

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSHALLİ DIŞKILARDA *MICROSPORIDIUM* SPP.
VE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.' NİN SAPTANMASI
PCR YÖNTEMİ İLE TÜR TAYİNİNİN YAPILMASI**

SELMA USLUCA

TIBBİ PARAZİTOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSHALLİ DIŞKILARDA *MICROSPORIDIUM* SPP.
VE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.' NİN SAPTANMASI
PCR YÖNTEMİ İLE TÜR TAYİNİNİN YAPILMASI**

TIBBİ PARAZİTOLOJİ

DOKTORA TEZİ

SELMA USLUCA

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. ÜMİT AKSOY

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2005.KB.SAG.025 numara ile desteklenmiştir.)

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp	7
2.1.1 TARİHÇE	7
2.1.2 TAKSONOMİ	8
2.1.3 MORFOLOJİ	8
2.1.4 YAŞAM DÖNGÜSÜ	9
2.1.4.1 Ekskistasyon.....	9
2.1.4.2 Merogoni.....	9
2.1.4.3 Gametogoni	9
2.1.4.4 Fertilizasyon.....	9
2.1.4.5 Ookist duvar oluşumu	9
2.1.4.6 Sporogoni	10
2.1.5 PATOGENEZ	11
2.1.6 KLİNİK	12
2.1.6.1 İmmun Sistemi Sağlam Kişide Klinik.....	13
2.1.6.2 İmmun Sistemi Baskılanmış Kişide Klinik	13
2.1.7 İMMUNİTE	14
2.1.7.1 Hücresel İmmunite.....	14
2.1.7.2 Humoral İmmunite	15
2.1.8 EPİDEMİYOLOJİ	15
2.1.8.1 Risk Faktörleri.....	15

2.1.8.2 Bulaş Yolları ve Bulaş Kaynakları	16
2.1.8.3 Mevsimsel Dağılım	18
2.1.8.4 Ülkelerin Gelişmişlik Düzeyine Göre Parazitin Dağılım Özellikleri	18
2.1.9 TANI	19
2.1.9.1 Direkt Tanı Yöntemleri	19
2.1.9.2 İndirekt Tanı Yöntemleri.....	23
2.1.10 TEDAVİ	24
2.1.10.1 Destek Tedavi.....	24
2.1.10.2 Antimotiliter Ajanlar	24
2.1.10.3 Kemoterapötik Ajanlar	24
2.1.10.4 Antiretroviral Ajanlar	25
2.1.10.5 İmmunoterapi.....	25
2.1.11 KORUNMA	25
2.2 <i>Microsporidium</i> spp	26
2.2.1 TARİHÇE	27
2.2.2 TAKSONOMİ	27
2.2.3 MORFOLOJİ	29
2.2.4 YAŞAM DÖNGÜSÜ	30
2.2.4.1 Enfektif Evre	30
2.2.4.2 Merogoni.....	31
2.2.4.3 Sporogoni	31
2.2.5 PATOGENEZ	32
2.2.5.1 Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları	32
2.2.5.2 Hepatobiliyer Kanal Enfeksiyonları	32
2.2.5.3 Sistemik Enfeksiyonlar	32
2.2.6 KLİNİK	33
2.2.6.1 Sindirim Sistemi Enfeksiyonları	34
2.2.6.2 Sistemik Enfeksiyonlar	34
2.2.7 İMMÜNİTE	36
2.2.7.1 Hücresel İmmunite.....	36
2.2.7.2 Humoral İmmunite	36
2.2.8 EPİDEMİYOLOJİ	37

2.2.8.1 Risk Faktörleri.....	37
2.2.8.2 Bulaş Yolları ve Bulaş Kaynakları	37
2.2.8.3 Mevsimsel Dağılım	39
2.2.8.4 Ülkelerin Gelişmişlik Düzeyine Göre Parazitin Dağılım Özellikleri	39
2.2.9 TANI.....	40
2.2.9.1 Direkt Tanı Yöntemleri	41
2.2.9.2 İndirekt Tanı Yöntemleri	45
2.2.9.3 Histopatolojik Tanı Yöntemleri.....	46
2.2.10 TEDAVİ	46
2.2.11 KORUNMA	47
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	49
3.1 ÇALIŞMA GRUBU	49
3.3.1 Dışkı Örneklerinin İshal Derecelerinin Değerlendirilme Kriterleri	49
3.3.2 Dışkı Örneklerinin Saklanması	50
3.2 YÖNTEMLER	51
3.2.1 Dışkı Örneklerinin Mikroskopi ile Değerlendirilmesi	51
3.2.1.1 Dışkı Örneklerinin <i>Cryptosporidium</i> spp. Açısından Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi.....	51
3.2.1.2 Dışkı Örneklerinin <i>Microsporidium</i> spp. Açısından Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi	53
3.2.2 Dışkı Örneklerinin Moleküler Yöntemle Değerlendirilmesi	55
3.2.2.1 Dışkı Örneklerinin <i>Cryptosporidium</i> spp. Açısından Moleküler Yöntemle Değerlendirilmesi	55
3.2.2.2 Dışkı Örneklerinin <i>Microsporidium</i> spp. Açısından Moleküler Yöntemle Değerlendirilmesi.....	61
3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	64
4. BULGULAR	65
4.1 OLGULARA AİT BULGULAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.1.1 Olguların Demografik Özellikleri	65
4.1.2 Olgulara Ait Klinik Bulgular.....	65
4.1.3 Olgulara Ait Çevresel Faktörler	67

4.2 CRYPTOSPORIDIUM SPP. SAPTANAN OLGULARA AİT BULGULAR	68
4.2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp. Saptanan Olguların Demografik Özellikleri	68
4.2.2 <i>Cryptosporidium</i> spp. Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular	69
4.2.3 <i>Cryptosporidium</i> spp. Saptanan Olgulara Ait Çevresel Faktörler.....	72
4.2.4 <i>Cryptosporidium</i> spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirmesi	73
4.2.5 <i>Cryptosporidium</i> spp. Saptanan Olguların PCR Sonuçları.....	77
4.2.6 <i>Cryptosporidium</i> spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirme ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	80
4.3 MICROSPORIDIUM SPP. SAPTANAN OLGULARA AİT BULGULAR	81
4.3.1 <i>Microsporidium</i> spp. Saptanan Olguların Demografik Özellikleri.....	81
4.3.2 <i>Microsporidium</i> spp. Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular	82
4.3.3 <i>Microsporidium</i> spp. Saptanan Olgulara Ait Çevresel Faktörler	83
4.3.4 <i>Microsporidium</i> spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirmesi	83
4.3.5 <i>Microsporidium</i> spp. Saptanan Olguların PCR Sonuçları.....	85
4.3.6 <i>Microsporidium</i> spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirme ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	86
5. TARTIŞMA.....	88
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	112
7. KAYNAKLAR.....	114
8. EKLER	132

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Microsporidiaların sınıflandırması	28
Tablo 2: Microsporidiaların PCR ile saptanmasında kullanılan primerler	43
Tablo 3: <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin PCR'ında kullanılan primerler	58
Tablo 4: <i>Microsporidium</i> spp.'nin PCR'ında kullanılan primerler	63
Tablo 5: Uygulanan antibiyotik tedavisi	66
Tablo 6: Diğer yakınmalarla <i>Cryptosporidium</i> spp. saptanması arasındaki ilişki	69
Tablo 7: <i>Cryptosporidium</i> spp. saptanan olgularda parazit yoğunluğu	73
Tablo 8: Kinyoun acid fast boya yöntemi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	80
Tablo 9: Pozitif olgularda <i>Microsporidium</i> spp. yoğunluğu	84
Tablo 10: Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi ile PCR sonuçlarının karşılaştırılması	86
Tablo 11: <i>Microsporidium</i> spp. için boyalı preparattaki etkenin yoğunluğu ile PCR sonuçlarının karşılaştırılması	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>Cryptosporidium</i> 'un yaşam döngüsü	10
Şekil 2: Microsporidia spor morfolojisi	30
Şekil 3: Microsporidiaların yaşam döngüsü	31
Şekil 4: Bristol dışkı skalası	50
Şekil 5: İmmun sistemi baskılanmış hastaların dağılımı	67
Şekil 6: Yaş gruplarının <i>Cryptosporidium</i> spp. görülmesi üzerine etkisi	68
Şekil 7: İshal dereceleri ile <i>Cryptosporidium</i> spp. görülmesi arasındaki ilişki	70
Şekil 8: İmmun sistemi baskılayan hastalık ve buna yönelik ilaç kullanımı ile <i>Cryptosporidium</i> spp. saptanması arasındaki ilişki	71
Şekil 9: İçme suyu ile <i>Cryptosporidium</i> spp. arasındaki ilişki	72
Şekil 10.a : “20 alanda 1’den az” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü	74
Şekil 10.b : “20 alanda en az 1” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü	75
Şekil 10.c : “Her alanda 1-10 arası” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü	76
Şekil 10.d : “Her alanda 11-100 arası” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü	77
Şekil 11.a: <i>Cryptosporidium</i> spp. saptanan olguların %1 agaroz jelde PCR sonuçları	78
Şekil 11.b: <i>Cryptosporidium</i> spp. saptanan olguların %1 agaroz jelde PCR sonuçları	78
Şekil 12.a: <i>Cryptosporidium</i> spp. pozitif olguların % 2 agaroz jelde RFLP sonuçları	79
Şekil 12.b: <i>Cryptosporidium parvum</i> pozitif olguların % 2 agaroz jelde RFLP sonuçları	80
Şekil 13: <i>Cryptosporidium</i> spp. parazit yoğunluklarının PCR sonuçları ile karşılaştırılması	81
Şekil 14: Yaş gruplarının <i>Microsporidium</i> spp. görülmesi üzerine etkisi	82
Şekil 15: İmmun sistemi baskılayan hastalık ve buna yönelik ilaç kullanımı ile <i>Microsporidium</i> spp. saptanması arasındaki ilişki	83
Şekil 16.a: “her 10 alanda 1’den az” <i>Microsporidium</i> spp. yoğunluğuna ait boyalı preparat görüntüleri	84

Şekil 16.b: “her 10 alanda 1/her alanda 2” <i>Microsporidium</i> spp. yoğunluğuna ait boyalı preparat görüntüleri	85
Şekil 17: <i>E. intestinalis</i> saptanan olguya ait PCR görüntüsü	86
Şekil 18: Her iki etkenin PCR ile saptanma durumu	87

KISALTMALAR

Gal-GalNAc	: Galaktoz-N-asetilgalaktozamin
PgE2	: Prostaglandin E2
PG12	: Prostaglandin G12
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
IL-8	: Interlökin 8
AIDS	: Acured immun deficiency syndrome
CD4 T hücreleri	: Sitotoksik T hücreleri
HIV	: Human immun deficiency virus
PGF2 α	: Prostaglandin F2 alfa
IFN- γ	: İnterferon gamma
Anti-IFN- γ	: Anti interferon gamma
CD8 T hücreleri	: Sitotoksik T hücreleri
DNA	: Deoksiribonükleik asid
AP-PCR	: Arbitrary primed PCR
mRNA	: Messenger RNA
SSU 18S rRNA	: Ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge
TCP-1	: T-kompleks protein 1 delta
COWP	: <i>Cryptosporidium</i> ookist duvar proteini
TRAP-C1	: <i>Cryptosporidium</i> -1 geninin Thrombospondin-related adhesive proteini
TRAP-C2	: <i>Cryptosporidium</i> -2 geninin Thrombospondin-related adhesive proteini
ITS rDNA	: Ribosomal internal transcribed spacer
dhfr-ts	: Dihidrofolat redüktaz-timidilat sentaz
IgG	: İmmunglobin G
IgM	: İmmunglobin M
UV	: Ultraviyole ışını
NTU	: Nefelometrik türbidite ünitesi
μ m	: Mikrometre
LSU rRNA	: rRNA'nın geniş alt ünitesi

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalıőmam sırasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaőan değerli tez danıőmanım Sayın Doç. Dr. Ümit Aksoy'a, tez izleme komitemdeki değerli hocalarım Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Parazitoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. iler Akısü'ye, Sayın Prof. Dr. Hale Akpınar'a, Parazitoloji Bilim Dalı öğretim üyelerine, tezimin istatistiksel analizinin yapılmasında destek olan Sayın Doç. Dr. Türkan Günay'a, çalışma arkadaşlarıma, bu zorlu eğitim süresince beni cesaretlendiren, destekleyen annem, babam, eőime, sabırla çalıőmalarımı tamamlamamı bekleyen oğullarım Salih ve Batur'a teşekkür ederim.

ÖZET

İshalli Dışkılarda *Microsporidium* spp. ve *Cryptosporidium* spp.'nin Saptanması PCR Yöntemi İle Tür Tayininin Yapılması

Selma USLUCA

Dokuz Eylül Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD

**Parazitoloji BD
35340 Balçova-İZMİR**

Amaç: Ülkemizde boyama yöntemi ile tespiti henüz standardize edilememiş olan *Microsporidium* spp.'nin Weber'in trichrome boyama yöntemi ile saptanması, ishallerde *Microsporidium* spp. ve *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında mikroskobik ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması ve her iki parazitin tür ayrımının yapılmasını hedefledik.

Gereç-Yöntem: Ekim 2005- Ocak 2009 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin çeşitli kliniklerine başvuran ve İzmir'in Buca ilçesine ait bir köyde saptanan ishal salgınından elde edilen 162 ishallerde dışkı örneği çalışma kapsamına alındı. Tüm örnekler *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması için Kinyoun acid fast ve *Microsporidium* spp.'nin saptanması için Weber'in trichrome boya yöntemleri ile mikroskobik olarak değerlendirildi. Ayrıca PCR yönteminin geçerliliğinin belirlenebilmesi için her iki parazite bu yöntem uygulandı. Bir sonraki aşamada *Cryptosporidium* ve *Microsporidium* spp.'nin tür ayrımlarının yapılabilmesi için RFLP yöntemi uygulandı.

Bulgular: Kinyoun acid fast boya yöntemi ile 18 olgunun dışkı örneğinde *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptandı. PCR yöntemi ile bu 18 olgudan 15'inde ve boya yöntemi ile negatif olarak değerlendirilen 6 olguda *Cryptosporidium* spp.'ye özgü bant saptandı. PCR ile parazit saptanan olgulara RFLP yöntemi uygulandı. Olgulardan birinde *Cryptosporidium meleagridis*'e, 20 olgunun dışkı örneğinde ise *Cryptosporidium parvum*'a özgü bantlar saptandı.

Weber'in trichrome boya yöntemi ile 4 olgunun dışkı örneğinde *Microsporidium* spp. sporları saptandı. PCR yöntemi ile bu olgulardan sadece birinde *Microsporidium* spp.'ye özgü bantlar saptandı. PCR amplifikasyonunda tüm türlere yönelik primerler olan "panmicrosporidian primerler" kullanılarak tür ayrımı yapıldı. PCR ile parazit saptanan olgunun dışkı örneğinde *Encephalitozoon intestinalis*'e özgü bantlar saptandı.

Sonuç: *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında PCR yönteminin önemli bir yeri olduğuna, özellikle parazitin yoğun olduğu dışkılarda paraziti saptama gücünün yüksek olduğuna karar verildi. *Microsporidium* spp.'nin saptanmasında ise boya yönteminin tanıda geçerliliğini koruduğu, uygun DNA ekstraksiyon prosedürünün oluşturulmasına yönelik moleküler çalışmaların yapılması gerektiği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium* spp., *Microsporidium* spp., Kinyoun acid fast, Weber'in trichrome boyası, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Detection of *Microsporidium* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Diarrheic Stool Samples, Identification of Species by PCR

Selma USLUCA

Dokuz Eylul University Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Department of Parasitology

35340 Balçova-İZMİR

Aim: Our objective was to use Weber's trichrome staining method in detection of *Microsporidium* spp. of which convenient staining method for diagnosis yet to be standardized in our country, and to compare effectiveness of microscopy and PCR methods in detection of *Microsporidium* spp. and *Cryptosporidium* spp. in diarrheic stool samples and species identification of both parasites.

Materials and Methods: Stool samples of 162 diarrheic patients who attended to various clinics of Hospital of Faculty of Medicine, University of Dokuz Eylul between October 2005 and January 2009 and of patients in an outbreak of diarrhea which took place in a village in Buca district of İzmir, were included in our study. All samples were stained by Kinyoun acid-fast method to search *Cryptosporidium* spp. and by Weber's trichrome staining method to search *Microsporidium* spp. and were examined by microscopy. Additionally, PCR was used for both parasites to test its validity as a diagnostic tool. In succeeding step, RFLP was used in species identification of both, *Cryptosporidium* spp. and *Microsporidium* spp.

Results: Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were detected in 18 cases by Kinyoun acid fast staining method. PCR revealed *Cryptosporidium* spp. spesific bands in 15 of 18 patients who were staining positive and 6 of staining negative patients. RFLP method was applied to PCR positive stool samples and one sample had *Cryptosporidium meleagridis* spesific band while remaining 20 samples had *Cryptosporidium parvum* spesific bands.

We observed spores of *Microsporidium* spp. in stool samples of 4 cases stained by Weber's trichrome method and only one of them was positive in PCR.

Panmicrosporidian primers were used in amplification and PCR positive patient revealed *Encephalitozoon intestinalis* specific bands.

Conclusion: PCR is an important diagnostic tool in diagnosis of *Cryptosporidium* spp., especially in cases with high parasite density. In diagnosing *Microsporidium* spp., staining procedure sustains its validity and more molecular studies are needed to supply convenient DNA extraction procedure.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., *Microsporidium* spp., Kinyoun acid fast, Weber's trichrome, PCR-RFLP.

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Cryptosporidium spp. özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde kolera tarzı ishale yol açan bir protozoondur. Tanıda formalin- etil asetat çoklaştırma yöntemi sonrası boyalı preparat bakısı yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak preparat hazırlanması ve mikroskopik bakıda deneyimli bir uzmana gereksinim duyulması, az sayıdaki parazitin gözden kaçabilme olasılığı yöntemin kısıtlılıklarıdır. Moleküler biyolojik yöntemler arasında yer alan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) daha duyarlı sonuç vermesi nedeniyle tanıda ön plana çıkmıştır. PCR yöntemi çok az miktardaki parazitin bile saptanabilmesini ve saptanan parazit deoksiribonükleik asidlerinin (DNA) milyonlarca kez çoğaltılmasını sağlamakta, elde edilen üründen restriction length polymorphism yöntemi (RFLP) ile parazitin tür ayrımı yapılabilmektedir.

Microsporidium spp. genellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde uzun süreli, şiddetli, ishalleri yol açmaktadır. Histokimyasal bir boyama tekniği olan Weber'in modifiye trichrome boyası ile etken tanımlanabilmektedir. Ancak kesin tanı için PCR zorunludur (1). Noninvaziv yöntemlerle alınan hasta örneklerinde, tanı ve tür ayrımı için PCR son yıllarda önem kazanan bir yöntemdir (2).

Özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde önemi giderek artan *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp.'nin türlerinin saptanarak bu türlerin klinik tabloya etkilerinin belirlenmesi ve her iki etkenin de doğru tanı yöntemleri ile tanımlanarak toplum sağlığı açısından önemlerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu düşünceden yola çıkarak çalışma grubu, her iki etkenin saptanma olasılığının yüksek olduğu ishalleri hastalardan oluşturulmuştur.

Çalışmamızda ülkemizde boyama yöntemi ile tespiti henüz standardize edilememiş olan *Microsporidium* spp.'nin Weber'in trichrome boyama yöntemi ile saptanmasının standardize edilmesi ve PCR ile tür ayrımının yapılması temel hedeflerimiz arasında yer almaktadır.

Uzun süreli ishali olan olguların etiolojisinin araştırılmasında *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. enfeksiyonlarının göz önünde bulundurulması ve bu etkenlerin türlerinin belirlenebilmesi ile etkene yönelik standart bir tanı ve tedavi protokolünün oluşturulması mümkün olacaktır.

Sonuçlarımız *Cryptosporidium* spp.'nin zoonotik ve antroponotik bulaş kaynağının belirlenmesine yönelik çalışmalara da katkı sağlayacaktır. Diğer açıdan *Microsporidium* spp.'nin ülkemizde sık görülen türlerinin tanımlanmasına, ayrıca vücuttaki lokalizasyonu, tutulan organ ve sistemler ile bağlantılı kliniği, prognozu ve tedavisinin belirlenmesine yönelik verilerin toplanmasına yardımcı olacaktır. Moleküler yöntemlerle insan microsporidiosis olgularını ortaya koyan çalışmaların henüz yeni gelişmekte olduğu ülkemizde, elde ettiğimiz verilerin hem ulusal bilgi birikiminin oluşmasına katkıda bulunacağı, hem de uluslararası platformda ülkemizi temsil edecek verilerin oluşmasına olanak sağlayacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium türleri omurgalıların sindirim ve solunum sistemlerinin mikrovilluslarında yerleşen, zoonotik öneme sahip koksidian parazitlerdir (3, 4). Tüm dünyada yaygın görülen parazit, memeliler, kanatlılar, balıklar ve sürüngenleri de içine alan 200'ü aşkın canlı türünde enfeksiyona neden olmaktadır (5).

Klinik tablo enfekte konağın türüne, immun sisteminin durumuna ve yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (3). İmmun sistemi sağlam olanlarda yaklaşık 2 haftada kendini sınırlayan ishal ile karakterize olup, nadir olarak abdominal kramplar, bulantı, ateş ve kilo kaybı gözlenmektedir. İmmun sistemi baskılanmış kişilerde ise, günde 20 litreye varabilen kolera benzeri ishale neden olup, yaşamı tehdit edici bir tablo oluşturabilmektedir (6).

2.1.1 *CRYPTOSPORIDIUM* TARİHÇE

Clark 1895 yılında ilk kez fare mide epitelinde yerleşen spor kümelerini "swarm sporlar" olarak tanımlamıştır. Tyzzer 1907 yılında laboratuvar faresinin mide epitelini enfekte eden bu paraziti, sporozoitlerin etrafını saran sporokistleri olmadığı için önceden bilinen koksidianlara benzemeyen yeni bir cins olarak isimlendirmiştir (7). Aynı bilim adamı 1910 yılında *Cryptosporidium muris*'i (*C. muris*), 1912'de farenin sadece ince barsağında gelişim dönemi geçiren *C. muris*'ten daha küçük olan *Cryptosporidium parvum*'u (*C. parvum*) yeni bir tür olarak bildirmiştir (7, 8, 9, 10). Slavin 10-14 günlük hindilerde şiddetli ishal ve ölüme neden olan yeni bir tür olan *Cryptosporidium meleagridis*'i (*C. meleagridis*) tanımlamıştır (7, 8). 1961'den 1986'ya

dek yapılan çalışmalarda ookist yapısına dayanarak balıklar, sürüngenler, kuşlar ve memelilerde görülen 19 farklı türü olduğu bildirilmiştir (7).

2.1.2 CRYPTOSPORIDIUM TAKSONOMİ

Cryptosporidium türlerinin sınıflandırması, ilk olarak etkenin konak spektrumu, ookist morfolojisi ve enfekte ettiği doku dikkate alınarak yapılmıştır (3, 11, 12, 13). Parazit Apikompleksa şubesi, Sporozoasida sınıfı, Coccidiasina alt sınıfı, Eucoccidiorida takımı, Eimeriorina alt takımı, Cryptosporidiidae ailesinde yer almaktadır (7).

Son yıllarda moleküler çalışmalar *Cryptosporidium*'un taksonomisi ve türlerinin ayırımında yararlı olmuştur (9, 14). Özellikle PCR-RFLP ve sekans analizi gibi yöntemlerle tür ayırımı doğrulaması yapılmaktadır (11, 15). PCR yöntemi kullanılarak spesifik gen bölgelerinin çoğaltılması ile parazitin biyolojik özellikleri ve bulaş yolu hakkında daha fazla bilgi edinilmiştir. Bu çalışmalar *Cryptosporidium*'un insanda enfeksiyona neden olan *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*) (önceden *C. parvum* tip I veya *C. parvum* insan genotipi olarak isimlendirilen) ve *C. parvum* (önceden *C. parvum* tip II veya sığır genotipi olarak isimlendirilen) iki genotipi olduğunu göstermiştir (12, 16, 17). *C. hominis* yüksek konak adaptasyonu ve çok az genetik varyasyon gösterirken, *C. parvum* geniş bir konak spektrumu göstermekte ve birçok genotip içermektedir (16).

