek L, Coşkun Ö, Araz E , Acar A, Eyigün CP. İmmün yetmezlikli hastalarda intestinal protozoonların tanısı. Türkiye Parazitol. Derg. 2008;32(4):328-333.
  121. Tanyüksel M. , H. Gun, and L. Doganci. 1995. Prevalance of *Cryptosporidium* sp. In patients with neoplasia and diarrhea. Scand. J. Infect. 1995;Dis 27:69-70.
  122. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patients. Clinical Microbiology Rewiews, Ocak. 2002, 145-154.
  123. Yıldız M, Çöplü 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.
  124. Sarı C, Sarı K, Ertuğ S, Kronik Böbrek Yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* sp. Ve Blastocystis hominis Sıklığının Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2003;27(3):187-190.
  125. *Cryptosporidiosis* Dr. Nuran Türkçapar. Ankara Üniv. Tıp. Fak. Klinik Bakteriyoloji ve inf. Has. ABD <http://www.odevsel.com> .
  126. Lewthwaite P, Gill GV, Hart CA, Beeching NC, 2005. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. Curr Opin. Infect 2005;Dis, 18: 427-35.

127. Chen W, Harp JA, Harmsen AG, Requirements for CD4 cells and gamma interferon in resolution and established *Cyrtosporodium parvum* infection in mice. *Infect immun.* 1993;61:3548-3551.
128. Urban J, Fayer R, Chen S, Gause WC, Gately MK, Finkelman FD. IL 12 protect immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *cyrptosporodium parvum*. *J Immunol* 1996;156, 263-268.
129. McDonald V, Bancroft GJ, Immunology of intracellular parasitism. In:Chemical immunology and allergy. Liew FY,Cox FEG(eds). Karger , Basel, 1998;70:103-123.
130. Solorzano –Santos F, Penagos-Peniagua M, Meneses- Miranda B, Andulo-Gonzoles D. *Cryptosporidium parvum* infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a mexican rural population. *Rev Invest Clin.* 2000;52(6):625-31.
131. Okay GE. HIV/AIDS hasatalarında Elisa yöntemi ile *cyrptosporodium* türlerinin sıklığının araştırılması,uzmanlık tezi,Haseki eğitim ve araştırma hastanesi enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniği,İstanbul 2006.
132. İnceboz T, Sarı B, Orhan V. Gastrointestinal şikayetleri olan olgularda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 2006; 26: 149-150.
133. Atambay M, Daldal N, Çelik T. Malatyada ishallerde *Cyrtosporodium* sp. araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 2003;26:149-150.
134. Smith A. Reacher M, Smerdon W. Adak GK, Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales,1992-2003. *Epidemol Infect.* 2006;134(6):1141-9.
135. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreake in Milwauke of *Cyrtosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl. J Med Sci.* 1994;161-167.
136. Fayer R, Trout JM, Jenkins MC, infectivite of *cyrptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental tempratures. *J Parasitol.* 1998;84(6):1165-9.
137. Soave R, Weikel CS, *cyrptosporidium* 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.
138. Leav BA, Mackam, Ward HD. *Cyrtosporidium* species:new insights and old challenges. *Clin infect* 2003;Dis. 36(7):903-8.

139. Jex AR, Pangasa 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.
140. Moss DM, Bennett SN, 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.
141. Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an Enzyme- Linked Immunoassay for the Detection of *Cryptosporidium* Antigen in Fecal Specimens of HIV/AIDS Patients. *Indian J Pathol Microbiol*, 2008; 51(1):137.
142. Bajeva UK. Acid fast staining versus ELISA for detection of *Cryptosporidium* in stool. *J Commun Dis*, 1998; 30(4): 241-244.
143. . El Shazly AM, Soltan DM, 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.
144. Direkel Ş, Özerol İH, Durmaz R. İshalli Hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemleriyle Araştırılması. *Mersin Üniv. Sağlık Bilim Derg*, 2008;1(1): 20-25.
145. Yılmaz H, Tas CZ, Çiçek M. Investigation of Cryptosporidiosis by enzyme- linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Med J*. 2008; 29(4): 526-529.
146. Bern C, Hernandez 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.
147. Dietz VJ, Roberts JM, National surveillance for infection with *Cryptosporidium parvum* 1995-1998: what have we learned? *Public Health Rep* 2000;115(4):358-63.
148. Iqbal J, Hira PR, Al-Ali F Philip R. Cryptosporidiosis in Kuwaiti children: seasonality and endemicity. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(5):261-6.
149. Alıcı Ö, Akbaş E, Alıcı S. Kanser hastalarında fırsatçı enfeksiyonlar. *Türk Onkoloji Dergisi* 2008;23(3):153-162.