2.1.3 CRYPTOSPORIDIUM MORFOLOJİ

Cryptosporidium spp. mide ve barsak epitel hücrelerinin mikrovillus bölgelerinde, hücrenin ekstrasitoplazmik alanında yerleşim göstermesi nedeniyle diğer hücre içi parazitlerden ayrılır. Konak hücreden köken alan bu bölge "parazitofor vakuol" adını alır (7, 8, 18). Enfektif form olan ookistlerin yaklaşık %80'i çevresel koşullara dirençli olan kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlı ookistlerdir (7, 10, 11). Dışkı ile dışarı atılan ookistler 2-6 µm çapında, kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde dört sporozoit bulunmaktadır. Diğer koksidian parazitlerden farklı olarak ookistlerinin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistleri yoktur (*Cryptosporidium*= gizli sporokist). Sporozoit formları 4.9x1.2 µm çapındadır. Sporozoitlerden oluşan trofozoitler ise 2-2.5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapılardır (18, 19).

2.1.4 CRYPTOSPORIDIUM YAŞAM DÖNGÜSÜ

Cryptosporidium spp. zorunlu hücre içi yerleşim gösteren monoksen bir parazittir (18). Yaşam döngüsünü konağın gastrointestinal kanalında, mukozal epitel hücrelerinde tamamlamaktadır (11, 18). Konak dışında geçirdiği tek evre ookist evresidir (7, 8). Enfekte konakta görülen 6 evre aşağıda açıklanmıştır.

2.1.4.1 Ekskistasyon

Enfekte konağın dışkı ile atılan ookistlerin ağız yolu ile alınması sonucu ookistler açılır ve sporozoitler dışarı çıkar. Sporozoitler konak hücreye invazyonda görevli olan roptri, mikronem ve dens granüllerden oluşan apikal kompleks ile barsağın apikal yüzeyindeki hücrelere tutunur (20). Bunu izleyen gelişim evreleri “parazitofor vakuol” içerisinde geçer (7, 8, 18).

2.1.4.2 Merogoni

Sporozoitler yuvarlaklaşarak tek çekirdekli trofozoit formuna dönüşür. Trofozoit içindeki çekirdeğin bölünmesiyle 6-8 çekirdek ve bunların her birinden 6-8 merozoit oluşur. Bu merozoitleri taşıyan ana hücreye Tip I meront (şizont) denir. Tip I merontlardan oluşan merozoitler yeni konak hücreleri istila ederek Tip I ve II merontları oluşturur (7, 18, 21). Tip I merontlardan köken alan merozoitler konakta yeni hücreleri enfekte ederek tekrar bir merogoni başlatır (21).

2.1.4.3 Gametogoni

Tip II merontlardan oluşan merozoitler yeni konak hücreleri invaze ederek mikrogamont veya makrogamontun olduğu eşeyli üremeyi (gametogoni) başlatır (7, 21).

2.1.4.4 Fertilizasyon

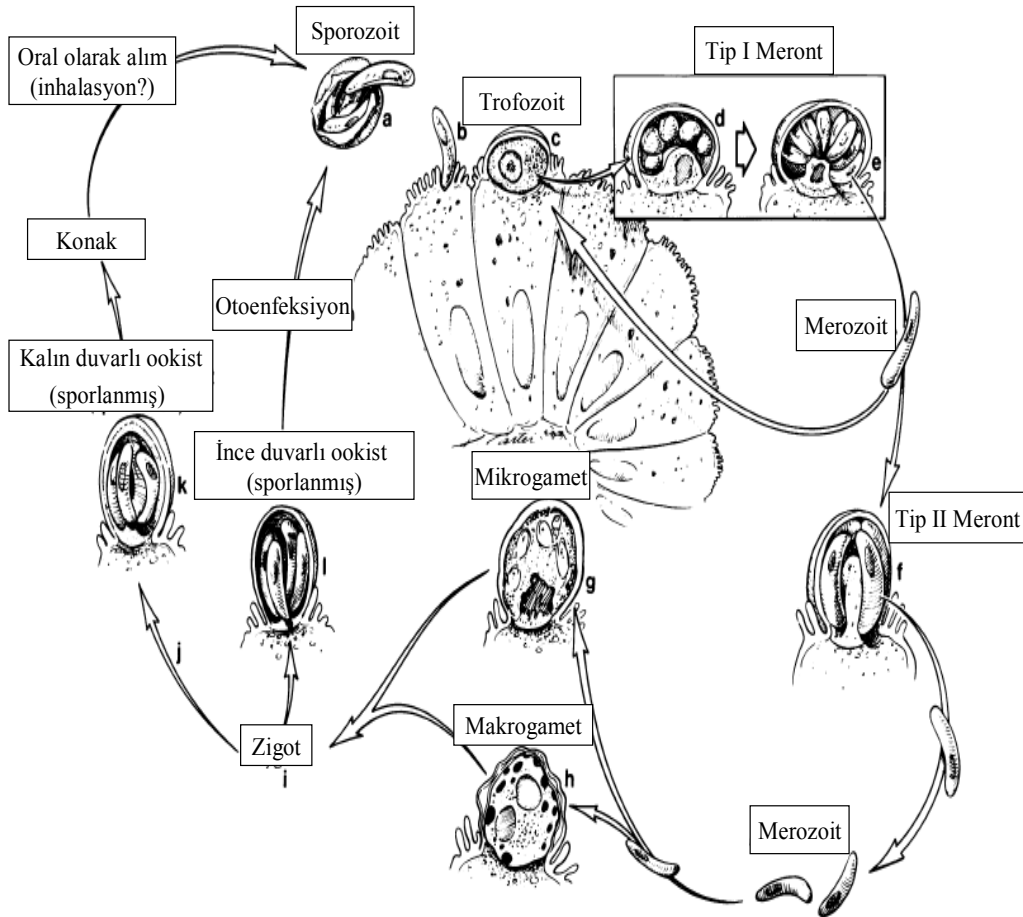
Olgunlaşma sırasında mikrogametositler, makrogamontları dölleyecek olan mikrogametleri oluşturur (7, 21).

2.1.4.5 Ookist duvar oluşumu

Döllenen makrogametlerden olgunlaşmamış ookistler oluşur (7, 19).

2.1.4.6 Sporogoni

Bu olgunlaşmamış ookistlerin gelişmesiyle, içlerinde enfeksiyon yapabilme yeteneği olan 4 sporozoit taşıyan olgun ookistler oluşur (7, 19). Dışkı ile atılan, içerisinde 4 sporozoit bulunan kalın duvarlı ookistlerin yeni bir konak tarafından sindirim yolu ile alınması sonucu enfeksiyon oluşur (7, 10, 11, 18). İnce duvarlı ookistler otoenfeksiyondan sorumludur (7, 10, 11). Konak hücreden salındıktan sonra sporozoitlerin etrafını saran membran rüptüre olur ve açığa çıkan invaziv formlar, diğer enterositlerin mikrovillus bölgelerine penetre olarak yeni bir yaşam siklusunu başlatır (7).



Şekil 1. *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü (7).

2.1.5 CRYPTOSPORIDIUM PATOGENEZ

Cryptosporidium, sindirim kanalının hemen her bölgesinde yerleşebilmekte, ancak en ağır enfeksiyon, jejunum bölgesinde yerleşmesi durumunda görülmektedir (22, 23). İmmun sistemi sağlam kişilerde temelde ince barsağın son kısımlarında ve proksimal kolonda yerleşir. Enfeksiyonun kan yoluyla yayılımı kanıtlanamamış, ancak mukoza boyunca yayılım olduğu düşünülmektedir (20). İmmun sistemi baskılanmış kişilerde mide, safra kanalları, pankreasta enfeksiyon yapabildiği gibi solunum sistemini de tutabilir (20, 22, 23).

Patogeneizde konak-parazit etkileşimi ve buna bağlı invazyonun kritik rol oynadığı düşünülmektedir. Etkenin tutunma ve invazyonunda birçok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Tutunma sırasındaki konak-parazit etkileşimi, invazyon ve parazitofor vakuolün oluşumu, birçok parazit ligandı ve konak reseptörü aracılığıyla meydana gelmektedir. Konak-parazit etkileşiminde rol oynayan, parazite ait birçok yüzey ve/veya apikal kompleks proteini (CSL, GP900, p23/27, TRAP C1, GP15, CP60/15, cp47, gp40/45 ve gp15/Cp17) bilinmektedir (15). Sporozoit spesifik lektin adherans faktörün, barsak yüzeyine tutunmada rolü olduğu bildirilmektedir. Sporozoitin tutunmasıyla epitel mukoza hücrelerinden sitokin salınımı gerçekleşmekte, fagositler aktive olmaktadır. Aktive olan bu hücreler barsaktan su ve klorid sekresyonunu arttıran, hatta absorpsiyonunu engelleyen histamin, serotonin, adenosin, prostaglandinler, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör gibi solubl faktörlerin salınımını sağlamaktadır. Sodyum emilim bozukluğunun, hem villus yüzeyinin azalması, hem de inflamatuvar hücrelerden salınan prostaglandin E₂ (PGE₂) aracılığıyla meydana gelen inhibisyona bağlı olduğu bildirilmiştir (24).

Barsak tutulumunda histolojik değişiklikler nonspesifiktir ve villus atrofisi, kript hiperplazisi, lamina proprianın inflamatuvar hücrelerle infiltrasyonu şeklindedir (25, 26). Ağır enfeksiyonda villus atrofisi, kript hiperplazisi, belirgin lenfosit, plazma hücresi, hatta nötrofil infiltrasyonu, ekstraintestinal tutulum görülmektedir (20, 25). Bu morfolojik değişikliklerin şiddeti, organizmanın sayısı ile ilişkilidir. Villuslar sıklıkla kısa, künt, normalden daha geniş ve birleşmiş durumdadır. Kriptler ise uzamış ve hiperplastiktir. Villus ve kriptlerdeki bu yapısal değişiklikler alttaki lamina propriadaki

lenfoid hücreler, makrofajlar ve nötrofillerle inflamatuvar infiltrasyona eşlik edebilmektedir (26).

Emilim ve sindirim fonksiyonlarının bozulması sonucu barsak mikroflorası artmakta ve barsak duvarında ozmotik basınç artışı, barsak lümenine sıvı geçişi meydana gelmektedir (7). Hücre içi bağlantı kompleksleri aracılığıyla düzenlenen transport defektleri barsak epitelinin bariyer fonksiyonlarının bozulması sonucu ishale katkıda bulunmaktadır (27). Villus yüzeyinin kaybı sonucu sodyum emilim bozukluğu meydana gelmekte (20, 26, 27), klorid sekresyon artışı (20, 27) ve barsak geçirgenliğinin artışı da ishale neden olmaktadır. İshalin prostoglandinler aracılığıyla uyarıldığı ve siklooksigenaz inhibitörleri ile kontrol edildiği düşünülmektedir. Prostoglandin üretimi tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) tarafından uyarılmaktadır (20).

İnce barsak villuslarını kaplayan ve emilimi sağlayan enterositler, etkene ait sporozoit ve merozoitler tarafından istila edilmekte ve hücre ölümüyle sonuçlanan hasarlanma meydana gelmektedir (27). Barsak epitel hücrelerinin farklılaşması ve gelişmesi sırasında apoptozisin, hücrelerin villus yüzeyine doğru hareketinde düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir. *C. parvum*'un, parazitin çoğalması ve gelişmesini artırmak için epitel hücrelerindeki apoptozisi önlediği ve konağın inflamatuvar yanıtını sınırladığı düşünülmektedir. Enfekte epitel hücrelerinin apoptozis ile uzaklaştırılmasının konak epitel bariyer bütünlüğünün korunmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca son zamanlarda *C. parvum* ile enfekte epitel hücre tabakalarından büyük moleküllerin geçirgenliğinde artış olması gibi apoptozisin, enfeksiyonun patogenezinde rolü olduğu bildirilmektedir (28).

2.1.6 CRYPTOSPORIDIUM KLİNİK

İnsanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun oluşması için 10 ookistin alımının yeterli olduğu bildirilmektedir (29). Enfeksiyonun kuluçka süresi 2-21 gün olarak bilinmektedir (30, 31). İnsanlarda enfeksiyonun şiddetini belirleyen en önemli faktör hastanın immunitesidir (8, 11, 25, 30). Hem immun sistemi sağlam, hem de immun sistemi baskılanmış kişilerde en önemli belirti ishaldir (7, 8, 10, 12, 25, 30, 31).

Dışkının karakteristik olarak sulu nitelikte olduğu, mukuslu olabildiği ancak kan ve lökosit içermediği bildirilmektedir (7, 8, 10, 18, 25, 30, 31). Daha az sıklıkla görülen semptomlar bulantı, kusma, karın ağrısı, kilo kaybı, vücut sıcaklığında hafif artış (<39 °C), kas ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlıktır (7, 8, 10, 12, 18, 23, 25, 30, 31, 32, 33).

Enfeksiyonun süresini hem konağa, hem de parazite ait bazı faktörler belirler. Bunlardan konağa ait faktörler konağın yaşı, anneden geçen antikorların varlığı veya daha önceden enfeksiyonla karşılaşılması ve enfektif dozun miktarıdır (15, 22, 29, 30). Ookistlerin orijini, parazitin tür ve alt türleri de parazite ait faktörlerdir (15). Semptomların süresi ve şiddeti ookist atılımının yoğunluğuna bağlı olarak da değişmektedir (7, 10, 30, 31). Enfeksiyonun yerleşim yeri hastalığın şiddetini de etkilemektedir. İnce barsağın üst kısımlarında lokalize olması halinde daha şiddetli ve sulu ishal görülmektedir. Distal ileum ve/veya kalın barsakta tutulum varsa ya klinik belirti vermez ya da aralıklı hafif seyirli ishal olabilmektedir (15).

2.1.6.1 İmmun Sistemi Sağlam Kişilerde Klinik

İmmun sistemi sağlam kişilerde enfeksiyon genellikle 2 hafta kadar sürmekte ve ishal yakınmasının kendiliğinden iyileştiği görülmektedir (7, 11, 15, 18, 23, 25, 27, 30, 32, 33). İshale karın ağrısı, iştahsızlık, kilo kaybı, bulantı, kusma, halsizlik ve hafif derecede ateş de eşlik edebilmektedir (11).

2.1.6.2 İmmun Sistemi Baskılanmış Kişilerde Klinik

İmmun sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyon kısa süreli ishalden, kronik, yaşamı tehdit eden kolera benzeri tabloya kadar değişebilmektedir. Özellikle AIDS, kızamık gibi viral hastalıklarda, lösemi, gamaglobulinemiler, insüline bağımlı diabet, böbrek yetmezliği, karaciğer transplantasyonu ve kanser tedavisi gören hastalarda semptomlar şiddetlidir. Bu hastalarda ishal 2 aydan uzun sürmekte, tüm enfeksiyon süresince dışkı ile ookist atılımı, şiddetli dehidratasyon, kilo kaybı ve malnutrisyon görülmektedir (7, 8, 11, 31). AIDS hastalarında CD4 sayısı 180 hücre/mm³ üzerinde ise enfeksiyonun daha hafif seyrettiği, bu sayının altında olması durumunda enfeksiyonun daha şiddetli olduğu ve süresinin uzadığı bildirilmektedir (7, 8, 22, 25, 27, 30). Bu hastalarda immün sistemi baskılayan durumun ortadan kaldırılması ile

tedavi sağlanabildiği bildirilmektedir (18). Günlük sıvı kaybı ortalama 3-6 litre olmakla birlikte bazen 17 litreye kadar çıkabilmektedir (7, 8, 11, 22, 25, 27, 30).

Cryptosporidium'un başlıca yerleştiği yer barsaklar olmasına karşın (27), immun sistemi baskılanmış hastalarda barsak dışı (safra kanalları, pankreas, mide, solunum sistemi, böbrek) tutulum da görülmektedir (7, 8, 12, 22, 27, 30, 34). Bu hastalarda barsak kanalından hematojen yolla yayılımın gerçekleştiği düşünülmektedir (7, 27). Safra kesesi ve safra kanallarının tutulumunda sağ üst kadranda ağrısı, bulantı, kusma, ishal, ateş, sarılık görülmektedir (7, 25). Pankreas kanalının tutulumu durumunda pankreatit, pankreasta büyüme ve asit bildirilmiştir. Solunum yollarının tutulması durumunda öksürük, hırıltılı solunum, akut laringotrakeit görülebilmektedir (7).

2.1.7 CRYPTOSPORIDIUM İMMÜNİTE

Cryptosporidium enfeksiyonuna karşı konağın direnci ve immünite epitelial ve subepitelial hücreler tarafından düzenlenen doğuştan ve edinilmiş immün yanıtta oluşmaktadır (12, 25, 26).

2.1.7.1 Hücresel İmmünite

Cryptosporidiosisün iyileşmesinde sitotoksik T hücreleri (CD4 T lenfositler) ve IFN- γ önemli rol oynamaktadır (27). Cryptosporidiosisün kontrolünde önemli rolü olan CD4 sayısı AIDS hastalarında 180 hücre/mm³'den yüksek olduğunda enfeksiyon kendini sınırlarken, 100 hücre/mm³'ün altında enfeksiyonun kronikleştiği, 50 hücre/mm³'ün altında ise fulminan enfeksiyon tablosunun geliştiği bilinmektedir (20, 25, 26, 27, 35, 36).

Enfeksiyona karşı oluşan ilk immün yanıt, T-lenfosit artışı sonucu ortaya çıkan barsak enflamasyonudur. Ayrıca interlökin-12 (IL-12), interlökin-8, IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinlerin artışı da görülmektedir (27, 35, 36). IFN- γ 'nın barsaklardan salınımı, oöksit atılımının kontrolünde rol oynamaktadır. IFN- γ tedavisinin barsak epitel hücrelerini aktive ettiği ve enfeksiyonun kısmi olarak temizlenmesini sağladığı bildirilmektedir (15, 20, 25, 26). IL-12'nin IFN- γ üretimini uyaran önemli bir faktör olduğu ve inaktivasyonunun kronik enfeksiyona neden olduğu bildirilmektedir (15, 20, 25, 26, 27).

2.1.7.2 Humoral İmmunite

Cryptosporidium ile enfekte insanlarda parazite karşı antikorlar üretilmektedir. Ancak B hücre sayısı düşük olan yeni doğan farelerde *C. parvum* enfeksiyonunun temizlenebildiği görülmüş, bu nedenle enfeksiyonun temizlenmesinde humoral immunitenin tek başına yeterli olmadığı düşünülmüştür (26).

Cryptosporidium re-enfeksiyonundan korunmada spesifik antikorların başlıca rol oynadığı düşünülmektedir (15). Enfeksiyonda önce immunglobin M (IgM), sonra immunglobin G (IgG) antikor yanıtı oluşmakta, IgG düzeyi birkaç ay içinde azalarak yıllarca pozitif kalabilmektedir. Ayrıca immunglobin A (IgA) ve immunglobin E (IgE) antikorları da artış göstermektedir (35).

2.1.8 CRYPTOSPORIDIUM EPİDEMİYOLOJİ

İlk kez 1976 yılında immun sistemi baskılanmış iki insanda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun gözleendiği (37), ardından 1982 yılında Amerika'da AIDS hastası olan erkekleri kapsayan bir araştırmada 11 yeni olgunun daha saptandığı bildirilmiştir (8). Amerika'da her yıl 15 milyon ishal olgusunun olduğu, bunlardan 300.000'inin *Cryptosporidium* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (37). Gelişmekte olan ülkelerde surveyansın endüstrileşmiş ülkelere göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (7).

2.1.8.1 Risk faktörleri

Cryptosporidium enfeksiyonları için risk faktörleri hayvancılıkla uğraşma, evcil hayvan besleme, veteriner hekimlik ve laboratuvar çalışmaları gibi mesleki faktörler, hijyenik olmayan içme suları, bozuk kanalizasyon sistemleri, epidemik bölgelere seyahat etmek, enfekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama (16, 22, 25, 38), immün sistemin baskılandığı durumlar (12, 22, 25, 37, 39), 0-4 yaş arası ve 60 yaş üstü olma gibi yaş faktörü ve yetersiz beslenme olarak bilinmektedir (22, 25, 37, 38). Homoseksüel ilişkinin hastalığın bulaşında önemli bir yeri olduğu bildirilmektedir (38, 39). HIV pozitif hastalarda CD4 sayısının düşük olması durumunda cryptosporidiosis görülme sıklığının daha fazla olduğu bildirilmektedir (39). Çiğ süt ürünleri ve midye tüketimi de risk faktörleri arasında sayılmaktadır (16).

Cryptosporidiosisin epidemiyolojisini etkileyen birçok faktör mevcuttur. Bunlar: a) Enfektif dozunun düşük olması (16, 20, 22, 25). b) Parazitin küçük boyutlu olması, enfektif formunun çevresel koşullara ve klorin de dahil olmak üzere dezenfektana dirençli olması nedeniyle su kaynaklı bulaşın görülmesi (16, 20, 22). c) Vücuttan atıldığında enfektif olan ookistlerle kişiden kişiye bulaşın da söz konusu olabilmesi. d) Bazı genotiplerinin rezervuar hayvanlar açısından önemli olması nedeniyle hayvanlarla temas sonucu bulaşın sık görülmesi. e) Konak immunitésinin enfeksiyonun süresini ve şiddetini belirlemesidir (16, 20).

Cryptosporidiosis her yaş grubunda görülebilmektedir. Enfeksiyonun görülme sıklığı açısından cinsiyetler arasında fark yoktur (8, 40). Günümüzde güvenli olmayan içme sularının kitlesel yok edici etkisinin anlaşılmasıyla *C. parvum* CDC tarafından biyoterörizm ajanları listesine alınmıştır (41).

2.1.8.2 Bulaş yolları ve bulaş kaynakları

Olası bulaş yolları ve bulaş kaynakları aşağıda verilmiştir.

2.1.8.2.1 İçme suları

Ookistlerin elimine edilmesi için suların filtrasyon ve dezenfeksiyon işlemlerinden geçirilmesi gereklidir (38, 42, 43). Ookistler geleneksel su arıtma yöntemlerine ve dezenfektanlara dirençlidir (33, 38, 42, 43). Hatta yüzey sularında her mevsim canlı kalabildiği bildirilmiştir (33). Ookistlerin küçük boyutlu olması, suda uzun süre canlılığını koruması ve birçok dezenfektana dirençli olması da su kaynaklı salgınların oluşmasında etkili olabilmektedir (40).

2.1.8.2.2 Havuz suları

Dışkı ile kontamine yüzme havuzu sularının yüksek doz klor ile dezenfekte edilmesi ve filtrelerden geçirilmesi bile suların ookistlerden arındırılmasını sağlayamamaktadır (37, 38).

2.1.8.2.3 Besinler

Besin kaynaklı salgınlar bildirilmektedir. Turist ishaline de neden olduğu rapor edilmektedir (40). New York'ta taze elma suyu, İngiltere'de uygun şekilde pastörize

edilmemiş süt, tavuk salatası, çiğ yeşil soğan, taze sebze ve meyvelerle hazırlanan enfekte yiyeceklerle ortaya çıkan salgınlar bildirilmiştir (38).

2.1.8.2.4 Kişiden kişiye bulaş

Kişiden kişiye bulaş ilk kez 1983 yılında laboratuvar kazası sonucu bir kişiden diğerine bulaş şeklinde bildirilmiştir (7). Hijyenin sağlanmasının güç olduğu hastane ve gündüz bakımevlerinden kaynaklanan salgınlar bilinmektedir (38, 40). Anal cinsel ilişki sonucu da bulaş bildirilmektedir (37, 38).

2.1.8.2.5 Hayvandan insana bulaş

Sığır ve koyun başta olmak üzere, birçok hayvanın enfeksiyon kaynağı olduğu bilinmektedir (40). Çiftlik hayvanlarının dışkılarını ile kontamine olan sütlerin pastörize edilmeden tüketilmesi ve yine aynı şekilde kontamine olmuş elmalarla hazırlanan taze elma suyuna bağlı salgınlar ve 1980'lerin başlarında veterinerlik öğrencileri arasında çıkan salgınlar bildirilmiştir. Bu salgınlarda *C. parvum* enfeksiyonunun kaynağının hayvan-insan teması olduğu düşünülmektedir (38). Mesleksen açıdan risk altında bulunan bu kişiler, enfekte hayvanların ıkartılarıyla kontamine olmuş ellerin ağıza götürülmesi ile enfekte olmaktadır (11, 29, 44).

2.1.8.2.6 Diğer potansiyel çevresel kaynaklar

Çiftlikte hayvan dışkılarını ile kontamine suların tarım alanlarına karışması ile bulaş olabilmektedir. Ayrıca Kanada kazısı, Pekin rdeği, midye ve istiridyelerle bulaş gerçekleşebilmektedir (38).

2.1.8.2.7 Hava yolu ile bulaş

Bu bulaş yolu da kanıtlanamamış olmakla birlikte araştırmacılar tarafından teorik olarak kabul edilmektedir (37, 45).

2.1.8.2.8 Sinek, hamamböceği ve diğer potansiyel vektörler aracılığıyla bulaş

Hamambcekleri, ev sinekleri ve mikroskopik su canlıları aracılığıyla bulaş da mümkün olabilmektedir. Kanatlılar aracılığıyla bulaşın da olabileceği bildirilmektedir (38).

2.1.8.3 Mevsimsel Dağılım

Cryptosporidium Antarktika dışında tüm dünyada görülmektedir (20). Enfeksiyon gelişmekte olan ülkelerde ve özellikle ılık ve yağışlı mevsimlerde daha sık görülmektedir (7, 20, 38, 39). Şiddetli yağışların içme suyu olarak kullanılan yüzey sularını kontamine etmesi bulaşta önemli rol oynamaktadır (38, 39). Dünyadaki mevsimsel dağılımı değişkenlik göstermektedir (46). Türkiye’de ise enfeksiyonun bahar aylarında yükseldiği, Eylül ve Ekim aylarında pik yaptığı belirtilmektedir (47).

2.1.8.4 Ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre parazitin dağılım özellikleri

2.1.8.4.1 Dünyadaki dağılım

Cryptosporidium ookistlerinin laboratuvar tanısının gelişmesi, halk sağlığı çalışanlarının bu hastalığa karşı daha bilinçli olması ve hastalığın bildirimini düzenli şekilde yapılması nedeniyle 1989-1994 yılları arasında cryptosporidiosis olgularının sayısında artış görülmüştür. 1996 yılından sonra AIDS hastalığı için alınan koruyucu önlemlerdeki artış nedeniyle olguların sayısında azalma görülmüştür (39).

İshalli immun sistemi sağlam 130.000 hasta üzerinde Asya, Afrika, Latin Amerika gibi gelişmekte olan bölgelerde yapılan 43 çalışma ve Avrupa, Kuzey Amerika, Avustalya gibi endüstrileşmiş ülkelerde yapılan 35 çalışma değerlendirilmiş, gelişmekte olan ülkelerde %6.1, gelişmiş ülkelerde %2.1 oranında *Cryptosporidium* enfeksiyonu bildirilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde yapılan 9, gelişmiş ülkelerde yapılan 13 çalışma sonucu toplam 1.500 ishal yakınması olan HIV pozitif hastada *Cryptosporidium* enfeksiyonu oranının gelişmekte olan ülkelerde %24, gelişmiş ülkelerde ise %14 olduğu bildirilmiştir (38).

İki ayrı tür olan *C. parvum* ve *C. hominis*’in insanlardaki coğrafik dağılımının farklı olmasının nedeni, bulaş yollarının ayrı olması ile açıklanmıştır. Avrupa ülkelerinde tarım hayvanlarından bulaş temel bulaş yolunu oluşturduğu için *C. parvum* ile zoonotik bulaşın ön planda olduğu görülmektedir. Dünyanın diğer bölgelerinde *C. hominis* ile antropotik bulaşın ön planda olduğu bildirilmektedir (48).

Avrupa’da insan enfeksiyonlarının kaynağını araştırmaya yönelik genotiplendirme çalışmaları sonucunda hem zoonotik, hem de antropotik genotiplerin görüldüğü

belirlenmiştir. Portekiz’de AIDS hastalarında sırasıyla *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis* ve *C. meleagridis* türleri saptanmıştır. Salgınlar değerlendirildiğinde *C. hominis*’in seyahat etmekle, *C. parvum*’un ise çiftlik hayvanlarına temasla ilişkili olduğu düşünülmüştür (16).

2.1.8.4.2 Türkiye’deki dağılım

Türkiye’de yapılan çalışmalarda enfeksiyonun prevalansının %0-35.5 olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde ishalleri olgular üzerinde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, Özcan ve ark. %11.8, Mıstık ve ark. %2.9, Tanyüksel ve ark. %16.9, Ok ve ark. %35.5, Ok ve ark. bir başka çalışmalarında %30.4, Özçelik ve ark. %11.8, Doğan ve ark. %3.6, Yücel ve ark. %7.1, Aksoy ve ark. %7.8 oranında enfeksiyon bildirmiştir (49).

2.1.9 CRYPTOSPORIDIUM TANI

Cryptosporidium enfeksiyonunun tanısında kullanılan yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

Direkt tanı yöntemleri

a- Mikroskopik tanı

b- Moleküler tanı

İndirekt tanı yöntemleri

a- Enzim immün assay (ELISA)

b- İndirekt floresan antikor testi (IFAT)

Histopatolojik tanı yöntemleri (50).

2.1.9.1 Direkt tanı yöntemleri

2.1.9.1.1 Mikroskopik tanı

Dışkı örnekleri basit boya yöntemleri, faz kontrast ve karanlık alan mikroskopisi, floresan mikroskobu ile değerlendirilmektedir (18, 20, 40).

Dışkının mikroskopik incelenmesi pratik ve ucuz bir yöntem olması nedeniyle tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır (18, 22, 34). Cryptosporidiosisite ookist atılımı genellikle aralıklı olduğundan, farklı zamanlarda alınan çok sayıda dışkı örneğinin incelenmesi tanı için önemlidir (18).

Dışkı Örneklerinin Saklanma Yöntemleri

Canlı parazitin laboratuvar çalışanlarını enfekte etme riskinin bulunması nedeniyle fikse edilmiş örneğin acid fast boya yöntemleri ile incelenmesi daha uygundur (20, 22, 51). Genellikle dışkı örnekleri %10 formalin ile süspansiyon halinde saklanmaktadır. Sodyum asetoasetik asit formalin (SAF) ve potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) da boyama yöntemlerini etkilemedikleri için tercih edilen saklama yöntemleridir (21, 52). Polivinil alkol, boya yöntemleri ile uyumsuzluk gösterdiği için önerilmemektedir (20, 22, 34).

Dışkı Örneklerini Çoklaştırma (konsantrasyon) Yöntemleri

Dışkı incelemesinde çoklaştırma yöntemlerinin en önemli avantajı direkt yaymadan hazırlanan kalıcı boyalı preparatlarda gözden kaçabilecek seyrek ookistleri ortaya çıkarmasıdır (40, 51). Etkenin klinik örnekler ve su kaynaklarında saptanabilmesi için kullanılan başlıca çoklaştırma (konsantrasyon) yöntemleri şunlardır; formalin-eter ve formalin-etil asetat sedimentasyon yöntemleri, Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi, Percoll-sukroz yöntemi, doymuş çinko sülfat ve doymuş sodyum klorür yüzdürme yöntemleri, demir III sülfat yüzdürme yöntemi ve cam boncuklarla ayırıştırma (immunomanyetik separasyon=IMS). Formalin-eter ve formalin-etil asetat sedimentasyonu ile Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi en çok kullanılan yöntemlerdir (18, 20, 21, 22, 50). Çöktürme yönteminde 1000-1500 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılması *Cryptosporidium* ookistleri için uygundur (7, 18, 21, 50). Immunomanyetik cam boncuklar dışkıdan parazitin izole ve konsantre edilmesinde oldukça duyarlı bir yöntemdir (20, 22). Sudaki ookistlerin saptanmasında filtre esasına dayanan çoklaştırma yöntemleri tercih edilmektedir (40).

2.1.9.1.1. A Basit boya yöntemleri

Diğer protozoonların incelenmesinde kullanılan boyama yöntemleri *Cryptosporidium* tanısında kullanılamamaktadır (18, 19, 21). Ookistlerin saptanmasında Kinyoun acid fast, modifiye acid fast sıcak boyama, giemsa, safranin-metilen mavisi (SMB), nigrosin, karbol fuksin boyama yöntemleri kullanılmaktadır (18, 21, 52). Ookistleri mantarlardan ayırt etmek amacıyla en sık kullanılan, güvenilir, spesifik ve tanısal değeri yüksek olan yöntem acid fast boyama yöntemidir (50). Bu yöntem ile ookistler

pembe veya kırmızı renkte, mayalar ve dışkı artıkları ise yeşil veya mavi renkte boyanmaktadır (20, 22, 40). İrritan madde içermesi nedeniyle havalandırma sisteminin yeterli olmadığı laboratuvarlarda modifiye acid fast sıcak boyama yerine Kinyoun acid fast yöntemi tavsiye edilmektedir (7, 20, 22, 40). SMB boya yöntemi ile ookistler mavi zemin üzerinde pembe boyanmaktadır (37, 40). Karbol fuksin boya yönteminde zemin kırmızı renkte gözlenirken, ookistler ışık kırıcı özellikte, düzgün duvarlı oval yapılar halinde görülür (53).

2.1.9.1.1. B Faz kontrast ve karanlık alan mikroskopisi

Serum fizyolojik ile hazırlanan taze preparatların veya yüzdürme yöntemi ile çoğaltırılan dışkı örneklerinin faz kontrast veya karanlık alan mikroskopisi ile incelenmesi ile ookistler saptanabilmektedir (19).

2.1.9.1.1. C Floresan mikroskopisi

Ookistlerin saptanmasında Auramin-rhodamine (AR), Acridine orange (AO), Auramin-fenol (AF) gibi floresan boya yöntemleri de kullanılmaktadır (18, 21, 52). AR boya yöntemi hücre duvarındaki mikolik aside afinite gösteren bir boyadır. *Cryptosporidium* ookistleri bu yöntem ile kırmızı zemin üzerinde parlak sarı renkte görülmekte, ookistlerin maya ve mantarlardan ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir. AO boyama yönteminde mantarlar kırmızı- turuncu boyanırken, ookistler sarı- yeşil renkte boyanmaktadır (50). AF boya yöntemi ile ookistler siyah zeminde floresan veren yapılar olarak kolaylıkla tanınabilmektedir (40).

Diğer örnekler

İmmun yetmezlikli hastalarda enfeksiyon safra kesesi, biliyer sistem, pankreas, solunum yolları gibi ekstraintestinal organlara da yayılmaktadır (51). Bu ekstraintestinal organlardan alınan biyopsi materyallerinin histolojik incelemesi veya balgam, trakeal aspirasyon sıvısı ve bronkoalveoler lavaj sıvısından hazırlanan preparatların boyama yöntemleri ile incelenmesi sonucunda tanınmaları mümkündür (7, 34, 54). Ancak bu yöntemlerin tek başlarına kullanımı tanı için yeterli olmamaktadır (21).

2.1.9.1.2 Moleküler tanı

Moleküler çalışmalar *Cryptosporidium*'un taksonomisine ve türlerinin ayırımına önemli katkılar sağlamıştır (9, 14). PCR klinik örnekler ve çevresel kaynaklardan *Cryptosporidium* türlerinin saptanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (18). Bu yöntem parazit DNA'sının saptanması temeline dayanmaktadır. Yöntemin duyarlılığı dışkının mikroskopik olarak değerlendirilmesine oranla oldukça yüksektir (20, 22). Donmuş, kötü koşullarda saklanmış veya içerisinde çok az etken bulunan örnekler için en uygun tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (55). Tür ayrımı yapılmasına da olanak sağladığı için özellikle salgınlarda etkili olan türün belirlenebilmesi mümkün olabilmektedir (18). Hızlı ve duyarlılığı yüksek bir yöntem olmasına karşın bazı kısıtlılıkları da mevcuttur. Özellikle laboratuvar kaynaklı kontaminasyonlara bağlı yalancı pozitif sonuçlar verebilmektedir (37). DNA izolasyonu için uygun bir ekstraksiyon yönteminin uygulanması gerekmektedir. Yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ve dışkıda yer alan safra tuzları, bilirubin, kompleks polisakkaritler gibi bileşenler PCR yöntemini inhibe edebilmektedir. Bu nedenle inhibitör özelliği gösteren bu yapıların ortadan kaldırılması gerekmektedir (27, 56). Son yıllarda gerek PCR teknolojilerinin gelişmesi, gerekse klinik örneklerdeki tüm inhibitörleri ortadan kaldıran DNA izolasyon kitlerinin üretilmesi, PCR'ın bu kısıtlayıcı faktörlerinin ortadan kaldırılmasını sağlamıştır (56). Günümüzde izole edilen etkenin türü, canlılığı ve enfektivitesinin saptanması için geliştirilmiş farklı PCR yöntemleri mevcuttur. Bunlar arasında en sık kullanılan PCR yöntemi ile üretilen uzun bir genom parçasını uygun enzimlerle parçaladıktan sonra, ayrılan kısımların jelde yürütülerek hangi gen bölgesinin daha uzun olduğunu belirleyip etkenin genetik analizinin yapılabilmesini sağlayan PCR-RFLP yöntemidir (57). Ayrıca PCR ile uzun bir baz bölgesinin üretilip takiben o bölge içindeki küçük belli alanlara yönelik primerler eklenerek tekrar PCR ile o kısımların üretildiği, klasik PCR'a göre 4-5 kat daha etkili olan nested-PCR (58), üretilen hedef DNA miktarını, dolayısıyla ortamdaki etken miktarını belirleyebilen özel işaretli hibridizasyon problemleri kullanılarak yapılan Real-Time PCR (59), özel TaqMan problemlerinin kullanıldığı ve Real-Time PCR'a benzeyen TaqMan PCR (56) ve özellikle izolatların ayırımında kullanılan arbitrary primed PCR (AP-PCR) gibi moleküler yöntemler de kullanılmaktadır (60).

Cryptosporidiosisin PCR yöntemi ile saptanması için 70-kDa ısı şok proteini (hsp 70 mRNA) geni (61), ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge (18s SSU rRNA) geni (62), β tubulin kodlayan mRNA geni (63), amiloglikozidaz enzimini kodlayan mRNA geni (64), methionin aminopeptidaz, T-kompleks protein 1 delta (TCP-1) içeren chaperonin kodlayan genler (57), *Cryptosporidium* ookist duvar proteini (COWP), *Cryptosporidium-1* geninin Thrombospondin-related adhesive proteini (TRAP-C1), *Cryptosporidium-2* geninin Thrombospondin-related adhesive proteini (TRAP-C2) genleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında en duyarlı gen bölgesinin 18 S rRNA geni olduğu bildirilmiştir (65). Ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) bölgeleri COWP, dihidrofolat redüktaz-timidilat sentaz (dhfr-ts), TRAP-C1, TRAP-C2 ve HSP70 gibi genlerin sekans analizi, RFLP analizi gibi yöntemler *Cryptosporidium* türlerinin ayırımında en sık kullanılan yöntemlerdir (11, 15).

2.1.9.2 İndirekt Tanı Yöntemleri

2.1.9.2.1 Serumda antikor aranmasında kullanılan yöntemler

İndirekt yöntemler kullanılarak *Cryptosporidium* ookistlerine duyarlı antikorların varlığı araştırılmaktadır (51, 66). Bu yöntemler arasında ELISA, IFAT ve Western blot (WB) bulunmaktadır (4, 29, 40, 67).

Monoklonal antikorlarla yapılan IFAT'ın duyarlılığının %100 olduğu ve boyama yöntemlerinden 20 kat daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (68). Ayrıca serumda *Cryptosporidium* spp.'ye spesifik antikorların saptanmasında kullanılan IFAT'ın, dışkıda ookist saptama yöntemleri ile kombine edilmesi durumunda cryptosporidiosis prevalansının daha doğru olarak belirlenebileceği bildirilmektedir (69). Diğer bir serolojik yöntem olan WB ile enfeksiyondan sonraki 10. günde serumda 27 kDa molekül ağırlığındaki antijenin saptanabildiği, enfeksiyonun 3-4. haftalarında pik yaptığı, 4-5. aylarında ise ortadan kalktığı gösterilmiştir (70).

2.1.9.2.2 Dışkıda Cryptosporidial antijen aranmasında kullanılan yöntemler

Ookist antijenlerine yönelik monoklonal antikorların kullanıldığı immunofloresan ve ELISA yöntemleri, dışkıdaki ookistlerin saptanmasında oldukça duyarlı yöntemlerdir (40, 51). Ancak antijenlerin çapraz reaksiyon vermesi ELISA yönteminde yalancı

pozitifliğe neden olabilmektedir (40). ELISA ve immunokromatografi temeline dayanan ticari kitler geliştirilmiştir (20, 22). Dışkıdaki ookist miktarını belirleyen flowsitometri günümüzde floresan antikor yöntemi ile birlikte kullanılmakta ve ookist atılımının ölçümünde immunofloresan yöntemlerden daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir (40, 50).

2.1.9.3 Histopatolojik tanı

Parazit barsak mukoza epitel hücrelerinin mikrovillus yüzeyinde yerleştiği için biyopsi materyalinin ışık ve elektron mikroskobu ile incelenmesi tanıda önemlidir (7, 18, 20, 22, 23, 27, 30, 34, 40, 50, 51, 54). Hematoksilen eozin ile parazit mor renkte boyanmaktadır (7, 20, 22, 23). Biyopsi yöntemleri dokuda yerleşen parazitin tanısında yararlı olmakla birlikte, örnek alınan bölgede parazitin bulunmaması yalancı negatif sonuçlara neden olabilmektedir (7, 18, 20, 23, 27, 34, 40, 50, 51, 54).

2.1.10 CRYPTOSPORIDIUM TEDAVİ

2.1.10.1 Destek Tedavi

Rehidratasyon ve nutrisyonel desteği içeren nonspesifik destek tedavi cryptosporidiosisin klinik bulgularının kontrolünde önemlidir (7, 11, 15, 25, 30,71).

2.1.10.2 Antimotiliter Ajanlar

Loperamid veya difeksilat/atropin ile tedavi dışkılama sıklığını azaltıcı etki göstermektedir. Opiatlar şiddetli enfeksiyonda dışkının barsaktan geçiş süresini azaltmaktadır (71). Somatostatin, morfin sülfat gibi antidiareik ajanlar sıvı kaybının kontrol altına alınmasını sağlamaktadır (7).

2.1.10.3 Kemoterapötik Ajanlar

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden uzun süreli enfeksiyona neden olduğu için etkili bir kemoterapötik ajan ile tedaviye ihtiyaç vardır (7). Yüzlerce kimyasal ve immunoterapötik ajan ile *in vivo*, *in vitro*, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılmasına karşın halen spesifik veya koruyucu tedavi elde edilememiştir (8, 11, 15, 72). Aminoglikozid grubundan olan paramomisin en fazla kullanılan ajandır (15). Nitazoksanid (NTZ) kronik ve şiddetli ishal yakınması olan tüm

hastalarda önerilmektedir (11). Son zamanlarda makrolidlerin (spiramisin, azitromisin, klaritromisin) de enfeksiyon üzerine etkili olduğu bildirilmektedir (16). İmmun yetmezlikli olgularda diloksanid furoat, furazolin, spiramisin, kininle güçlendirilmiş klindamisin ve interlökin-2 ile başarılı sonuçlar alındığını bildiren çalışmalar mevcuttur (25).

2.1.10.4 Antiviral Tedavi

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda antiretroviral tedavi ile viral yükün azalması ve CD4 sayısının artması, klinik semptomlarda hızlı düzelme ile birlikte ookist atılımının azalması da sağlanmaktadır (12, 15). Özellikle proteaz inhibitörleri kullanılarak uygulanan yüksek etkili antiretroviral tedavi (HAART) intestinal cryptosporidiosisin klinik bulgularının azaltılmasında etkilidir (16).

2.1.10.5 İmmunoterapi

C. parvum yüzey proteini içeren hiperimmün serum ve hiperimmün bovin kolostrum ile pasif immunoterapi gibi alternatif tedaviler de uygulanmaktadır (8, 11). Probiyotik kullanılması da ookist sayısını ve ookist atılım süresini azaltmaktadır. Hücrel immunitenin öneminin bilinmesine ve tanımlanmış antijenlerle koruyucu immün yanıtın uyarılmasına karşın, tedaviye yönelik immunoterapötik veya aşı geliştirilememiştir (8).

2.1.11 CRYPTOSPORIDIUM KORUNMA

Korunmada temel prensip ookistlerin çevreye yayılmasını önlemektir (11, 23, 25). Uygun şekilde ellerin yıkanması (12, 71), insan ve hayvan dışkıları ile direkt temastan kaçınılması, havuz sularının yanlışlıkla yutulmamasına dikkat edilmesi, içme suyunun güvenli olması için gereken önlemlerin alınması önemlidir (12). Enfeksiyon açısından risk altında olan kişilerin, ishalleri hastalar, çiftlik hayvanları, özellikle 6 aydan küçük hayvanlarla temastan kaçınmaları gerekmektedir (11, 71). Özellikle hastaneler, laboratuvarlar, gündüz bakım evleri başta olmak üzere toplu yaşanan alanlarda genel hijyenik önlemlere dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Enfekte kişilerle temasın en aza indirilmesi, enfekte kişilerin izole edilmesi, enfekte atıkların uygun şekilde yok

edilmesi, şüpheli kontamine suların kullanımından önce kaynatılması gibi önlemler yararlıdır (16, 25).

Enfekte sığır dışkıları özellikle yağmur veya kar suları aracılığıyla nehirlere ulaşarak su kaynaklı bulaşa neden olmaktadır (11). Evsel kuyu suyu kullanımı veya yağışlar nedeniyle yüzey sularının kontamine olması durumunda suların filtrasyonu oldukça önem kazanmaktadır (11, 71). İçme suyunun arıtılması enfeksiyonun önlenmesinde en çok dikkat edilmesi gereken konulardan biridir (38). *Cryptosporidium* ookistleri birçok kimyasal dezenfektana dirençli olduğu için enfeksiyon kontrolünde dezenfektanların kullanımı sınırlıdır (8, 16, 20, 25). Dezenfeksiyon işleminde kullanılan maddenin çeşidi, konsantrasyonu ve ookistlerle temas süresi önemlidir. En çok önerilen dezenfektan %2.5 sodyum hipoklorit solüsyonudur. Ayrıca %5 amonyum ve %10 formalin solüsyonunda 4°C'de 18 saat inkübasyonun ookistlerin enfektivitesini ortadan kaldırdığı bilinmektedir (22). Yüksek oranda etkili ve toksik nitelikli dezenfektanlardan (amonyak, etilen oksit, metil bromid ve ozon) kullanımı en fazla olan ozondur (8). Klorin sudaki ookistler üzerine yüksek konsantrasyonlarda bile çok az etkili veya etkisiz iken (8, 20, 38), UV oldukça etkilidir (8, 20). Dezenfektanların tek başına kullanımı yerine kombine kullanımlarının daha etkili olduğu bildirilmektedir (8). Standart su arıtma yöntemleri <0.5 NTU kontamine suların ookistlerden arındırılmasında etkisiz kalmaktadır (25, 38, 71). 1 µm'den daha küçük por boyutu olan filtreler ve revers ozmoz filtrelerle suyun filtrasyonu genellikle yeterli olmaktadır (38). Suyun 72 °C'de 1 dakika ısıtılması veya kaynatılması işlemleri ookistlerin inaktive olmasını sağlamaktadır (38). Su ve sütün 71,7 °C sıcaklıkta 5 saniye pastörizasyonu da ookistlerin enfektivitesini ortadan kaldırmaktadır (8).

2.2 MICROSPORIDIUM SPP. GENEL BİLGİLER

Microsporidialar birçok omurgalı ve omurgasız konağı enfekte edebilen zorunlu hücre içi patojenlerdir. İnsanda enfeksiyona neden olan *Microsporidium* türleri böcekler, memeliler ve balıklarda da enfeksiyona neden olabilmekte, bu nedenle balıkçılık ve ipekböcekçiliği gibi alanlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (2). İmmun sistemi sağlam kişilerde kendini sınırlayan ishale neden olurken, immün sistemi

baskılanmış hastalarda kronik ishal, kilo kaybı ve ölüme neden olmaktadır (73, 74, 75).

2.2.1 MICROSPORIDIUM TARİHÇE

İlk kez 1857'de ipek böceklerinde ekonomik kayıplara yol açan *Nosema bombycis* (*N. bombycis*) enfeksiyonları bildirilmiştir (73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82). Daha sonra Balbiani 1882 yılında etkeni Microsporidia adı altında ayrı bir grup olarak sınıflandırmıştır (83). İlk insan olgusu 1959'da bildirilmiştir (78, 79, 80, 81, 84). Sparague 1976'da Microsporidia'ları Microspora şubesine dahil etmiştir. Etken, 1980'de Protista alemi ve protozoa altalemi altında sınıflandırılmıştır (85). Sparague ve Becnel 1998'de şube adını Microsporidia olarak bildirmiştir (76).

2.2.2 MICROSPORIDIUM TAKSONOMİ

Günümüzde Microsporidiaların *Nosema*, *Brachiola*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Vittaforma* ve sınıflandırılmayan olmak üzere 8 cinsi tanımlanmıştır.

Tablo 1: Microsporidiaların sınıflandırması (86).

Şube	Sınıf	Takım	Aile	Cins	Tür		
Microspora	Dihaplophasea	Dissociodihaplophasea	Nosematidae	Nosema	<i>N. connori</i>		
					<i>N. algerae</i>		
					<i>N. oculorum</i>		
	Haplophasea	Glugeida	Pleishophoridae	Pleistophora	<i>Pleistophora</i> spp.		
					Trachipleistophora	<i>T. hominis</i>	
						<i>T. antropoptera</i>	
			Encephalitozoonidae	Encephalitozoon	<i>E. hellem</i>		
					<i>E. cuniculi</i>		
					<i>E. intestinalis</i>		
			Chytridiopsida	Enterocytozoonidae	Enterocytozoon	<i>E. bienusi</i>	
			Sınıflandırılmayan	Sınıflandırılmayan	Sınıflandırılmayan	Sınıflandırılmayan	<i>V. corneae</i>
							<i>M. ceylonensis</i>
<i>M. africanum</i>							

Taksonomik olarak boyutları, konakları, tek veya iki nükleusu olması, polar tüpteki sarmal sayısı, gelişimi sırasında konak hücre sitoplazması ile ilişkisi (konak sitoplazması ile direkt temas, konak hücre içinde bir parazitofor vakuolde çoğalma, endoplazmik retikulum ile çevrelenmiş organizmanın çoğalması, parazit kaynaklı sporofor vezikül içinde sporogoni) gibi yapısal özelliklerine dayanılarak sınıflandırılmıştır (87). Cavalier-Smith 1981 yılında *Microsporidium* alemini funguslara aktarmıştır (88). Protein kodlayan gene dayanan veriler parazitin mantarlarla ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir (73, 83). Elongasyon faktörleri ve RNA polimeraz 2'nin en uzun alt biriminin mantarlarla yakın benzerlik gösterdiği saptanmış, mitokondrial tip HSP 70 gen sekansının protozoonlardan çok mantarlarınkine benzediği bildirilmiştir (89).

Günümüzde DNA sekans verilerine dayanan filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Son zamanlarda chaperonin veya bir ısı-şok proteini olan Hsp70'yi kodlayan gen bulunmuştur ve filogenetik çalışmalar bu genlerin en çok diğer ökaryotların

mitokondrilerinde bulunan ve Hsp 70'i kodlayan gene benzer bulunduğunu göstermiştir. Bu durum microsporidiaların daha yüksek formların dejenerasyonu ile oluşmuş olabileceklerini düşündürmektedir. SSU rRNA ve geniş alt ünite (LSU) rRNA ve protein kodlayan DNA sekansları ile insanları enfekte eden 6 tür olduğu saptanmıştır (83).

2.2.3 MICROSPORIDIUM MORFOLOJİ

Microsporidiaların, konak hücresi dışında aktif evreleri yoktur (83). İkiye bölünme ile çoğalırlar nükleusları membranla çevrilidir (2, 74, 83). Microsporidiaların, hem ökaryot, hem de prokaryotların özelliklerini taşıdıkları bildirilmektedir. Ökaryotik özellikleri, nükleus etrafının zarfla kaplı olması, intrasitoplazmik membran sistemine sahip olması ve mitotik ağıdaki kromozomun ayrılmasıdır. Prokaryotik özellikleri SSU rRNA'ya sahip olmaları, ökaryotlarda bulunan mitokondri, peroksizom ve golgi aparatlarının olmamasıdır (83, 90). Microsporidiaların, ökaryotların oldukça erken bir dalından oluştuğu düşünülmektedir (91).

Konak hücre içerisinde çoğalma özellikleri türlere göre değişir. *Encephalitozoon* türleri parazitofor vakuol içerisinde çoğalırken, *E. bieneusi* (2, 83, 90, 92), *Vittaforma* spp. (92), *Nosema connori* (75, 83), *Nosema ocularum* (75, 83, 92) gelişimi sırasında konak hücre sitoplazması ile temas halindedir (75, 83, 92).

Encephalitozoon türlerinde konakta etkenin vegetatif formları ve sporları saptanabilmektedir (2, 90).

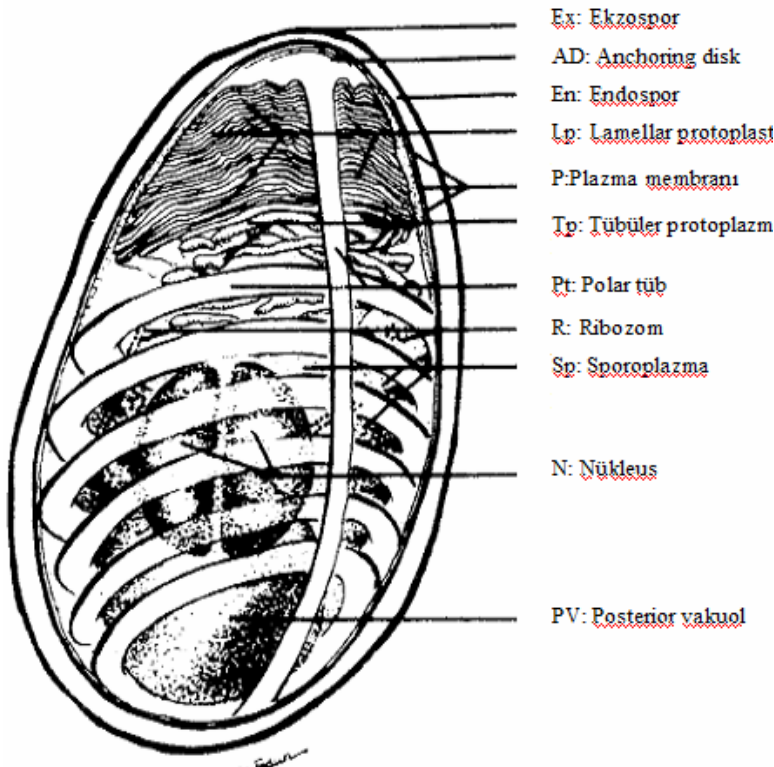
Spor yapısı

İnsanları enfekte eden türlerin sporları 1.0- 3.0 ila 1.5- 4.0 µm boyutlarındadır (74). Sporlar 3 tabaka içeren kalın duvara sahiptir. Bu tabakalar sırasıyla: a) Ekzospor, sporu dış ortamdan koruyan glikoprotein dış tabaka. b) Endospor, kitinden bir iç tabaka. c) Plazma membranı (74, 75, 83).

Polar tüp yapısı

Polar tüp sayısı ve sarmal düzeni cins ve türlere göre değişmektedir (83). *Enterocytozoon* ve *Brachiola* cinslerinde çift sıra halinde 6-10 sarmal (75, 83, 92), *Encephalitozoon*, *Trachipleistophora* ve *Vittaforma* cinslerinde tek sıra halinde 5-11

sarmal bulunur (83, 93). Uygun ortamda, uygun konak içerisinde polar t p içerisindeki enfektif sporoplazm, sporun incelen  n bölümünden boŐalır (83). Konak hücreyi enfekte etmeyi kolaylaŐtıran anchoring diskten (tutunma diski) sarmalanmıŐ polar t p dışarı çıkarılmaktadır. Spor içerisine kalsiyum giriŐi polar t b n uzatılması ile aynı zamanda gerçekleŐir. Ozmotik basıncıdaki değişiklik sonucu posterior vakuol ŐiŐer ve polar t b n iç kısmı eldiven parmağı gibi ters döner ve sitoplazma içeriği polar tüpten geçtikten sonra konak hücre içerisine boŐalır (2, 74).



Şekil 2: Microsporidia spor morfolojisi (73).

2.2.4 MICROSPORIDIUM YAŞAM DÖNGÜSÜ

Enfeksiyon temel olarak gastrointestinal ve solunum epitel hücrelerini tutar (73).

Microsporidiaların yaşam d ngs ndeki evreler Şu Şekildedir:

2.2.4.1 Enfektif evre

Sporun evreye atıldığı ve bulaşın gerçekleştiği evredir (75). Sporlar konak tarafından ağız veya solunum yolu ile alındıktan sonra helozon Şeklindeki polar t p düzleŐir, t b n iç kısmı dış kısmın içinden kayarak ilerler ve konak hücreye girer. T p tamamen d zleŐince spor içindeki sporoplazm t b n içinden geçer, konak hücre

2.2.5 MICROSPORIDIUM PATOGENEZ

2.2.5.1 Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

İnsan enfeksiyonlarında gastrointestinal kanal epitelinin tutulumu sık görülmektedir (76, 92). Enfeksiyonların %90'dan fazlası *Enterocytozoon bienusi* (*E. bienusi*) ile, geri kalanı ise *Encephalitozoon intestinalis* (*E. intestinalis*) ile meydana gelmektedir (73, 75, 76, 92, 96, 97).

E. bienusi enfeksiyonu genellikle lokalizedir, ince barsak (jejunum, duodenum) enterositlerini ve safra kesesi epitel hücrelerini tutar (73, 75, 92, 97). Etkenin çoğalmasına bağlı oluşan patolojik değişiklikler villuslarda atrofi, D-ksiloz malabsorbsiyonu, kript hiperplazisi (73, 75, 92, 96, 97), mononükleer hücre infiltrasyonu, fırçamsı hücrelerde disakkaridaz aktivitesinde azalma (73, 92, 96, 97), goblet hücrelerinin içeriğinin boşalması, belirgin intraepitelial lenfositik infiltrasyon şeklindedir (75).

E. intestinalis'te hem inflamatuvar yanıt, hem de barsak hücresi hasarı minimal düzeydedir. Ancak enfeksiyon epitel hücreleri içinde sınırlı kalmayıp perinükleer bölgeye de yayılabilmektedir (75, 76).

2.2.5.2 Hepatobilier Enfeksiyonlar

Microsporidialar, özellikle *E. bienusi* ve daha az sıklıkla *E. intestinalis* safra kanallarını da enfekte edebilmektedir (92). Bu epitel sınırları genellikle bozulmamış görünmektedir ve intraepitelial lenfosit infiltrasyonu minimaldir. Safra kanallarının enfeksiyonu papiller stenoz, safra kanalı dilatasyonu, taşsız kolasistit, sklerozan kolanjit ile ilişkili olabilir (75, 76, 92).

2.2.5.3 Sistemik Enfeksiyon

2.2.5.3.1 Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Sinüzit ve nazal enfeksiyonlar gözlenmektedir. *E. hellem* enfeksiyonları bronşit, bronşiolit, pnömoni ve eroziv trakeite neden olabilmektedir (92).

2.2.5.3.2 Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları

Yaygın *E. hellem* enfeksiyonunda böbreklerde plazma hücreleri ve lenfositler görülmekte, histiosit ve nötrofillerin daha az olduğu kronik granülomatöz interstisyel nefrit saptanmaktadır (75, 92). *E. intestinalis* enfeksiyonunda böbrekte granülomatöz tubulointerstisyel nefrit nedeniyle makrofaj, lenfosit, plazma hücresi ve Langhans tipi dev hücreler görülmektedir (75).

2.2.5.3.3 Göz Enfeksiyonları

Göz enfeksiyonları patolojik olarak stromal veya epitelial kökenli olmalarına göre sınıflandırılmakta ve patolojik tablo hastanın immun sistemine bağlı olarak değişmektedir. İmmun sistemi sağlam kişilerde keratit veya korneal ülser görülebilmektedir (75, 76).

2.2.5.3.4 Kas Enfeksiyonları

Pleistophora spp.'ye bağlı miyoziti olan hastaların kas biyopsilerinde atrofik ve dejeneratif kas lifleri arasında parazit kümeleri, plazma hücreleri, lenfositler ve histiositler saptanmıştır (75, 92).

2.2.5.3.5 Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları

E. cuniculi ile enfekte immun sistemi sağlam hastalarda santral sinir sistemi tutulumu bildirilmiştir. AIDS hastalarının serebrumunda microsporidia ve kortikal bölgedeki gri cevherde ve derin serebral nükleusta nekroz saptanmıştır (92).

2.2.5.3.6 Diğer Doku Enfeksiyonları

E. cuniculi enfeksiyonunda periton tutulumu, omentumda fokal nekroz, granülomatöz olmayan enflamasyon ve sporları içeren inflamatuvar kitle bildirilmiştir. AIDS hastalarında kemik tutulumu bildirilmiştir (92).

2.2.6 MICROSPORIDIUM KLİNİK

Microsporidiosisin klinik seyri, enfeksiyonun lokalizasyonu ve konağın immun direncine bağlıdır (99). CD4 sayısı 200 hücre/mm³'ün üzerindeki hastalarda 6 ayda

düzelen, kendini sınırlayan ishale neden olurken, CD4 sayısı 100 hücre/mm³'ün altındaki hastalarda kronik ishal ve kilo kaybına neden olmaktadır (73, 74, 75).

Microsporidium spp. sindirim sistemi başta olmak üzere birçok organ ve sistemde enfeksiyona neden olmaktadır.

2.2.6.1 Sindirim Sistemi Enfeksiyonları

2.2.6.1.1 Barsak enfeksiyonları

Etken ince barsak epitelinde çoğalır, villusların yüzeyinde ve boyunda kısalma nedeniyle emilim bozukluğu ve ishal görülür (74). İmmun sistemi sağlam hastalarda ishalin tedaviye gerek kalmadan 2 hafta içerisinde düzeldiği bildirilmiştir (92, 98). İmmun sistemi baskılanmış hastalarda ise kronik ishal, ateş, iştahsızlık ve kilo kaybına neden olmaktadır (73, 99).

2.2.6.1.2 Safra kesesi ve safra kanalları enfeksiyonları

Genellikle *E. bienusi* ve *E. intestinalis* enfeksiyonları immün sistemi baskılanmış kişilerde safra yollarına yayılım ile kolanjit veya kolesistite neden olabilmektedir (73, 74, 75, 98, 99, 100).

Safra kanallarının tutulumunda karın ağrısı, bulantı, kusma, ateş, sağ üst kadrın ağrısı görülmektedir (75, 92).

2.2.6.1.3 Hepatit, pankreatit, peritonit

E. bieneusi ve *E. intestinalis* hepatit, peritonite neden olmaktadır (75, 81, 92, 98). HIV pozitif hastalarda halsizlik, ishal, kilo kaybı, ateş yakınmaları, hepatit, hepatoselüler nekroz, peritonit, akut ileus bildirilmiştir (75, 83).

2.2.6.2 Sistemik Enfeksiyonlar

Encephalitozoon, *Trachipleistophora* ve *Pleistophora* cinslerine ait türler genellikle yaygın enfeksiyon yapmaya eğilimlidir. Pnömoni, sinüzit, keratokonjunktivit, hepatit, peritonit, ensefalit, nefrit, miyozite neden olabilmektedir (79, 83, 85, 101). Alt üriner sistem ve böbrekte ağır enfeksiyona neden olabilmektedir (83).

2.2.6.2.1 Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Akciğer enfeksiyonları

HIV pozitif hastalarda alt solunum yolu enfeksiyonları asemptomatik veya bronşiolit ile ilişkili olabilmekte, nadiren pnömoni veya ilerleyici akciğer yetmezliğine neden olabilmektedir. HIV ile enfekte hastaların bronşial epitelinde her üç *Encephalitozoon* spp. ve *E. bieneusi* saptanmıştır (75, 83, 92, 100).

Sinus enfeksiyonları

AIDS hastalarında *Encephalitozoon* spp. ve *Enterocytozoon bieneusi* ile meydana gelen ve antimikrobiyal tedaviye yanıt vermeyen birçok kronik sinüzit olgusu bildirilmiştir (75, 81, 83, 92, 99, 100).

2.2.6.2.2 Göz enfeksiyonları

HIV ile enfekte hastalarda her üç *Encephalitozoon* türü ile keratokonjunktivit olguları bildirilmiştir. Enfeksiyon kornea ve konjunktivanın yüzey epitelinde sınırlıdır (75, 83, 92). *E. hellem*'in en sık saptanan etken olduğu bildirilmektedir (75, 81). En sık görülen klinik bulgular gözde yabancı cisim hissi, gözde ağrı, görme keskinliğinde azalma ve fotofobidir (102, 103).

2.2.6.2.3 Serebral Enfeksiyonlar

Baş ağrısı, görme bozukluğu, bulantı, kusma ve spastik konvülsiyon gibi serebral semptomları olan HIV ile enfekte hastalarda yaygın *Encephalitozoon* spp. enfeksiyonu bildirilmiştir (81, 83).

2.2.6.2.4 Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları

HIV ile enfekte hastalarda yaygın *Encephalitozoon* spp. enfeksiyonunda üriner sistem tutulumu sıktır. Disüri, mikrohematüri, makroskobik hematüri, sistit, nefrit, üretrit, prostatit ve böbrek yetmezliğine kadar değişen birçok bulgu görülebilmektedir (75, 81, 83, 92, 98, 100).

2.2.6.2.5 Myozit

Pleistophora, *Brachiola* veya *Trachipleistophora* ile meydana gelen birçok myozit olgusu bulunmaktadır. Semptomlar ateş, miyalji, bitkinlik, kas güçsüzlüğü, kontraktür ve diğer organ tutulumlarına ait olabilir (74, 75, 81, 83, 92, 99).

2.2.6.2.6 Nadir Tutulumlar

HIV pozitif hastalarda dilde ülserasyon (83), selülit veya deri nodülleri bildirilmiştir (81, 83).

2.2.7 MICROSPORIDIUM İMMÜNİTE

Microsporidium enfeksiyonuna karşı konağın immun direnci doğuştan ve edinilmiş immun yanıtı içermektedir (104).

2.2.7.1 Hücresel İmmunite

E. cuniculi enfeksiyonunda hücresel bağışıklık sağkalım için çok önemlidir. Konak makrofajları tarafından IL-12 salgılanmakta, dolaşımda ve dokularda yüksek miktarda IFN- γ ile kendini gösteren Th1 sitokinlerin artışı gerçekleşmektedir. Th2 sitokin olan IL-4 ise enfeksiyon boyunca saptanmamaktadır. IFN- γ 'nın üretimi CD8 T hücrelerini uyarmaktadır. CD8 T hücreleri etken miktarını, enfekte hücreleri öldürerek azaltabilmektedir (105). IFN- γ , TNF- α , IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinler ile nitrik oksitin *Encephalitozoon* spp.'ye karşı koruyuculukta da önemli rol oynadığı gösterilmiştir (74). IFN- γ ile aktive edilen makrofajların nitrojen bileşikleri aracılığıyla microsporidiaları öldürdüğü düşünülmektedir (105).

2.2.7.2 Humoral İmmunite

İmmun sistemi sağlam konakta *Microsporidium* spp.'ye karşı IgM ve IgG antikoru gelişmekte ve yaşam boyu devam etmektedir. İmmun sistemi baskılanmış konakta antikor yanıtı değişkendir. Enfeksiyonda ilk olarak IgM antikoru ortaya çıkmakta ve etkenin alımını takip eden 16. günde en yüksek konsantrasyona ulaşmaktadır. IgG antikoru enfeksiyondan sonraki 8. günde ortaya çıkmakta ve 24. günde en yüksek düzeye ulaşmakta, IgA antikoru ise 17. günde artış göstermekte ve 22. günde pik yapmaktadır (100).

2.2.8 MICROSPORIDIUM EPİDEMİYOLOJİ

İlk insan olgusu 1959'da bildirilmiştir (78, 79, 80, 81, 84). HIV enfeksiyonunun tanımlanmasından sonra bu hastalarda sık görülen fırsatçı patojen olarak *Microsporidium* enfeksiyonları daha fazla bildirilmeye başlanmıştır. İnsan microsporidia enfeksiyonları Antartika dışında tüm dünyada görülmektedir (76, 92). Özellikle subtropikal bölgelerde ve gelişmekte olan ülkelerde etkenin görülme sıklığı daha fazladır (73, 92, 106).

2.2.8.1 Risk Faktörleri

Microsporidium sporları dış ortama oldukça dayanıklıdır. Suda uzun süre canlı kalabilir. Çok küçük boyutlu olması nedeniyle su filtrelerinden geçebilir. Enfekte hayvanların idrar ve dışkıyla atılan sporlar su kaynaklarını kontamine edebilmektedir (83, 107).

2.2.8.2 Bulaş Yolları ve Bulaş Kaynakları

Bulaşın enfekte canlının dışkı, idrar ve solunum sistemi sekresyonları ile gerçekleştiği düşünülmektedir (75, 76, 83, 91). Bilinen bulaş yolları ve kaynakları şu şekildedir:

2.2.8.2.1 Zoonotik Bulaş

İnsanları enfekte eden bazı microsporidiaların rezervuar hayvanlardan saptananlarla morfolojik benzerliği, etkenin zoonotik kökenli olabileceğini düşündürmüştür (108). *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) tavşan ve insanda saptanmıştır. *Encephalitozoon hellem* (*E. hellem*) papağanlarda bildirilmiştir. *Encephalitozoon intestinalis* (*E. intestinalis*) köpek, eşek, domuz, inek, keçi ve insanda bildirilmiştir. *Enterocytozoon bieneusi* (*E. bieneusi*) köpek, domuz ve insanda saptanmıştır. İnsan, tavşan, köpek, fare ve tilkilerdeki moleküler analizler, insanlardaki *E. cuniculi* izolatlarının köpek ve tavşanlardaki izolatlarla aynı alt türlere ait olduğunu göstermiştir (83).

Genetik analizlerle, memeliler ve insanları enfekte eden *E. cuniculi*, *E. intestinalis* ile kuşlar ve insanları enfekte eden *E. hellem* gibi birçok *Encephalitozoon* türünün zoonotik potansiyellerinin açıklanması mümkün olabilecektir. Ancak bu konudaki epidemiyolojik veriler insan olgularının az olması nedeniyle halen sınırlıdır (108).

2.2.8.2.2 Su Kaynaklı Bulaş

Microsporidia türleri, enfekte hayvanların idrar ve dışkıları ile atılarak su kaynaklarını kontamine edebilmektedir (99, 109). Birçok microsporidia türü yüzey sularında saptanmış, ancak insan microsporidiosis enfeksiyonlarının su kaynaklı olup olmadığı bilinmemektedir (83). Fransa'nın Lyon şehrinde 1995'te, kanalizasyonun şehrin su dağıtım sistemine karışması sonucu oluşan su kaynaklı bir salgın bildirilmiştir (107). Barsak microsporidiosis enfeksiyonlarının bulaşında kontamine içme sularının bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (83).

2.2.8.2.3 Besin Kaynaklı Bulaş

Besinlerin hızlı bir şekilde yer değiştirmesi, insanların daha fazla seyahat etmesi, besin tüketim şekillerinin değişmesi nedeniyle besin kaynaklı *Microsporidium* enfeksiyonları günümüzde önem kazanmaktadır. Kontamine gıdaların etkenin bulaş yollarından biri olduğu düşünülmektedir (99, 109).

E. cuniculi sporlarının 22 °C'de 4 hafta, *E. hellem*'in ise -70 °C'de birkaç ay canlı kalabildiği bildirilmiştir (75). Bu sıcaklık koşullarında bile canlılığını ve etkinliğini koruması besinler aracılığıyla bulaşta önemlidir. Ayrıca çiğ meyve ve sebzelerin kontamine su ile yıkanması sonucu besin kaynaklı *Microsporidium* enfeksiyonları da bildirilmiştir (110).

2.2.8.2.4 Vertikal ve Horizontal Bulaş

Microsporidiosisin anneden yavruya vertikal bulaşı kemirgenler, tavşan, etoburlar ve insan dışı primatlarda gösterilmiştir. İnsanlarda bildirilmiş vertikal bulaş yoktur (75, 83, 99, 107, 111, 112, 113, 114).

Microsporidia sporlarının dışkı ve idrar ile atılmasının horizontal geçişte etkili olabileceği düşünülmektedir. Microsporidiosisin horizontal bulaşını sağlayan risk faktörleri arasında homoseksüel ilişki, intravenöz ilaç kullanımı, havuzda yüzmeye, saunada yıkanma ve kontamine su ile temas sayılabilmektedir (83, 99, 107, 111, 112, 113, 114).

Microsporidiaların diğer bir muhtemel bulaş yolu da solunum yoluyla bulaştır. *Encephalitozoon hellem* ile enfekte hastaların balgamlarında sporların saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca *E. bieneusi*, *E. hellem* ve *E. intestinalis* bronş epiteli ve bronkoalveolar lavajda saptandığı gibi burun akıntısı ve burun epitelinde de saptanmıştır. Keratokonjonktival enfeksiyonun kontamine parmaklarla direkt inokülasyon tarzında veya hava yoluyla oluştuğu düşünölmektedir (75).

2.2.8.2.5 Vektör Kaynaklı Bulaş

Microsporidialar en sık artropodlarda enfeksiyona neden olmaktadır (75). *B. algerae* sivrisinekler için doğal bir patojendir. Tavşan veya atimik farelerde subkutan olarak kuyruk, ayak veya kulaklara inoküle edilmesinden sonra lokal microsporidial enfeksiyonlar oluşmuştur (75, 91, 99). Böcekleri enfekte eden microsporidiaların memelileri veya insanları enfekte edip etmediğı araştırılmaktadır (75, 83, 91).

2.2.8.3 Mevsimsel Dağılım

Etkenin mevsimsel dağılımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Uganda'da yapılan bir çalışmada yağışlı mevsimlerde *E. bieneusi*'nin görülme oranının arttığı bildirilmiştir (115).

2.2.8.4 Ülkelerin Gelişmişlik Düzeyine Göre Parazitin Dağılım Özellikleri

2.2.8.4.1 Dünyadaki dağılım

Microsporidium enfeksiyonları Antarktika dışında tüm dünyada bildirilmektedir. Son yıllarda tropikal ölkeler ve gelişmekte olan ölkelerden daha fazla sayıda olgu bildirilmiştir (92).

2.2.8.4.2 Türkiye'deki dağılım

Türkiye'de microsporidiosis ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Yazar ve ark.'nın çalışmasında bir hastanın bronkoalveolar lavaj örneğinde (116), Büget ve ark.'nın çalışmasında ise bir hastanın dışkı örneğinde (117) boya yöntemi ile *Microsporidium* spp. saptandığı ve etkenin tür ayrımının yapılamadığı bildirilmiştir. Özkırım ve ark.'nın

çalışmasında balarılarında *Nosema* (118), Eröksüz ve ark.'nın çalışmasında tavşanlarda *Encephalitozoon* spp. (119), Yaman ve ark.'nın çalışmasında coleoptera'larda *Nosema* (120) saptandığı rapor edilmiştir. Karaman ve ark.'nın çalışmasında kanser tanısı almış hastaların dışkı örneklerinde çeşitli boya yöntemleri ile %10.9 oranında *Microsporidium* spp. saptandığı bildirilmiştir (121).

2.2.9 MICROSPORIDIUM TANI

Microsporidium enfeksiyonlarının tanısında kullanılan yöntemler:

A- Direkt tanı yöntemleri;

Mikroskopik tanı, moleküler tanı ve hücre kültürü

B- İndirekt tanı yöntemleri;

IFAT, ELISA, WB

C- Histopatolojik incelemedir (75, 76, 92, 122).

Tanıda Kullanılan Örnekler:

Pleistophora ve *Trachipleistophora* gibi kas tutulumu gösteren microsporidialar dışında insanı enfekte eden microsporidialar genellikle mukoza ve dokuların epitel sınırını tutar. Bu nedenle tanı için genellikle invaziv olmayan sitolojik teknikler kullanılarak alınan materyaller değerlendirilmektedir. Göz enfeksiyonlarında kornea veya konjunktivadan alınan kazıntı ve sürüntü materyalleri incelenir. Endoskopi sırasında alınan ince barsak lavaj sıvısının sitolojik incelemesi yapılabilir. Barsak microsporidiosis enfeksiyonlarının tanısında ince barsak endoskopik fırça yöntemi mukozanın değerlendirilmesinde duyarlı bir yöntemdir. Balgam sitolojisi solunum yollarının microsporidiosis açısından değerlendirilmesinde uygundur. Bronkoalveolar lavaj, tekrarlayan balgam incelemeleri negatif olan hastalarda yararlıdır. Hepatobiliyer microsporidiosis tanısı için biyopsi, kolesistektomi veya sitoloji kullanılmaktadır (92).

2.2.9.1 Direkt tanı yöntemleri

2.2.9.1.1 Mikroskopik inceleme

2.2.9.1.1.A Işık mikroskobu ile inceleme

Barsak enfeksiyonlarının tanısında en güvenilir ve ucuz tanı yöntemi dışkıdaki sporların özel boya yöntemleri ile incelenmesidir (92). En sık kullanılan boya yöntemleri kromotrop boya yöntemi ve bunun modifikasyonları ile florokrom boyalardır (73, 75, 92, 106). Bu boyalar barsağı tutan iki önemli microsporidia olan *E. bienusi* ve *E. intestinalis*'in ışık mikroskobu ile ayrımlarının yapılabilmesine olanak verir (92). Modifiye trichrom boya yönteminde microsporidia sporları oval, pembe renkte boyanan, 1.5-3 µm boyutlarında yapılar halinde görülürken, bakterilerin etrafı yeşil renkte ışık verir (2, 34, 73, 74, 75, 81, 94, 106). Modifiye trichrom boyası için dışkı preparatlarının çok ince olarak hazırlanması gereklidir ve 90 dakika süre ile boyanmalıdır. Bu boya yöntemi ile değerlendirme yapılırken pozitif kontrolle karşılaştırma yapmak önemlidir (34, 75, 94).

Konsantrasyon yöntemleri dışkı örneklerindeki sporların dışkı artıklarından uzaklaştırılarak biraraya toplanmasını sağlamamakta, spor kaybına neden olarak yalancı negatif sonuçlara yol açabilmektedir (2, 75).

Maya kontaminasyonunu sınırlamak için taze dışkı örneklerinin formalinle işlenmesi önerilmektedir (106). Boya yöntemleri ile sporların saptanmasında önemli olan maya ve bakterilerle karıştırılmamasına dikkat edilmesidir. Sporlar düzenli ve oval yapıdadır, tomurcuklanma göstermez (92).

Giemsa, Gram, Periyodik asit schiff (PAS), Warthin-Stary, gümüş boyası gibi birçok boya yöntemi de kullanılmaktadır (73, 74, 106). Gram ve Weber boyası ile microsporidia sporları genellikle kuşak tarzı boyanma gösterir. Ayrıca sporlar PAS boyası ile boyandığında ön kısımlarında bulunan polar tüp ve posterior vakuol gözlenebilmektedir (92). Spor duvarını boyayan Steiner'in gümüş boyası (34) ve Giemsa boyları gibi boya yöntemleri ile sporlar başarılı bir şekilde boyanabilmektedir (34, 92).

2.2.9.1.1.B Floresan mikroskobu ile inceleme

Calcoflour ve Uvitex gibi floresan boya yöntemlerinde spor duvarı boyanır. Spor duvarı protein yapıdaki ekzospor tabakası ve kitin yapısındaki endospor tabakalarından oluşur. Calcoflour boyası ile kitin tabaka boyanır. 330-380 nm eksitasyon filtresi ile epifloresan mikroskopta incelendiğinde boyutları, şekli ve boyanma özellikleri ile tanınır (73, 106).

2.2.9.1.1.C Elektron mikroskobu ile inceleme

Elektron mikroskobu microsporidial enfeksiyonların saptanması ve tür ayrımının yapılabilmesi için gerekli yapısal ayrıntıların görülmesine olanak sağlayan, altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir (34, 73, 74, 83, 92, 94, 98, 106). Dezavantajları ise bu mikroskopların her laboratuarda bulunmaması, preparat hazırlığının uzun sürmesi (34, 74, 92, 98, 106), deneyimli elemanlarca değerlendirilmesinin gerekliliği, tanı koyulabilmesi için örneğin yeterince ince hazırlanması ve örnekteki etkenin belli yoğunlukta olmasının gerekliliğidir (106).

2.2.9.1.2 Moleküler tanı yöntemleri

Microsporidium türlerinin ayrımında kullanılan moleküler tabanlı yöntemler PCR, oligonükleotid mikroarray ve in situ hibridizasyondur (83).

PCR

Epidemiyolojik çalışmalarda hızlı, invaziv olmayan bir yöntem olarak önem kazanmaktadır (2, 83, 98). Microsporidiaların ribozomal RNA geninin küçük alt ünitesine (SSUrRNA) ait primerler kullanılarak dışkı örneklerinde kısa sürede *E. bienewisi*, *E. intestinalis* ve *E. cuniculi*'nin, ince barsak biyopsi örneklerinde ise *E. bienewisi* ve *E. intestinalis*'in saptanması mümkün olmaktadır (2, 106). Özellikle *E. bienewisi*'nin ribozomal RNA geninin küçük alt ünitesine yönelik EBIEF1 ve EBIER1 olarak adlandırılan primer çifti kullanılarak yapılan amplifikasyon başarılı sonuçlar vermiştir (92). Ancak moleküler yöntemlerin de bazı kısıtlılıkları mevcuttur. *Microsporidium* olmayan diğer organizmalar (*Echinococcus multilocularis* ve *Cryptococcus neoformans* gibi) için dizayn edilmiş spesifik primerlerle *Microsporidium* DNA'sının da amplifiye olabildiği görülmüştür. Ayrıca dışkı örneklerinde birçok PCR

inhibitörü bulunması ve DNA ekstraksiyonu prosedürünün uzun zaman alması da yöntemin önemli kısıtlılıklarıdır (106).

Microsporidium'dan DNA ekstraksiyonu, spor duvarının cam boncuk ile parçalanarak, kaynatılarak, proteinaz K, kitinaz veya mevcut ticari kitlerle yıkımından sonra yapılmaktadır. PCR'da kullanılan primerler etkenin rRNA genlerini hedef almaktadır. Türlerin ayrımı, türe özgül primerin kullanımı ile yapılmaktadır (83, 85). Alternatif olarak tüm *Microsporidium*'lara özgü primerler kullanıldıysa tür ayrımı, amplikonların nested PCR (ikinci çeşit özgül primerler kullanılarak) ve RFLP ile (2, 83, 85), nükleotid sıraması için BLAST analizi ile türe özgü proplar kullanılarak Southern blot analizi ile veya heterodubleks mobil çift analizi ile yapılmaktadır (85, 87).

Microsporidium spp.'nin tanısında kullanılan primerler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Microsporidiaların PCR ile saptanmasında kullanılan primerler (2).

Primer çiftleri	Primer dizaynı	Amplifiye edilen organizma	Baz uzunluğu	Kullanılan örnek
5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	V1	<i>E. bieneusi</i>	348	Doku biyopsileri, doudenal aspirat
5'-ACTCAGGTGTTATACTCACGTC-3'	EB450	<i>E. hellem</i>		Kültüre organizmalar
5'-GAAACTTGCCACTCCTTACG-3'	EBIEF1	<i>E. bieneusi</i>	607	Safra
5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3'	EBIER1			Doudenal aspirat
5'-TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA-3'		<i>E. hellem</i>	547	Kültüre organizmalar
5'-GTAAAAACACTCTCACACTCA-3'				
5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3'		<i>E. cuniculi</i>	549	Kültüre organizmalar
5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3'				
5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	V1	<i>E. intestinalis</i>	370	Doku biyopsileri
5'-CTCGCTCCTTACACTCGAA-3'	SI500			
5'- CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'	PMP1*	<i>E. bieneusi</i>	250	Dışkı
5'-CCTCTCCGGAACCAAACCTG-3'	PMP2	<i>E. cuniculi</i>	268	Kültüre organizmalar

*: PMP1 Primeri V1 ile aynıdır.

Oligonükleotid mikroarray

Microsporidial rDNA genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primerlere yönelik PCR tabanlı yöntemler araştırma laboratuvarlarında sık olarak kullanılmakta ise de rutin tanı laboratuvarlarına girmemiştir (74).

In situ Hibridizasyon

Bu yöntemde tanımlanan problemler *E. bienusii*'nin SSU-rRNA'sına karşı kullanılmış, *Microsporidium*'ların değişik evreleri ayırt edilmiştir. Bu değerli, ancak zaman alıcı yöntem diğer insan *Microsporidium* türlerinde kullanılmamış, duyarlık ve özgüllüğü değerlendirilmemiştir (123).

Çevresel örneklerde *Microsporidium*'un saptanması için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan duyarlı, seçici ve hızlı tanı koyulmasını sağlamada en sık kullanılan yöntem PCR'dır. Ayrıca PCR ürünlerine uygulanan sekanslama ile hızlı bir şekilde tür ayrımı da yapılabilmektedir. İnsan *Microsporidium* türlerinin saptanmasında kullanılan yöntemlerden birincisi PCR ve ardından uygulanan RFLP yöntemidir. Birkaç *Microsporidium* türü (*E. intestinalis*, *E. hellem* ve *E. cuniculi*) olduğu düşünülen klinik örneklerde PCR ürünlerine RFLP uygulanması ile tür ayrımı yapılabilmektedir. İkincisi PCR'da spesifik primerlerin kullanımının ardından PCR ürünlerinin sekanslanması ve bilgisayar veri tabanı ile karşılaştırılmasına dayalı Computer Database Homology Comparison (CDHC) yöntemidir. PCR-CDHC yönteminin kullanımı, PCR ürününün tek tek nükleotid analizine imkan vermektedir. Bu yöntem insan patojeni olan microsporidiaların moleküler analizinde daha iyi bir yöntem olarak kabul edilmektedir (124).

Sekans analizi yaygın bir şekilde kullanım alanı olan, PCR temeline dayalı olarak patojenlerin tanısında uygulanabilen bir yöntemdir. Bu moleküler teknikler microsporidial enfeksiyonların epidemiyolojisi, tür ayrımı, filogenetik ilişkiler gibi birçok yönden önemli gelişmelerdir (106).

2.2.9.1.3 Hücre kültürü

İnsanları enfekte eden birçok microsporidia türünün *in vitro* kültürü yapılabilmekte, konak-parazit ilişkisinin anlaşılabilmesinde ve klinik tanıda kullanılan immunolojik

reagenlerin geliştirilmesinde yararlı olmaktadır. Ancak sadece özel laboratuvarlarda yapılabilmekte ve rutin klinik tanıda kullanılamamaktadır (92).

2.2.9.2 İndirekt tanı yöntemleri

İmmun sistemi sağlam kişilerde dışkı ve idrarla spor atılımının aralıklı olması veya histokimyasal ve PCR yöntemleri ile saptanamayacak kadar düşük düzeylerde olması nedeniyle serolojik yöntemlerin tanıda daha uygun olduğunu düşünen araştırmacılar da mevcuttur (74, 81). *Microsporidium* tanısı için değişik serolojik testler geliştirilmiş, ancak bu testlerin duyarlılık ve seçicilikleri bilinmemektedir (2, 75, 83). Serolojik yöntemler enfekte olduğu varsayılan konağın serumunda *Microsporidium*'lara karşı spesifik antikorların düzeyini ölçmeye yöneliktir. Ancak pozitif bir antikor yanıtı (ELISA ile >1/800 titre), kronik ya da geçirilmiş bir enfeksiyon, kontaminasyon veya çapraz reaksiyon ayırımını yapamaz. AIDS'li hastalarda spesifik antikor oluşumunun engellenebileceği düşüncesiyle serolojiyi değerlendirmek zordur. Bu durumlarda direkt tanı yöntemleri microsporidiosis tanısında daha uygundur (2, 100). *Microsporidium* türlerinin immunolojik tanısında kullanılan testler ELISA, monoklonal antikorlarla IFAT, WB, karbon immün assay (CIA), kompleman fiksasyon, counter immunoelektroforezdir (2, 75, 83, 94).

İndirekt floresan antikor testi

Klinik örneklerde spor aranmasında IFAT da tercih edilen bir yöntemdir (34, 125). Floresan veren microsporidia sporları, hücre içerisinde bant şeklinde polar tüpün görüldüğü yapılar olarak ayırt edilmektedir. Bu yöntemle bazı bakteriler çapraz reaksiyon verebilmektedir (34). Elektron mikroskopinin yapılamadığı yerlerde birçok *Microsporidium* türü için hazırlanan monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılabilir (106). Monoklonal antikorlarla immunofloresan antikor testleri, polar tüp proteinleri ve türe özgü yüzey proteinlerini tanımakta yararlı olmuştur. İnsanların klinik örneklerinde *E. hellem*, *E. cuniculi* ve *E. intestinalis*'e karşı poliklonal ve monoklonal antikorlar tür ayırımında kullanılmıştır. Son zamanlarda *E. bienusi* sporlarına karşı BALB/c farelerde monoklonal antikorlar (IgM ve IgG) geliştirilmiş ve indirekt immunofloresan antikor testinde başarı ile kullanılmıştır (123). Tüm serolojik testlerin insanlardaki duyarlılığı halen bilinmemektedir (87).

Enzim immün assay (ELISA)

E. cuniculi'nin spor antijenleri veya parazit hücresi süspansiyonlarının antijen olarak kullanıldığı ELISA ve IFAT yöntemleri de kullanılmaktadır (108). İnsanların polar tüpe karşı serolojik yanıtları, bu yapının üzerinde bulunan glikoepitoplara karşı gelişmektedir. Serolojik yöntemler immün sistemi baskılanmış kişilerde antikor üretimindeki muhtemel değişkenlik nedeniyle rutin olarak kullanılamamaktadır (74).

Western blot

E. cuniculi ile enfekte farenin serumunda *E. cuniculi* ve *E. intestinalis* sporları kullanılarak WB analizi yapılmıştır (126). SDS-PAGE, *E. cuniculi*'nin protein profili 3 major grup banda ayrılmaktadır (100 kDa'dan ağır, 30-80 kDa ara molekül ağırlıklı, 30 kDa'dan hafif molekül ağırlıklı bantlar). Değişik *Encephalitozoon* türlerinin SDS-PAGE profilleri farklı olmakla beraber, *E. cuniculi* izolatlarının 121, 56, 45, 43, 41 kDa bantlarda ortak protein bantları oluşmuştur (127).

ELISA'dan daha yüksek özgüllük oranlarına sahip olmasına rağmen WB yönteminin vurguladığının aksine *E. cuniculi*'ye karşı saptanan antikorların gerçek birer enfeksiyonu mu gösterdiği, yoksa çapraz reaksiyon mu, veya poliklonal B hücre stimülasyonu ile oluşan bir reaksiyon (özellikle tropikal hastalıklı kişilerde) mu olduğu bilinmemektedir (108).

2.2.9.3 Histopatolojik inceleme

Biyopsi örneklerinin histolojik değerlendirmesi microsporidiosis tanısına olanak vermekte, ancak tür ayrımı yapılamamaktadır (2, 83). Histolojik yöntemlerin invaziv bir girişim olması ve preparat hazırlığının uzun sürmesi gibi kısıtlılıkları mevcuttur. Doku kesitlerinin incelemesinde çeşitli boya yöntemleri kullanılmaktadır (2). Toluidin boyası ince plastik kesitlerde tanıyı kolaylaştırmaktadır (75).

2.2.10 MICROSPORIDIUM TEDAVİ

2.2.10.1 Antiretroviral Tedavi

Günümüzde AIDS hastalarında kullanılmakta olan yüksek etkinlikte antiretroviral tedavinin (HAART) uygulanmadığı dönemlerde, ishali olan HIV ile enfekte hastalarda microsporidiosis prevalansının %2 ile %70 arasında değiştiği bildirilmektedir (128).

HAART, HIV yükünün azalmasına, CD4 T hücrelerinin artışına ve microsporidiosis gibi fırsatçı enfeksiyonların prevalansında azalmaya neden olmaktadır (81, 85, 99, 100, 108).

2.2.10.2 Kemoterapötik Ajanlar

Enfeksiyonun tedavisinde kullanılan ilaçlar halen araştırılmaktadır. Metronidazol, albendazol, itrakonazol, octreotid gibi birçok ajan kullanılmaktadır (34, 81, 90).

Metronidazol tedavisinin etkinliğine yönelik çalışmalar gözden geçirildiğinde *E. bienusi*'ye etkisiz olduğu, *Encephalitozoon* spp.'ye etkili olduğu görülmektedir (81, 90, 92). *Encephalitozoon* enfeksiyonlarında albendazolün etkinliğine yönelik çalışmalar gözden geçirildiğinde yüksek oranda başarılı sonuçlar alındığı bildirilmektedir (73, 75, 81, 83, 90, 92, 98). Atovaquone ile klinik iyileşme sağlanmasına karşın dışkıda sporların saptanmaya devam ettiği bildirilmektedir (90, 92). Benzer durum fumagilin ile tedavide de söz konusudur (73, 81, 83, 90, 98). Klindamisin *E. bienusi* enfeksiyonunda etkili olduğu bildirilmektedir (98). *In vitro* çalışmalarda sinefunginin, etkenin gelişimini önlediği bildirilmiştir (73, 75).

E. hellem'in neden olduğu göz enfeksiyonları, topikal fumagilin (73, 75, 98) veya parenteral itrakonazol ile tedavi edilmektedir (75, 90). Yaygın *E. hellem* enfeksiyonu ise albendazol ile tedavi edilmektedir (98). Kalsiyum kanal blokerleri olan nifedipin *E. hellem* spor germinasyonunu inhibe etmektedir (75, 90).

Octreotide, HIV ile ilişkili ishalin palyatif tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Microsporidialarla oluşan ishalde etkili olduğu bildirilmiştir (75, 81, 90).

2.2.11 MICROSPORIDIUM KORUNMA

Microsporidia enfeksiyonlarından korunmada enfeksiyonun bulaş yolu ve kaynağına yönelik tedbirler alınmalıdır. Dışkı ve idrarda bulunan sporların ağız yoluyla alınmasının önlenmesi esastır. Tüm vücut sıvıları ile çalışırken gerekli koşullara uyulmalı ve enfekte kişilerin kişisel hijyenik kurallara dikkat etmesi sağlanmalıdır (75). Özellikle el yıkama alışkanlığının yaygınlaştırılması ve yemeklerin hazırlanmasında içme suyu veya kaynamış suyun kullanılması enfeksiyonla karşılaşma riskini azaltır (73, 92). Göz enfeksiyonlarının önlenmesi için nazal ve bronşial sekresyon ile damlacık bulaşı ve idrarla kontamine olmuş ellerin konjonktivaya temasının önlenmesi gereklidir (75,

92). Balgam ve diğer solunum yolları sekresyonları ile spor yayılımı olan kişilerin hijyenik kurallara dikkat etmesi ile bulaşın ortadan kaldırılmasına çalışılması gerekmektedir (92).

E. cuniculi sporlarının suda 6 gün canlılığını koruyabildiği, kuru ortamda 22 °C'de 4 hafta canlı kalabildiği bildirilmiştir. *N. bombycis* sporlarının distile suda 10 yıl canlılığını koruduğu bildirilmiştir. Sporlar %70 etanol, %1 formalin ve %2 lizolle 30 dakika muamele edildiğinde veya 120 °C'de 10 dakika otoklavlandığında ölmektedir (76).

Birçok dezenfektanın tavsiye edilen konsantrasyonlarının yanısıra suyun 5 dakika kaynatılması ve 120°C'de otoklavlamamanın *Encephalitozoon* sporlarını öldürdüğu bildirilmektedir (75).

Microsporidium ile ilgili aşı çalışmaları halen devam etmektedir (129).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 ÇALIŞMA GRUBU








Ekim 2005- Ocak 2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin çeşitli kliniklerine başvuran ishalli hastalardan haftanın belli bir gününde olmak üzere haftada bir gün dışkı örnekleri toplandı. Ayrıca İzmir'in Buca ilçesi Karacaağaç Köyü'nde saptanan ishal salgınında, İl Sağlık Müdürlüğü tarafından DEÜTF Parazitoloji Laboratuvarı'na yönlendirilen olguların dışkı örnekleri de çalışma kapsamına alındı. Toplam 162 hastaya ait dışkı örneğinin mikroskopi ve moleküler yöntemle değerlendirilmesi ile, tanıda moleküler yöntemin geçerlilik çalışması planlandı.

Olguların tümüne gönüllü bilgilendirme formunu da içeren bir anket formu uygulandı.

Çalışma için gerekli etik onay Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alındı (Onay tarihi 03.05.05).

3.1.1 Dışkı Örneklerinin İshal Derecelerinin Değerlendirilme Kriterleri

Dışkı örnekleri Bristol dışkı skalasına göre değerlendirilerek Tip 5, 6 ve 7 olarak belirlenen örnekler çalışmaya alındı. Bristol dışkı skalası Şekil 4'te verilmiştir.

Tip 1		Küçük parçalar halinde dışkı
Tip 2		İçinde parçalar olan sosis şeklinde dışkı
Tip 3		Uzerinde çatlaklar olan sosis şeklinde dışkı
Tip 4		Yumuşak ve düz sosis şeklinde dışkı
Tip 5		Kenarları düzgün yumuşak parçalar halinde dışkı
Tip 6		Düzensiz yumuşak parçalar halinde, pelte kıvamında dışkı
Tip 7		Katı parçacıklar içermeyen tamamen sulu dışkı

Şekil 4: Bristol dışkı skalası (130).

3.1.2 Dışkı örneklerinin saklanması

Alınan dışkı örnekleri boyama ve PCR yöntemlerinde kullanılmak üzere ikiye ayrılarak uygun saklama koşullarında saklandı. Dışkı örneklerinin yarısı ağız kapaklı dışkı saklama kabında formalinle 1/1 oranında sulandırılarak +4°C'de, diğer yarısı herhangi bir koruyucu eklenmeden steril ependorf tüp içerisinde DNA izolasyonu yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2 YÖNTEMLER

Çalışmaya alınan dışkı örnekleri öncelikle nativ-lugol ve çöktürme yöntemleri ile barsak protozoonları ve helmintleri açısından değerlendirildikten sonra Kinyoun acid fast ve modifiye trichrome boyama yöntemleri ile *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. açısından mikroskopik incelemeleri yapıldı. Boyalı preparatların mikroskopik bakışında *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. saptanan örneklerde etkenin yoğunluğu değerlendirildi.

Dışkı örneklerinin PCR için uygun saklanma koşullarının belirlenmesi için ön çalışma yapıldı. Bu amaçla mikroskopi sonucu pozitif olarak değerlendirilen 10 olguya ait dışkı örneği 2'ye ayrıldı. Örneklerin yarısı herhangi bir koruyucu eklenmeden direkt olarak -80°C'de işlemleninceye kadar saklandı. İkinci saklama yöntemi olarak dışkı örneklerinin kalan yarısı formalinle 1/1 oranında sulandırılarak +4°C'de saklandı. Her iki şekilde saklanan dışkı örneklerine, her iki etken için planlanan protokoller doğrultusunda DNA izolasyonu ve PCR amplifikasyonu yapıldı. Bu ön denemeler sonucu -80 °C'de saklanan örneklerden çalışılmasının uygun olduğuna karar verildi. Tüm dışkıların -80 °C'de saklanan örneklerine DNA izolasyonu, PCR amplifikasyonu ve parazit pozitif bulunan DNA ürünlerine RFLP yöntemleri uygulandı. Elde edilen ürünler agaroz jelde görüntülendi. Bantlar markerla kıyaslandı.

3.2.1 Dışkı Örneklerinin Mikroskopi ile Değerlendirilmesi

3.2.1.1 Dışkı örneklerinin *Cryptosporidium* spp. açısından mikroskopik olarak değerlendirilmesi

Dışkı örnekleri modifiye formalin-etilasetat yöntemi (Ritchie yöntemi) ile karşılaştırılarak tanıda altın standart kabul edilen Kinyoun acid fast boya yöntemi ile boyandı. Preparatlar X100 büyütme ile ışık mikroskopunda değerlendirildi. Parazit yoğunluğu McLauchlin ve ark.'nın geliştirdiği yöntemle göre belirlendi (131).

3.2.1.1.1 Modifiye Formalin Etil Asetat Çöktürme Yöntemi (Ritchie Yöntemi)

%10 Formalin Solüsyonunun Hazırlanması

Formaldehit %35-40 (Merck)	100 ml
Distile su	900 ml

Yöntem

- Dışkı örnekleri şekilli ise 1-1.5 gr, sulu ise 5-6 ml taze dışkı 10 ml %10 formalin içinde plastik bir dışkı saklama kabında ezilerek homojen hale getirildi. Fiksasyonun olabilmesi için en az 30 dakika bekletildi.
- Süspansiyon bir süzgeç yardımıyla plastik dışkı yüzdürme kabı içerisine süzüldü.
- Süzülmüş süspansiyon bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 2-3 cc etil asetat (Merck) eklendi.
- Tübün ağzı başparmak ile sıkıca kapatılarak 30 sn çalkalandı. Tübün içindeki gazın oluşturduğu basıncı azaltmak için arada başparmak gevşetilerek gaz çıkışı sağlandı.
- 1500 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası 4 tabaka oluştu. Oluşan tabakalar sırasıyla etil-asetat tabakası, tüp duvarlarına yapışmış dışkı artığı tabakası, formalin tabakası ve tüp dibinde çökelti.
- Bir çubuk yardımıyla üst sıvı karıştırılarak ilk 3 tabaka döküldü.
- Çökeltiden cam pastör pipeti ile yayma preparat yapıldı.
- Preparat metanolle fikse edildikten sonra Kinyoun acid fast boya ile boyandı.

3.2.1.1.2 Kinyoun Acid Fast Boyama Yöntemi

Kinyoun Karbol-Fuksin Solüsyonunun Hazırlanması

- Fenol kristalleri (Riedel) 56 °C benmaride eritildi.
- 4 gr bazik fuksin (Serva) 20 ml %95 etil alkol içinde eritildi.

- Bir cam şişeye alkolde eritilmiş fuksin koyuldu, üzerine 8 ml erimiş fenol ve 100 ml distile su ilave edildi. 24 saat bekletildikten sonra süzülüp kullanıma hazır hale getirildi. Kullanılincaya kadar ışıktan korunarak saklandı.

%1 Sülfirik Asid Solüsyonunun Hazırlanması

1 ml H₂SO₄ (Riedel) dikkatli ve yavaş bir şekilde 99 ml distile suya eklenip kullanılincaya kadar saklandı.

Metilen Mavisinin Hazırlanması

- 0.3 gr metilen mavisini (Merck) 30 ml etil alkolde eritildi.
- **Potasyum Hidroksit Solüsyonunun Hazırlanması:** Potasyum hidroksit tableti (Merck), bistüri ile 0.01 gr olacak şekilde kesilip 100 ml distile suya eklenerek eritildi.
- Hazırlanmış olan 100 ml potasyum hidroksit solüsyonuna, 1. basamaktaki ölçüde hazırlanmış metilen mavisini-alkol solüsyonu ilave edilerek kullanılincaya kadar oda ısısında ışıktan korunarak saklandı.

Boyama basamaklarının uygulanması

- Modifiye formalin etil asetat çöktürme yöntemi ile konsantre edilen örneklerden yayma preparat hazırlanarak kuruması sağlandı.
- Yaymalar saf metanol içinde 1 dakika tutularak fikse edildi.
- Kinyoun karbol-fuksin içeren şalede 5 dakika tutularak boyandı.
- %50 alkolde çalkalanıp musluk suyunda yıkandı.
- %1 H₂SO₄ içeren şalede 2 dakika bekletilip musluk suyunda yıkandı.
- Metilen mavisini içeren şalede 1 dakika bekletilip musluk suyunda yıkandı.
- Preparatlar havada kurutulduktan sonra kaplama solüsyonu ile kapatılarak X100 büyütme ile ışık mikroskopunda değerlendirildi (132).

3.2.1.2 Dışkı örneklerinin *Microsporidium* spp. açısından mikroskopik olarak değerlendirilmesi

Dışkı örnekleri çoklaştırma yöntemi uygulanmadan %10 formalin ile sulandırıldıktan sonra Weber'in modifiye trichrome yöntemi ile boyandı. Preparatlar kaplama

solüsyonu ile kapatılarak X100 büyütme ile ışık mikroskopunda değerlendirildi. *Microsporidium* spp. yoğunluğu Menotti ve ark.'nın uyguladığı yöntemle göre belirlendi (133).

3.2.1.2.1 Weber'in Modifiye Trichrome Boyama Yöntemi

Weber'in Modifiye Trichrome Boya Solüsyonunun Hazırlanması

- Koyu renkli bir cam şişe içerisine aşağıda belirtilen malzemeler tartıldı.

Kromotrop 2R (Sigma)	6 gr
Fast Green (Merck)	0.15gr
Fosfotungstik asit (Merck)	0.7 gr

- Karışıma 3 ml glacial asetik asit (Merck) eklenerek 30 dakika bekletildi.
- 100 ml distile suyla karıştırılarak kullanılıncaya kadar oda ısısında saklandı.

%90 Alkol Solüsyonunun Hazırlanması

%90 etil alkol	930 ml
Distile su	70 ml

%90 Asit Alkol Solüsyonunun Hazırlanması

Hazırlanan 1000 ml'lik %90 alkol solüsyonundan 4.5 ml çıkarıldı. Yerine 4.5 ml asetik asit eklendi.

Boyama basamaklarının uygulanması

- Formalinli dışkı örneğinden ince bir yayma preparat hazırlanarak metanolle 5 dakika fikse edildi.
- Kromotrop bazlı boya ile 90 dakika boyandı.
- %90 asit alkolle çalkalandı.
- %95 etil alkolde 5 dakika bekletildi.
- %100 alkolde 10 dakika bekletildi.
- Ksilende 10 dakika bekletildikten sonra havada kurutuldu (134).

3.2.2 Dışkı Örneklerinin Moleküler Yöntemlerle Değerlendirilmesi

3.2.2.1 Dışkı örneklerinin *Cryptosporidium* spp. açısından moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi

3.2.2.1.1 *Cryptosporidium* için primerler ve restriksiyon enzimlerinin seçimi

Daha önceki çalışmalarda başarılı sonuçlar alındığı bildirilen *Cryptosporidium*'un duvar proteinini kodlayan gene yönelik primer çifti kullanıldı. Genotiplerin ayrımını sağlayan uygun bir restriksiyon enzimi seçildi.

3.2.2.1.2 Dışkı Örneklerinden *Cryptosporidium* DNA'sının İzolasyonu

Herhangi bir koruyucu madde eklenmeden -80 °C'de dondurularak saklanmış dışkı örneklerinden QIAamp DNA Stool Mini Kit (51504, Qiagen, UK) ile üretici firmanın önerdiği prosedür doğrultusunda DNA elde edildi. *Cryptosporidium* spp. duvar proteinine yönelik Cry9 ve Cry15 primerleri kullanıldı. Elde edilen DNA ürünü %1.5 agaroz jelde görüntülendi. PCR yöntemi ile pozitif bulunan örnekler tür ayrımı yapmak üzere RFLP yöntemi uygulandı.

DNA İzolasyonu Basamakları

(Miktarlar tek dışkı örneği içindir)

- -80°C'de saklanan dışkı örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
- 2 ml mikrosantrifüj tübüne şekilli dışkıları için 180-220 mg, sulu dışkıları için 200 µl dışkı örneği koyuldu.
- Dışkı örneğine 2ml ASL tamponu eklenerek karıştırıldıktan sonra karışımdan 1.6 ml yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Süspansiyon ısı bloğunda 70 °C'de 5 dakika ısıtıldı.
- 15 saniye karıştırıldı, 10000 g'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatanın 1.2 ml' si bir tübe eklendi, kalan çökelti atıldı.
- Karışıma "inhibitEX tablet" koyuldu. 1 dakika karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.

- 10000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tübe aktarıldı.
- Üst sıvıdan 200 µl, 15 µl Proteinaz K, 200 µl AL tamponu hemen karıştırılarak 72°C'de 10 dakika ısıtıldı.
- Karışıma 200 µl etanol (% 96-100) eklenerek tekrar karıştırıldı.
- Örneğin tümü filtrasyon tüpüne eklendi. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tübe aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 500 µl "AW1 Buffer" eklendi. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tübe aktarıldı.
- İkinci kez filtrasyon tüpüne 500 µl "AW1 Buffer" eklendi. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre steril 1.5 µl'lik reaksiyon tüpüne aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 100 µl "AE Buffer" eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen 50 µl DNA PCR için kullanımına kadar -20°C'de saklandı.

3.2.2.1.3 *Cryptosporidium* DNA'sının PCR ile gösterilmesi

PCR

Cryptosporidium spp. için 0,2 µmol HPLC Purifiye (40 baz) Cry15 ve Cry 9 primerleri (Metabion, Germany) kullanıldı.

Liyofilize haldeki primerler prospektüslerinde belirtilen miktarda TE buffer ile sulandırıldı (C15→ 557 µl, Cry 9→385 µl TE ile sulandırıldı).

TE Bufferın Hazırlanması:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (pH=8,0).

- Her bir primerden 100 pmol'lük solüsyon hazırlandı. Çözündükten sonra vortekslendi.
- 10 pmol konsantrasyonu için 180µl apirojen su+ 20 µl stok primer olacak şekilde tekrar sulandırıldı.

- 50 µl'lik 4 ependorfa ayrılarak -20 °C'de saklandı.

dNTP (10mM) (Fermentas, R 0181) Sulandırımı:

- Stok dNTP'ler vortekslendi. 0.5 ml'lik ependorf tüpe 300 µl apirojen su koyuldu. Üzerine her bir ATP, GTP, TTP, CTP'den 50 µl eklenerek vortekslendi.
- 4 ependorfa ayrılarak -20 °C'de saklandı.

Hot Start Taq DNA Polymerase (500 U, 5U/µL) (Fermentas, EP0602) enzimi kullanıldı.

PCR miksinin hazırlanması:

1- Her bir örnek için 1.5 ml ependorf tüpe, toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki malzemeler koyuldu;

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| • 10x Hot Start Taq buffer | 5 µl |
| • 1.5 mM MgCl ₂ | 3 µl |
| • PCR Nucleotide mix (dNTP) (0.2 mM) | 1 µl |
| • Primer Cry 15 (10 pmol/µl) | 3 µl |
| • Primer Cry 9 (10 pmol/µl) | 3 µl |
| • Hot start Taq polimeraz (5U/µl) | 0,5 µl |
| • dH ₂ O | 24.5 µl |
| • DNA | 10 µl |

2- Isı döngü programı

Ependorflar ısı döngü aygıtına (termal cycler) (Techne TC-412, UK) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirildi.

95 °C'de	7 dakika ön denatürasyon		
94 °C'de	1 dakika	}	35 döngü
55 °C'de	30 saniye		
72 °C'de	1 dakika		
72 °C'de	10 dakika son uzatma		

Isı döngü aygıtı ile amplifikasyon gerçekleştirildi (135). Her PCR çalışmasında bir pozitif, bir negatif kontrol örneği kullanıldı. Elde edilen PCR ürünü görüntüleme yöntemi uygulanıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Tablo 3: *Cryptosporidium* spp.'nin PCR'ında kullanılan primerler.

Öncül	Dizi
Cry 9	5-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3'
Cry 15	5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3'

3.2.2.1.4 Elde Edilen PCR Ürününün Saflaştırılması

Pürifikasyon “EZ-10 Spin Column PCR Purification kit (BS363, Bio Basic Inc., Canada)” kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

(Miktarlar tek PCR ürün örneği içindir)

- PCR reaksiyon karışımı 1.5 ml'lik tübe aktarıldı. İçine 3 volüm “Binding Buffer 1” koyuldu.
- Yukarıdaki karışım filtrasyon tüpüne aktarıldı. 2 dakika oda ısısında bekletildi. 2 dakika 10000 g'de santrifüjlendi.
- Çökelti atıldı. Filtrasyon tüpüne 500 µl “Wash Solüsyon” eklendi. 2 dakika 10000 g'de santrifüjlendi. Bu basamak tekrarlandı.
- Tüpte yıkama solüsyonu kalmaması için 10000 g'de 1 dakika daha santrifüjlendi.
- Filtrasyon tüpüne 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 50 µl “Elüsyon Buffer” eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 10000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek DNA ayrıldı. Saflaştırılmış PCR ürünü -20 °C'de saklandı.

3.2.2.1.5 Elde edilen PCR ürününün Görüntülenmesi

Elde edilen ürünün görüntülenmesi için yatay elektroforez cihazı kullanıldı.

EDTA (Ethylenediaminetetraacetate), Disodium, Dihydrate (Amresco, 0105)

Solüsyonunun Hazırlanması:

0.5 M EDTA	186.2 gr
NaOH	20 gr
Distile H ₂ O	1000 ml

Mikrodalga fırında eritildi. pH=8.0'e ayarlandı. Otoklavlandı.

Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X) Solüsyonunun Hazırlanması:

Tris base (Amresco-0826)	54 gr
Boric Acid (Amresco-0588-)	27.5 gr

450 ml distile su eklenerek mikrodalga fırında eritildi.

20 ml 0.5 M EDTA eklendi. Distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Elektroforez için 1x TBE kullanıldı.

Tris-Borik asit-EDTA (TBE 1X) Solüsyonunun Hazırlanması:

900 ml distile suya 100 ml 10x TBE eklendi.

Sonuçların değerlendirilmesi amacı ile 1X TBE içinde % 1'lik agaroz jel hazırlandı, mikrodalga fırında eritildi.

Etidyum bromide (Sigma, E8751) (10 mg/ ml) Solüsyonunun Hazırlanması:

Etidyum bromid	1 g
Apirojen su	10 ml

oranı ile stok solüsyon hazırlandı. 900 µl apirojen su, 100 µl stok etidyum bromide eklendi. Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı. + 4°C'de saklandı.

%1 Agaroz Jelin Hazırlanması:

TBE (1X)	40 ml
Agarose 100 gr. (Prona) (Basica Le)	0.4 g
Etidyum bromid	2.5 µl

Hazırlanan karışım jel kalıbına döküldü, taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı.

Jel Yükleme Tamponunun (6X) Hazırlanması:

Sucrose 0335-1 kg. (Amresco)	4 gr
Azul de Bromphenol (Bromphenol Blue) (Panreac 171165)	0.025 gr
Glycerol	100 µl
Distile su	10 ml

Çoğaltılmış ürünler jel yükleme tamponu (2 µl jel yükleme tamponu + 10 µl çoğaltılmış ürün) ile karıştırılarak her bir kuyuya 10 µl, bir kuyuya da marker (DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp) [Roche, 11 721 933 001] olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1x TBE içinde 100 volt uygulanarak 20 dakika yürütüldü.

Sonuçlar jel görüntüleme ve analiz sistemi (UVP, USA) ile değerlendirildi. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı.

3.2.2.1.6 *Cryptosporidium* spp.'nin genotiplendirmesi

Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLP)

Cryptosporidium spp.'nin PCR ile elde edilen ürünleri RsaI (1000 U, 10 U/µL) (Fermentas ER1121) kesici enzimi kullanılarak genotiplendirildi.

1. Her bir kesim reaksiyon solüsyonu için ependorf tüpüne, toplam hacim 30 µl olacak şekilde aşağıdaki malzemeler koyuldu;

- Apirojen su 16 µl
- RsaI enzimi (10 U/µl) 2 µl
- 10x RsaI buffer 2 µl
- PCR ürünü 10 µl

2. Karışım 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

3. Kesim ürünleri ve O'Gene Ruler DNA ladder (Fermentas SM 1203) marker, % 2'lik agaroz jelde yürütüldü.

3.2.2.1.7 *Cryptosporidium* Türlerinin Görüntülenmesi

Elde edilen bantlar Bölüm 3.2.2.1.5'de belirtilen jel konsantrasyonu %2 olacak şekilde hazırlanan agaroz jelde görüntülendi. Marker olarak O'Gene Ruler DNA ladder (Fermentas, SM 1203) kullanıldı. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak olası genotipler belirlendi.

3.2.2.2 Dışkı örneklerinin *Microsporidium* spp. açısından moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi

3.2.2.2.1 *Microsporidium* için primerler ve restriksiyon enzimlerinin seçimi

Daha önceki çalışmalarda *Microsporidium*'un tüm genotiplerini saptadığı varsayılan primer çifti (panmicrosporidial primerler) kullanıldı. Genotiplerin ayırımını sağlayan uygun restriksiyon enzimleri seçildi.

3.2.2.2.2 Dışkı Örneklerinden *Microsporidium* DNA'sının İzolasyonu

Ekstraksiyon "NucleoSpin Tissue Genomic DNA Tissue Kit (740952.50, Macherey-Nagel, Germany)" kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

DNA İzolasyonu Basamakları

- 1 ml "TE Buffer" içine 250 mg dışkı eklendi. Kuvvetlice 30 saniye karıştırıldı. 15 dakika 4000g'de santrifüjlendi.
- Üst sıvı atıldı. Çökelti, 0.2-1ml "T1 Buffer" içinde süspanse edildi. Karışımdan 200µl yeni bir mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
- 200 µl süpernatant, 25 µl Proteinaz K, 180 µl "T1 Buffer" hemen karıştırılarak 56°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi.
- Ertesi sabah karıştırılarak 200 µl "B3 Buffer" eklendi. Kuvvetlice karıştırıldı. Süspanسیون ısı bloğunda 70 °C'de 10 dakika ısıtıldı.
- Karıştırıldıktan sonra 10000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tübe aktarıldı.
- 210 µl etanol (%96-100) örneğe eklendi. Kuvvetlice karıştırıldı.

- Örneğin tümü filtrasyon tübüne eklendi. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni bir tübe aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 500 µl "BW Buffer" eklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tübe aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 600 µl "B5 Buffer" eklendi. 11000g'de 1 dakika santrifüjlendi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tübe aktarıldı.
- 11000 g'de 1 dakika santrifüjlendi. Filtrasyon tübü 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 100 µl "Be Buffer" eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen 50 µl DNA PCR için kullanımına kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.2.2.3 *Microsporidium* DNA'sının PCR ile gösterilmesi

PCR

Microsporidium spp. için 0,2 mikromol HPLC Purifiye (40 baz) C1 ve C2 primerleri (Metabion, Germany) kullanıldı.

Liyofilize haldeki primerler prospektüslerinde belirtilen miktarda TE buffer ile sulandırıldı.

(C1→ 487µl, C2→ 634 µl TE ile sulandırıldı).

Primerlerin sulandırımı Bölüm 3.2.2.1.3'te belirtildiği gibi hazırlandı.

Hot Start Taq DNA Polymerase (500 U, 5U/µl) (Fermentas, EP0602) enzimi kullanıldı.

PCR miksinin hazırlanması

1- Her bir örnek için ependorf tüpüne, toplam hacim 50µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu.

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| • 10x Hot Start Taq buffer | 5 µl |
| • 2 mM MgCl ₂ | 4 µl |
| • PCR Nucleotide mix (dNTP) (0.2 mM) | 1 µl |
| • Primer C1 (10 pmol/µl) | 1.25 µl |

- Primer C2 (10 pmol/μl) 1.25 μl
- Hot start Taq polimeraz (5U/μl) 0,2 μl
- dH₂O 27.3 μl
- DNA 10 μl

2- Isı döngü programı

Ependorflar ısı döngü aygıtına (Techne TC-412, UK) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirildi.

95 °C'de	7 dakika ön denatürasyon		
94 °C'de	1 dakika	}	35 döngü
62 °C'de	1 dakika		
72 °C'de	1 dakika		
72 °C'de	5 dakika son uzatma		

(110).

Her PCR çalışmasında bir pozitif, bir negatif kontrol örneği kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *Cryptosporidium* spp. pozitif dışkı örneği, negatif kontrol olarak ise ajirojen su kullanıldı. Elde edilen PCR ürünü görüntüleme yöntemi uygulanıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Tablo 4: *Micrsporidium* spp.'nin PCR'ında kullanılan primerler.

Öncül	Dizi
C1	5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC-3'
C2	5'-CCTCTCCGGAACCAAACCCTG-3'

3.2.2.2.4 Elde Edilen PCR Ürününün Saflaştırılması

Bölüm 3.2.2.1.4'te belirtildiği şekilde uygulandı.

3.2.2.2.5 Elde Edilen PCR Ürününün Görüntülenmesi

Elde edilen bantlar Bölüm Bölüm 3.2.2.1.5'de belirtilen jel konsantrasyonu %1.5 olacak şekilde hazırlanan agaroz jelde görüntülendi.

%1.5 Agaroz Jelin Hazırlanması:

TBE (1X)	40 ml
Agarose 100 gr. (Prona) (Basica Le)	0.6 g
Etidyum bromid	2.5 µl

Marker (PBR 322 HAE III) (Bioron, 312005) olarak kullanıldı. Panmicrosporidian primerler kullanıldığı için RFLP yapılmadan PCR ürününün bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı.

3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 11.0 programında hazırlandı. Olguların demografik özellikleri ile parazitin saptanması arasındaki ilişkilerin analizinde χ^2 testi, yaş ortancalarının hesaplanmasında t testi uygulandı. Kinyoun acid fast ve Weber'in trichrome boya yöntemi ile PCR yöntemlerinin karşılaştırılmasında duyarlılık ve seçicilik kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu projede 162 ishali dışkı örneği çalışmaya alındı. Tüm örnekler mikroskopik inceleme ve moleküler yöntemle değerlendirildi. Olguların %4.9'unda *Blastocystis hominis*, %1.8'inde *Giardia intestinalis*, %1.8'inde *Entamoeba hartmanni*, %1.2'sinde *Trichomonas hominis*, %1.2'sinde *Cyclospora cayatanensis*, %0.6'sında *Endolimax nana*, %0.6'sında *Entamoeba histolytica*, %0.6'sında *Entamoeba coli* saptandı.

4.1 Olgulara Ait Bulgular

4.1.1 Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmaya alınan olguların %48.8'i kadın, %51.2'si erkek idi. Yaş ortancaları 44.50 idi (min. 1-max. 84yaş).

4.1.2 Olgulara Ait Klinik Bulgular

Çalışmaya alınan olguların %24.7'sinin tek yakınması, %75.3'ünün birden fazla yakınması mevcuttu.

Olguların ishale eşlik eden yakınmaları değerlendirildiğinde %52.4'ünde karın ağrısı, %33.3'ünde meteorizm, %23.4'ünde bulantı, %12.3'ünde kusma, %6.8'inde ateş, %1.8'inde ise anal bölgede kaşıntı ve kanama yakınmalarının olduğu belirlendi.

Çalışmaya alınan olguların ishal dereceleri değerlendirildiğinde, %50'sinin Bristol dışkı skalası 5, %30.2'sinin Bristol dışkı skalası 6, %19.8'inin Bristol dışkı skalası 7 ile uyumlu olduğu belirlendi.

Olguların ishal süreleri değerlendirildiğinde, %67.2'sinin 1 haftadan kısa süreli, %23.5'inin 1-2 hafta, %9.3'ünün 2 haftadan daha uzun süreli ishali olduğu belirlendi.

Çalışmaya alınan olgular günlük dışkılama sayıları açısından değerlendirildiğinde %77.8'inin günde 1-5 kez, %18.6'sının 6-10, %3.1'inin 10'dan fazla dışkılaması olduğu belirlendi. 1 olgunun kolostomisi olması nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı.

Çalışmaya alınan olguların %5.6'sına, mevcut yakınmalarına yönelik antibiyotik tedavisi uygulaması vardı. Antibiyotik tedavisi alan olguların kullandıkları ilaçlar Tablo 5'te belirtilmiştir.

Tablo 5: Uygulanan antibiyotik tedavisi.

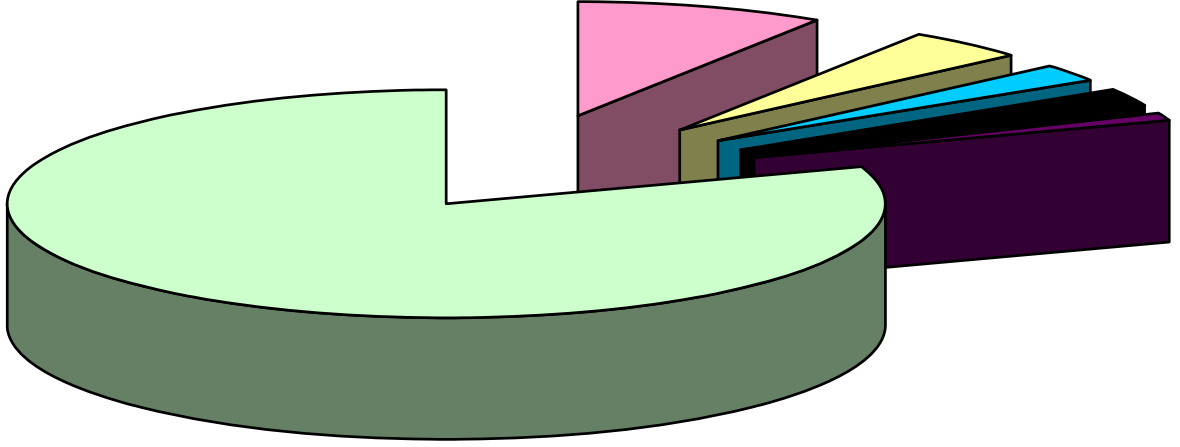
İlaç	Sayı (%)
Metranidazol (Flagyl, Nidazol)	4 (%50)
Amoksisilin+Klavulonat (Augmentin)	1 (%12.5)
Ciprofloksacin (Ciproxin)	1 (%12.5)
Seftriakson+Vancomycin (Rocephin+Vancomisin)	2 (%25)
Toplam	8* (%100)

* : 1 olguya metronidazol ve seftriakson tedavisi birlikte uygulanmıştır.

Çalışmaya alınan olguların %19.8'inin immun sistemi baskılayan bir hastalığı ve buna yönelik ilaç tedavisi uygulaması mevcuttu.

İmmun sistemi baskılanmış hastaların dağılımı Şekil 5'te verilmiştir.

■ Maligniteler (%9.2)	■ İltihabi Barsak Hastalıkları (%4.3)
■ Organ Transplantasyonu (%2.4)	■ Enfeksiyonlar (%2.4)
■ Diğer (%1.2)	■ İmmun sistemi baskılayan hastalığı olmayan (%80.2)



Şekil 5: İmmun sistemi baskılanmış hastaların dağılımı.

4.1.3 Olgulara Ait Çevresel Faktörler

Çalışmaya alınan olguların %19.8'inin aile bireylerinde de benzer yakınmalar olduğu belirlendi.

Olguların %7.4'ü kırsal bölgede, %92.6'sı şehirde ikamet etmekte idi.

Olguların kullandıkları içme suyu değerlendirildiğinde %7.4'ünün içme suyu olarak artezyen ve kuyu suyu %63'ünün şebeke suyu, %29.6'sının damacana ve şebeke suyu kullandığı belirlendi. Artezyen ve kuyu suyu kullanan olgulardan %91.7'sinin Buca-Karacaağaç köyü, %8.3'ünün Buca-Kırıklar köyünde yaşadığı belirlendi.

Çalışmaya alınan olgular tuvaletlerinin evin içerisinde olup olmaması açısından değerlendirildiğinde tümünün tuvaletlerinin ev içerisinde olduğu belirlendi.

Olguların tümünün tuvaletten sonra el yıkama alışkanlığının olduğu öğrenildi.

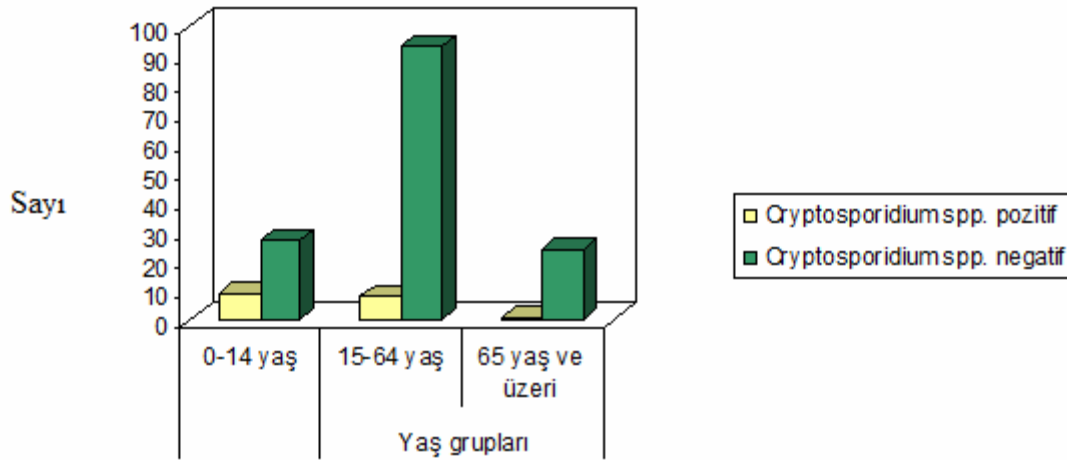
4.2 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olgulara Ait Bulgular

4.2.1 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmaya alınan olguların 18'inde (%11.1) *Cryptosporidium* spp. saptandı. Olgulardan *Cryptosporidium* spp. saptananların %55.6'sı kadın, %44.4'ü erkekti. Çalışmaya alınanlar arasında *Cryptosporidium* spp. görülme açısından kadın ve erkekler arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.718$).

Çalışmaya alınan olgulardan *Cryptosporidium* spp. saptananların yaş ortancası 28.5 idi. Çalışmamızda yaş grupları T.C. Sağlık Bakanlığı nüfus piramidi üzerinde bağımlı nüfusların değerlendirilmesi şeklinde yapılmıştır. Buna göre 0-14 yaş arası genç bağımlı, 15-64 yaş arası üretken, 65 yaş üzeri nüfus ise yaşlı bağımlı gruplar olarak ele alınmıştır.

Yaş gruplarının *Cryptosporidium* spp. görülmesi üzerine etkisi Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6: Yaş gruplarının *Cryptosporidium* spp. görülmesi üzerine etkisi.

Çalışmaya alınanlar arasında *Cryptosporidium* spp. saptananların yaş ortalamaları 28.5, *Cryptosporidium* spp. saptanmayanların yaş ortalamaları 40.2 idi. *Cryptosporidium* spp. saptananların yaş ortalamaları anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0.006$).

4.2.2 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular

Çalışmaya alınan olgulardan *Cryptosporidium* spp. saptananların %33.3'ünün bir yakınması, %66.7'sinin birden fazla yakınması mevcut idi.

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %55.6'sının karın ağrısı, %22.2'sinin meteorizm, %38.9'unun bulantı, %16.7'sinin kusma, %11.1'inin ateş yakınması, %5.5'inin anal bölgede kaşıntı, kanama gibi diğer yakınmaları olduğu saptandı.

Her bir klinik yakınma ile *Cryptosporidium* spp. saptanması arasındaki ilişki Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Diğer yakınmalarla *Cryptosporidium* spp. saptanması arasındaki ilişki.

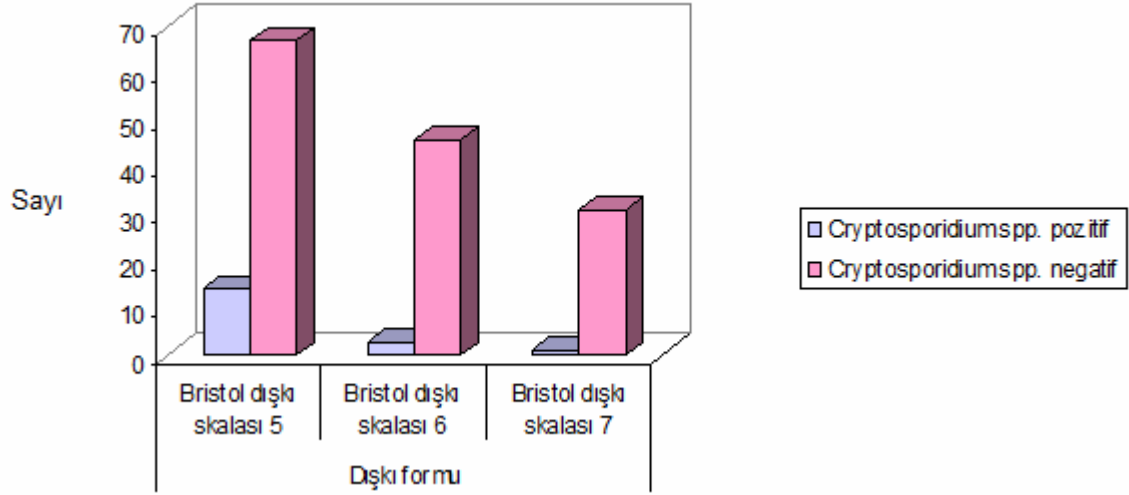
Yakınma*		<i>Cryptosporidium</i> spp.		Toplam	p değeri
		Pozitif	Negatif		
Karın ağrısı	(+)	10	75	85	p=0,978
	(-)	8	69	77	
Meteorizm	(+)	4	50	54	p=0,426
	(-)	14	94	108	
Bulantı	(+)	7	31	38	p=0,137
	(-)	11	113	124	
Kusma	(+)	3	17	20	p=0,469
	(-)	15	127	142	
Ateş	(+)	2	9	11	p=0,351
	(-)	16	135	151	
Diğer	(+)	1	2	3	p=0,299
	(-)	17	142	159	

*: Birden fazla yakınma birlikte işaretlenmiştir.

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %83.3'ünün 1 haftadan kısa süreli, %5.6'sının 1-2 hafta arası, %11.1'inin 2 haftadan uzun süren ishali mevcuttu.

İshal süreleri ile *Cryptosporidium* spp. saptanması arasındaki ilişki Şekil 7'de verilmiştir. *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması ile ishal süresi karşılaştırıldığında parazit varlığının ishal süresini etkilemediği belirlendi ($p=0.185$).

Olguların ishal dereceleri ile *Cryptosporidium* spp. görülmesi arasındaki ilişki Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7: İshal dereceleri ile *Cryptosporidium* spp. görülmesi arasındaki ilişki.

Cryptosporidium spp. saptanan olguların ishal dereceleri değerlendirildiğinde %77.8'inin Bristol dışkı skalası 5, %16.7'sinin Bristol dışkı skalası 6, %5.5'inin Bristol dışkı skalası 7 ile uyumlu olduğu belirlendi.

Çalışmaya katılanlar arasında, *Cryptosporidium* spp. saptanması açısından Bristol dışkı skalası 5 dışkı formu ile diğer formlar arasında anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.016$). Olgulardan büyük kısmının dışkı formunun Bristol dışkı skalası 5 ile uyumlu olduğu belirlendi.

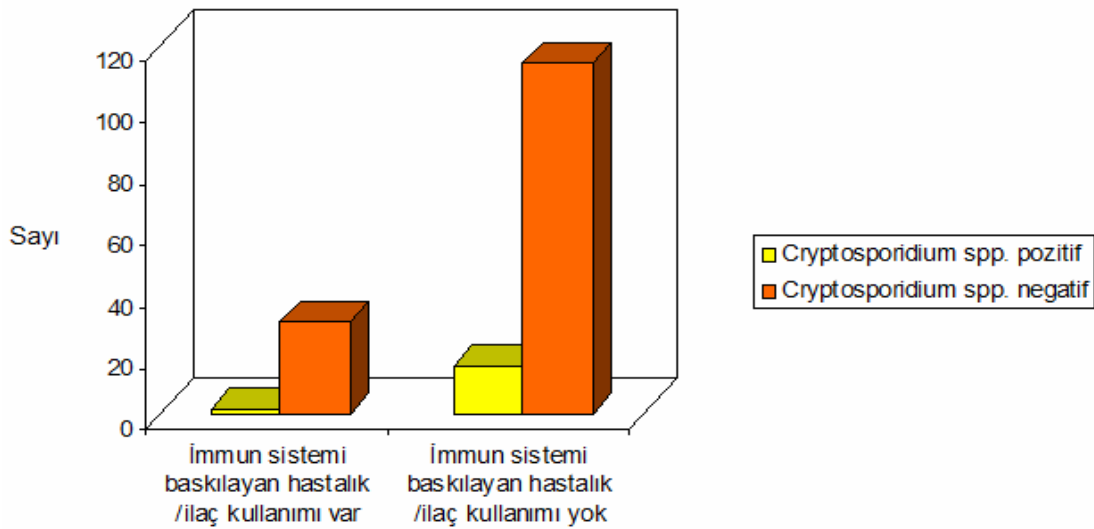
Cryptosporidium spp. saptanan olgular günlük dışkılama sayısı açısından değerlendirildiğinde %89'unun günlük dışkılama sayısının 1-5, %5.5'inin 6-10, %5.5'inin 10'un üzerinde olduğu saptandı. *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması ile

günlük dışkılama sayısı karşılaştırıldığında, parazit varlığının günlük dışkılama sayısını etkilemediği belirlendi ($p=0.366$).

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %16.7'sinin ishal etiyolojisinin araştırılmasından önce bu yakınmasına yönelik tedavi aldığı saptandı.

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %11.1'inin immun sistemi baskılayan bir hastalığı ve buna yönelik ilaç tedavisi uygulaması mevcuttu.

Olguların immun sistemi baskılayan hastalık ve buna yönelik ilaç kullanımı ile *Cryptosporidium* spp.'nin saptanma durumu Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8: İmmun sistemi baskılayan hastalık/ ilaç kullanımı ile *Cryptosporidium* spp. arasındaki ilişki.

Çalışmaya katılan olguların immun sistemi baskılayan hastalık ve buna yönelik ilaç kullanımı açısından aralarında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.530$). Olgulardan *Cryptosporidium* spp. saptananların sadece 2'si immun sistemi baskılanmış hastalardı. Bunlardan 1'inin HIV pozitif, diğerinin de hem HIV pozitif, hem de lenfoma hastası olduğu saptandı.

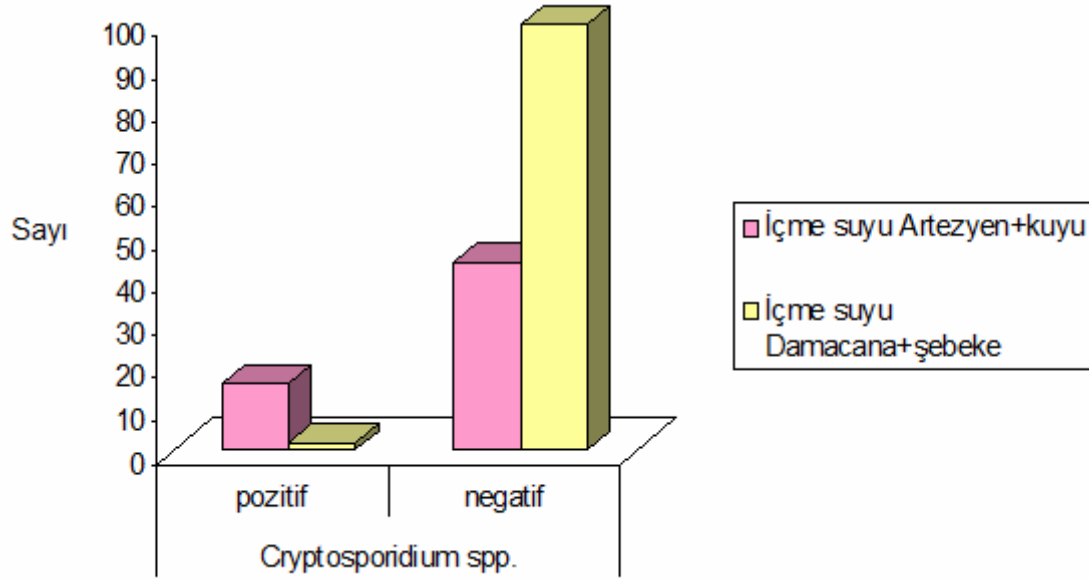
4.2.3 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olgulara Ait Çevresel Faktörler

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %44.4'ünün aile bireylerinde benzer yakınmalar olduğu belirlendi. Bu oran istatistiksel olarak anlamlı idi ($p= 0.01$). Ele alınan örnek sayısının kısıtlılığına karşın, araştırılan parazitin bulaşında aile içi temasın etkili olduğu düşünüldü.

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %61.1'inin kırsal bölgede, %38.9'unun şehirde yaşadığı saptandı.

Cryptosporidium spp. saptanan olgulardan %88.9'unun içme suyu olarak artezyen ve kuyu suyu, %11.1'inin şebeke ve damacana suyu kullandığı saptandı. Artezyen ve kuyu suyu kullanan olgulardan %91.7'sinin Buca-Karacağağaç köyü, %8.3'ünün Buca-Kırıklar köyünde yaşadığı belirlendi.

Kullanılan içme suyunun *Cryptosporidium* spp. saptanmasına etkisi Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9: İçme suyu ile *Cryptosporidium* spp. arasındaki ilişki.

Çalışmaya alınanlar arasında, artezyen ve kuyu suyu kullananlarda *Cryptosporidium* spp. saptanma oranı, şebeke ve damacana suyu kullananlara göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$).

Olguların tümünün tuvaletinin evin içerisinde olduğu ve tuvaletten sonra el yıkama alışkanlıkları olduğu belirlendi.

4.2.4 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirmesi

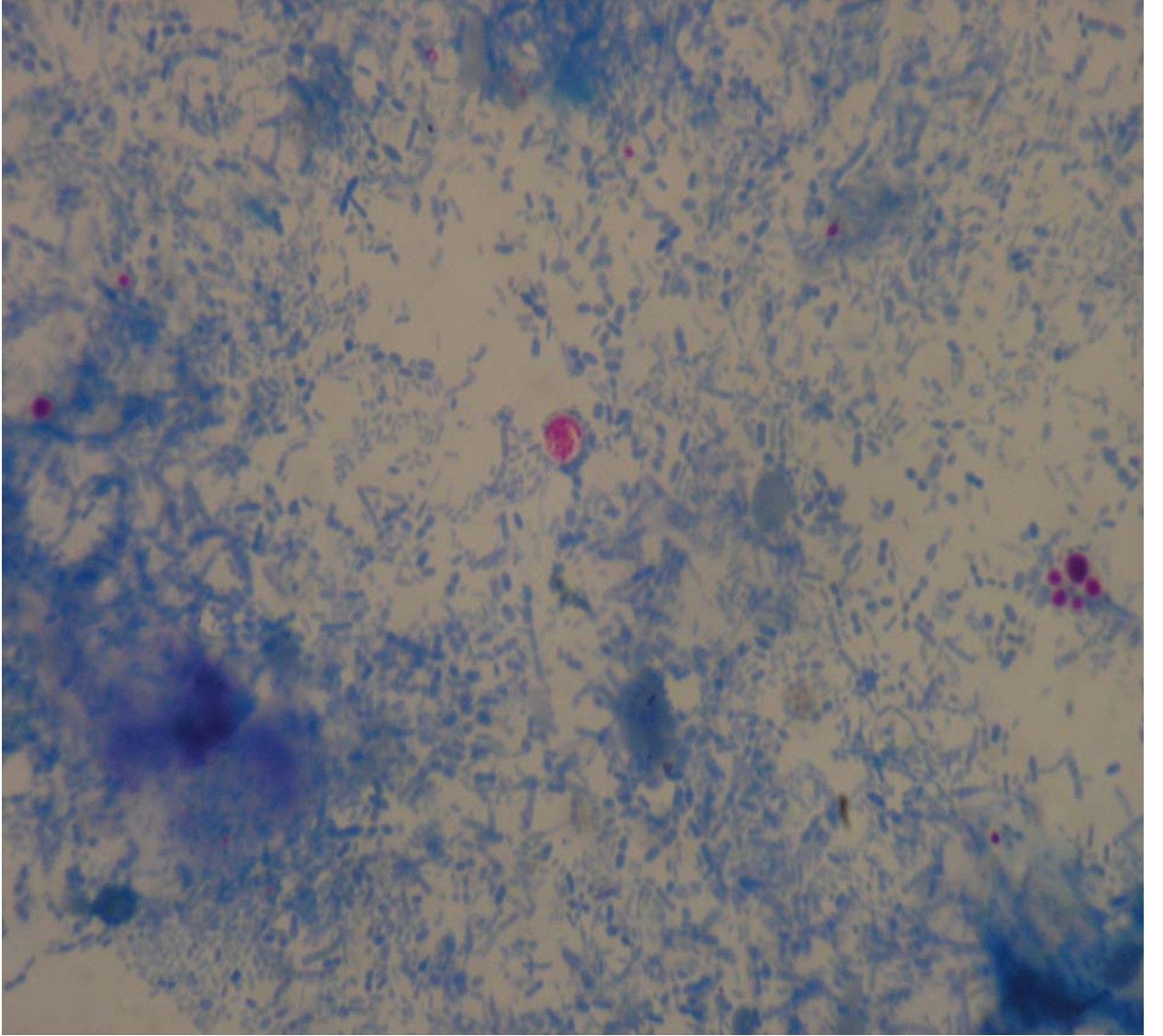
İshal yakınması olan 162 olguya ait dışkı örnekleri Kinyoun acid fast boya yöntemi ile boyandıktan sonra x100 büyütme ile mikroskopik olarak değerlendirildi. Olguların 18'inde (%11.1) *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptandı.

Mikroskopik değerlendirme sonucu *Cryptosporidium* spp. saptanan olgularda parazit yoğunluğu Tablo 7'de verilmiştir.

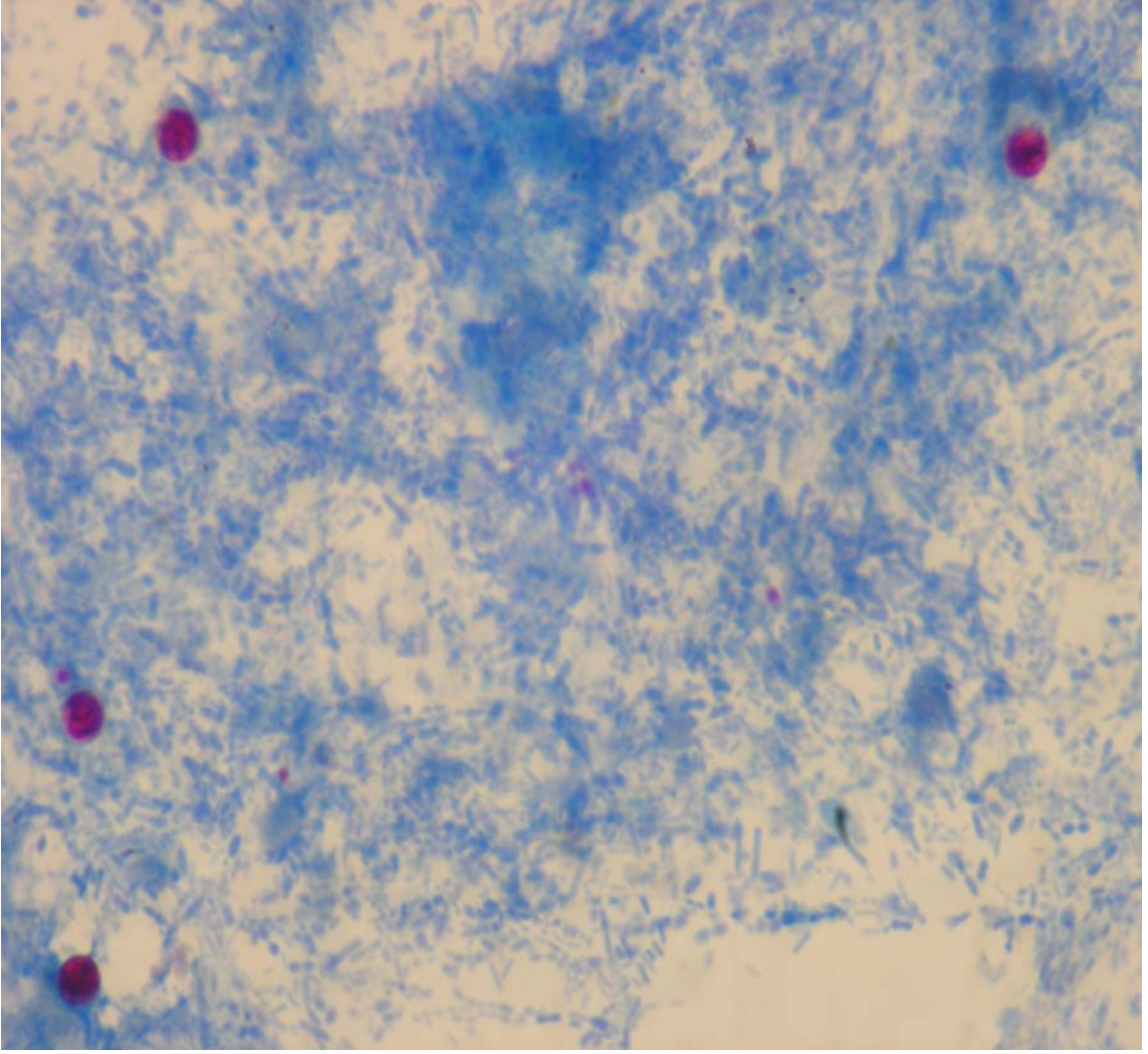
Tablo 7: *Cryptosporidium* spp. saptanan olgularda parazit yoğunluğu.

Kinyoun Acid Fast Boya Yöntemi	Sayı (%)
Parazit yok	144 (88.9)
20 alanda 1'den az	9 (5.6)
20 alanda en az 1	6 (3.7)
Her alanda 1-10	2 (1.2)
Her alanda 11-100	1 (0.6)

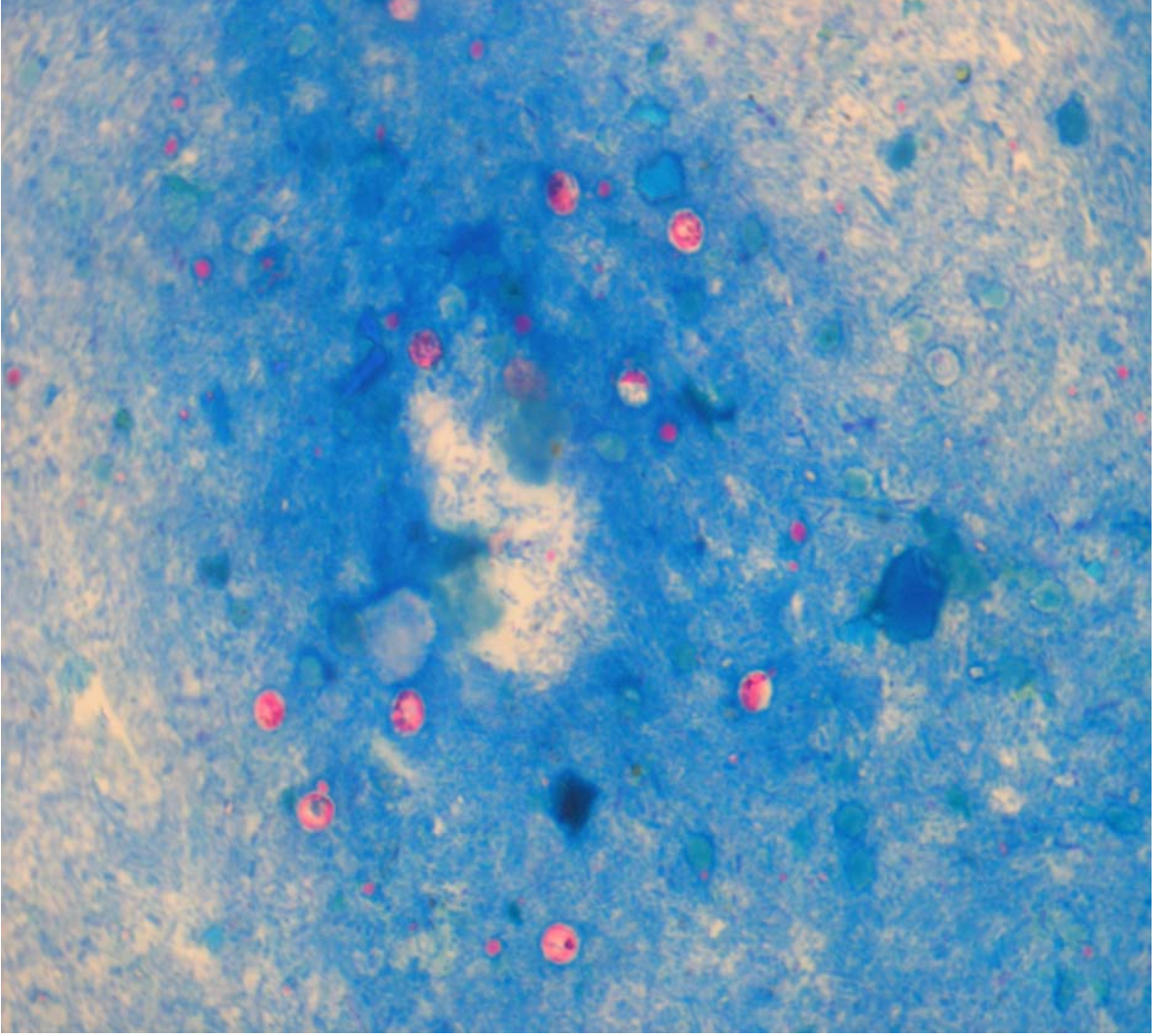
Boya yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların parazit yoğunluğuna göre değerlendirilmesi Şekil 10'da verilmiştir.



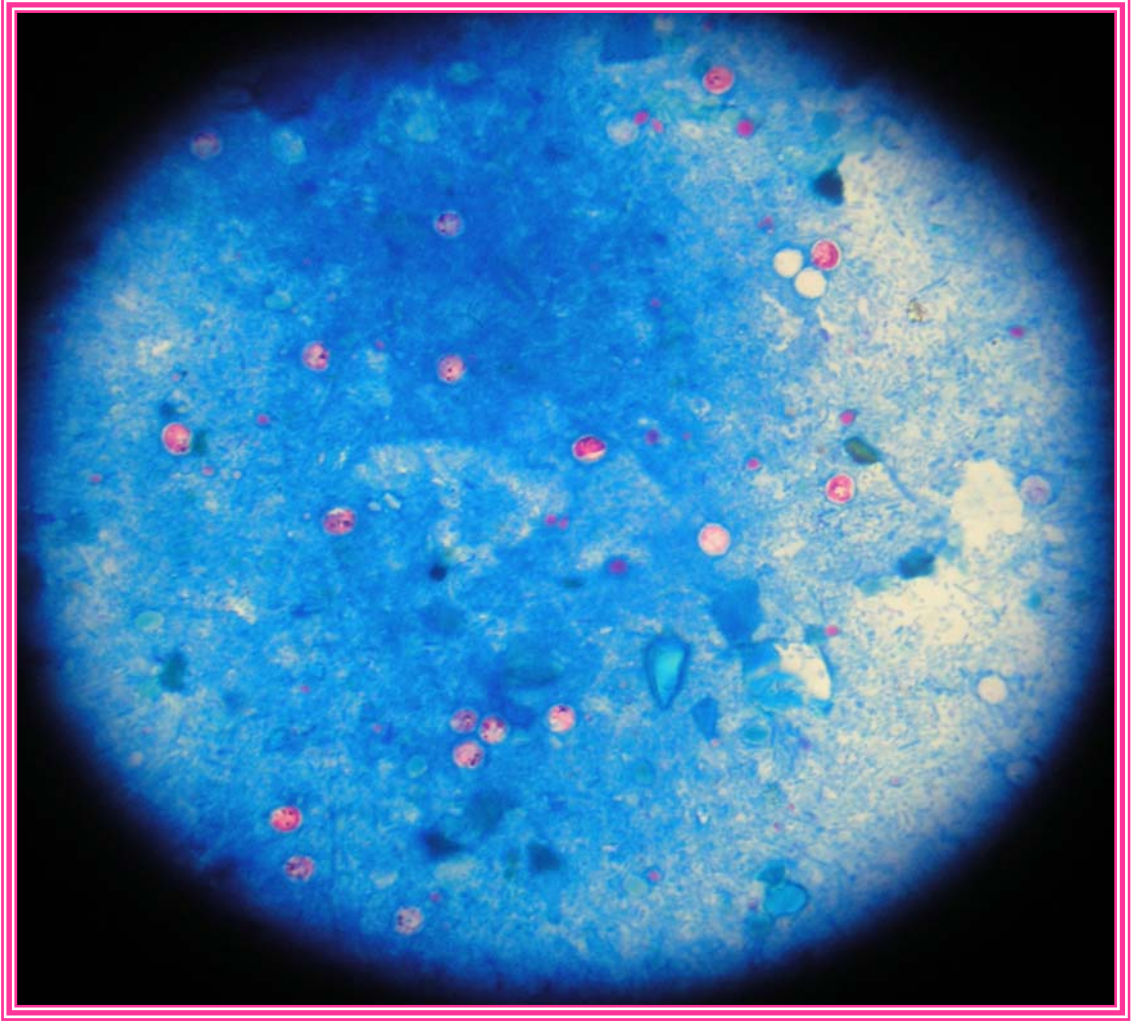
Şekil 10.a: “20 alanda 1’den az” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü.



Şekil 10.b: “20 alanda en az 1” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü.



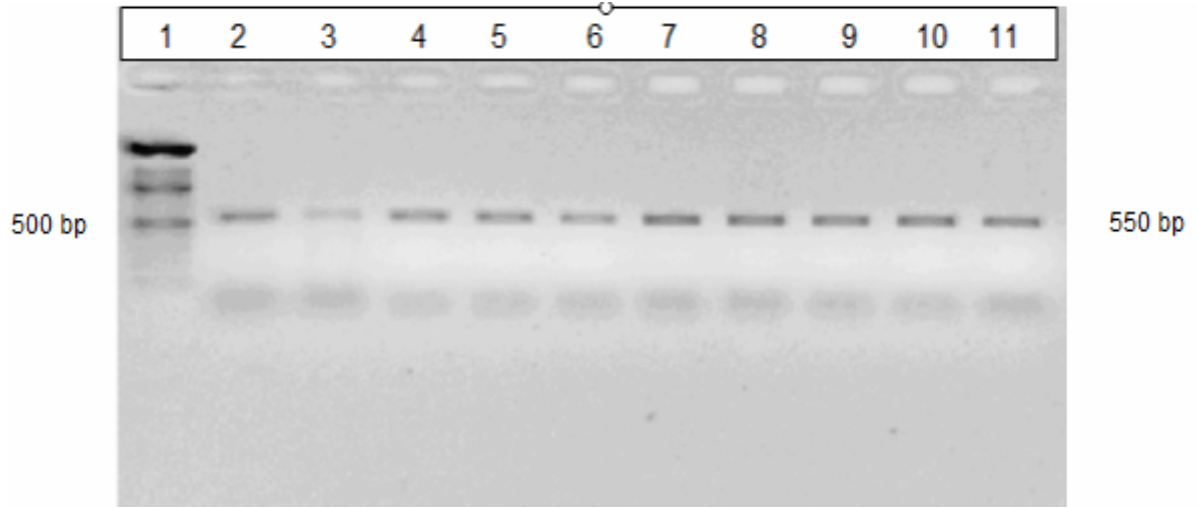
Şekil 10.c: “Her alanda 1-10 arası” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü.



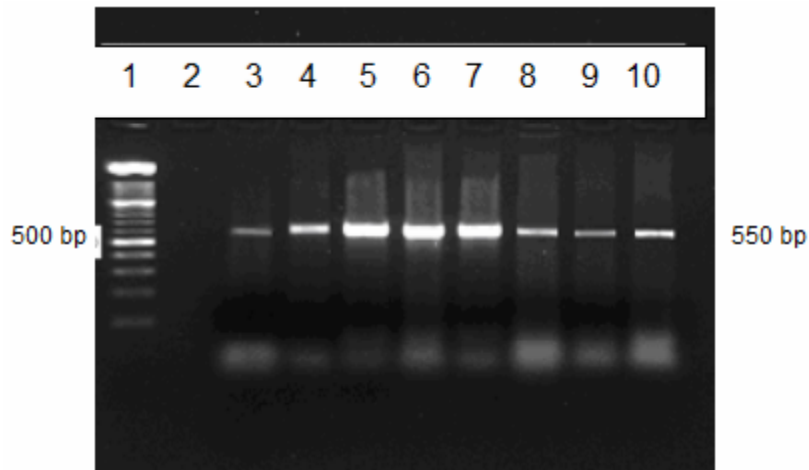
Şekil 10.d: “Her alanda 11-100 arası” parazit yoğunluğunun boyalı preparat görüntüsü.

4.2.5 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olguların PCR sonuçları

PCR için uygun saklanma koşullarının belirlenmesi için yapılan ön çalışmada mikroskopi sonucu pozitif olarak değerlendirilen 10 olgunun formalinle sulandırılarak saklanan örneklerine uygulanan PCR sonucunda 5’inde özgül bant saptanırken, aynı olguların -80°C’de saklanan örneklerinin tümünde PCR ile pozitif sonuç elde edildi. Tüm olguların -80°C’de saklanan örneklerine uygulanan PCR yöntemi ile olguların 21’inde (%12.9) *Cryptosporidium* spp.’ye özgül bant olan 550 bp bant saptandı. PCR ile *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların PCR görüntüsü Şekil 11’de verilmiştir.



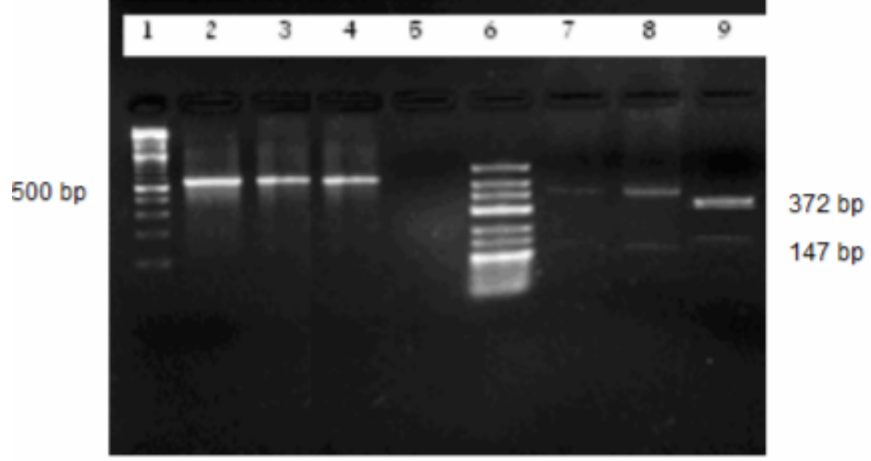
Şekil 11.a: *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların %1 agaroz jelde PCR sonuçları. **1:** Marker (100 bp ladder). **2:** *Cryptosporidium* spp. pozitif kontrol. **3-11:** *Cryptosporidium* spp. pozitif olgular.



Şekil 11.b: *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların %1 agaroz jelde PCR sonuçları. **1:** Marker (100 bp ladder) **2:** Negatif kontrol. **3:** *Cryptosporidium* spp. pozitif kontrol. **4-10:** *Cryptosporidium* spp. pozitif olgular.

PCR ile pozitif değerlendirilen PCR ürünlerine tür ayrımı yapmak amacıyla RFLP yöntemi uygulandı. RFLP ile saptanan 34, 106, 413 bp bantların *Cryptosporidium parvum*, 34, 147, 372 bp bantların *Cryptosporidium meleagridis*'e ait olduğu belirlendi. Buna göre olguların 20'sinin (%12.3) *C. parvum*, 1'inin (%0.6) *C. meleagridis* türlerine ait olduğu belirlendi.

PCR ile *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların RFLP görüntüleri Şekil 12'de verilmiştir.

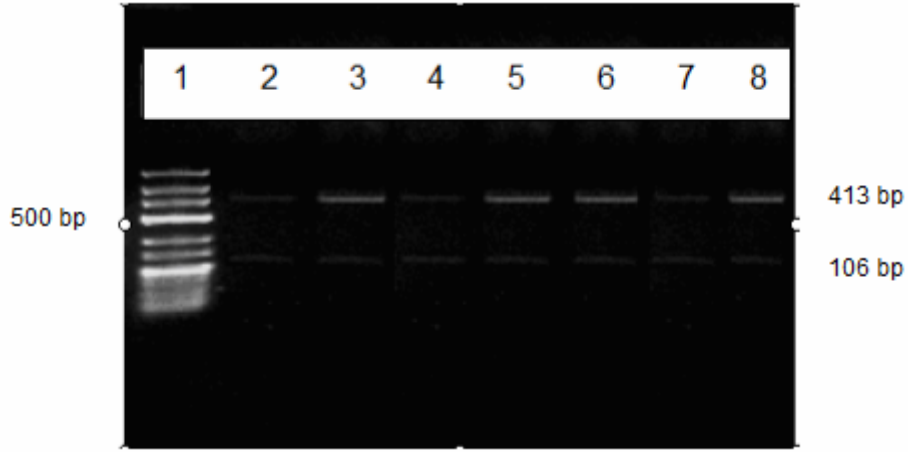


Şekil 12.a: *Cryptosporidium* spp. pozitif olguların % 2 agaroz jelde RFLP sonuçları.

1: Marker (100 bp ladder). **2:** *Cryptosporidium* spp. pozitif kontrol. **3-4:** *Cryptosporidium* spp. pozitif olgular. **5:** Negatif kontrol. **6:** Marker (25 bp ladder). **7:** *Cryptosporidium parvum* pozitif kontrol. **8:** *C. parvum* saptanan olgu. **9:** *C. meleagridis* saptanan olgu.

Cryptosporidium parvum spesifik bantlar 34, 106, 413 bp.

Cryptosporidium meleagridis spesifik bantlar 34, 147, 372 bp.



Şekil 12.b: *Cryptosporidium parvum* pozitif olguların % 2 agaroz jelde RFLP sonuçları. 1: Marker (25 bp ladder) 2-7: *C. parvum* saptanan olgular.

4.2.6 *Cryptosporidium* spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirme ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

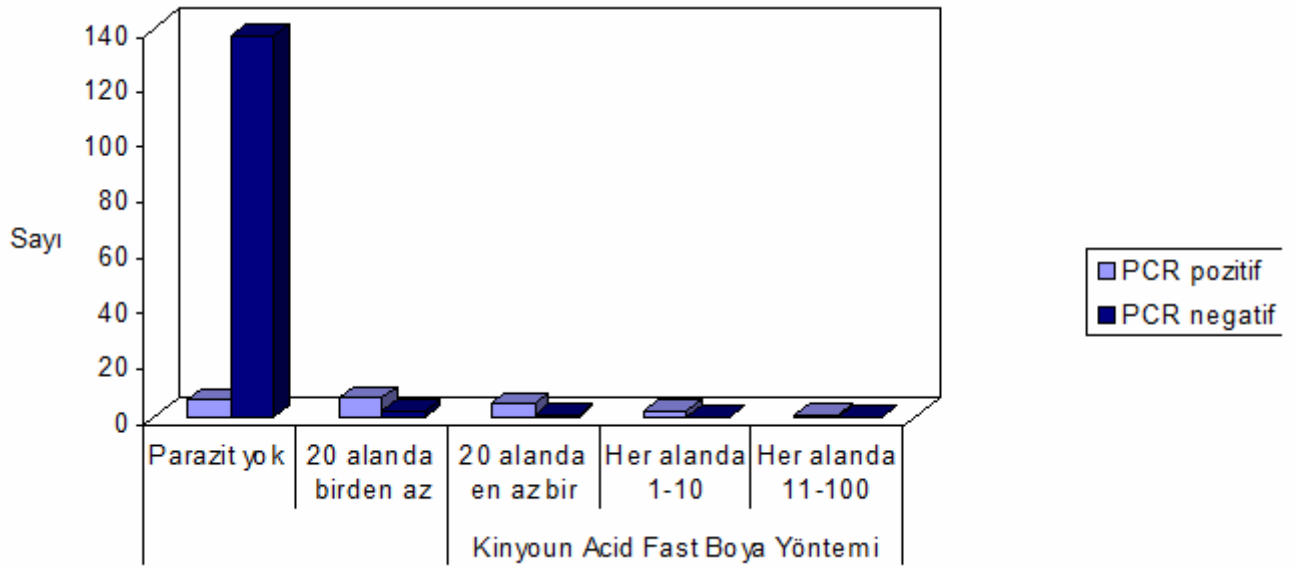
PCR'ın *Cryptosporidium* spp.'nin saptanmasındaki tanı değerinin anlaşılması amacıyla her iki yöntem ile pozitif olarak değerlendirilen olgular karşılaştırıldı.

Kinyoun acid fast boya yöntemi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: Kinyoun acid fast boya yöntemi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

		Kinyoun Acid Fast Boya Yöntemi	
		Pozitif	Negatif
PCR Yöntemi	Pozitif	15 (%83,3)	6 (%4,2)
	Negatif	3 (%16,7)	138 (%95,8)
Toplam		18 (%100)	144 (%100)

Kinyoun acid fast boya yöntemi ile belirlenen parazit yoğunluklarının PCR sonuçları ile karşılaştırılması Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13: *Cryptosporidium* spp. parazit yoğunluklarının PCR sonuçları ile karşılaştırılması.

Kinyoun acid fast boya yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde PCR yönteminin duyarlılığı %83.3, seçiciliği %95.8, pozitif prediktif değeri %71.4, negatif prediktif değeri %97.9 olarak hesaplandı.

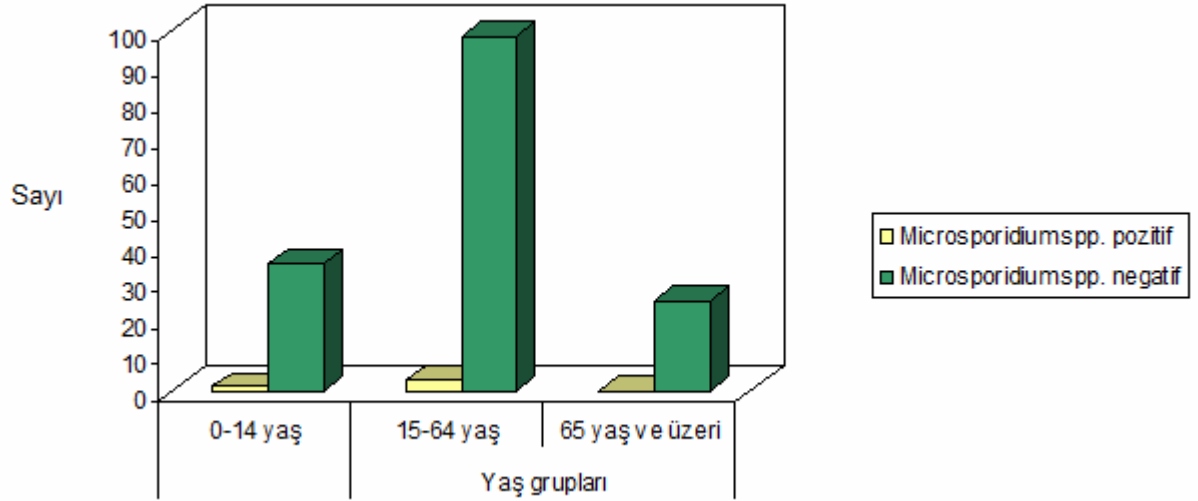
4.3 *Microsporidium* spp. Saptanan Olgulara Ait Bulgular

4.3.1 *Microsporidium* spp. Saptanan Olguların Demografik Özellikleri

Microsporidium spp. saptanan olguların sayısının az olması nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamamış, sadece yüzde değerleri verilebilmiştir.

Çalışmaya alınan 162 olgunun 4'ünde (%2.4) *Microsporidium* spp. saptandı. *Microsporidium* spp. saptananların %75'i erkek, %25'i kadın idi, yaş ortancaları 35.5 idi.

Yaş gruplarının *Microsporidium* spp. görülmesi üzerine etkisi Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14: Yaş gruplarının *Microsporidium* spp. görülmesi üzerine etkisi.

4.3.2 *Microsporidium* spp. Saptanan Olgulara Ait Klinik Bulgular

Microsporidium spp. saptanan olgulardan 2'sinin (%50) bir, 2'sinin (%50) ise birden fazla yakınması olduğu belirlendi.

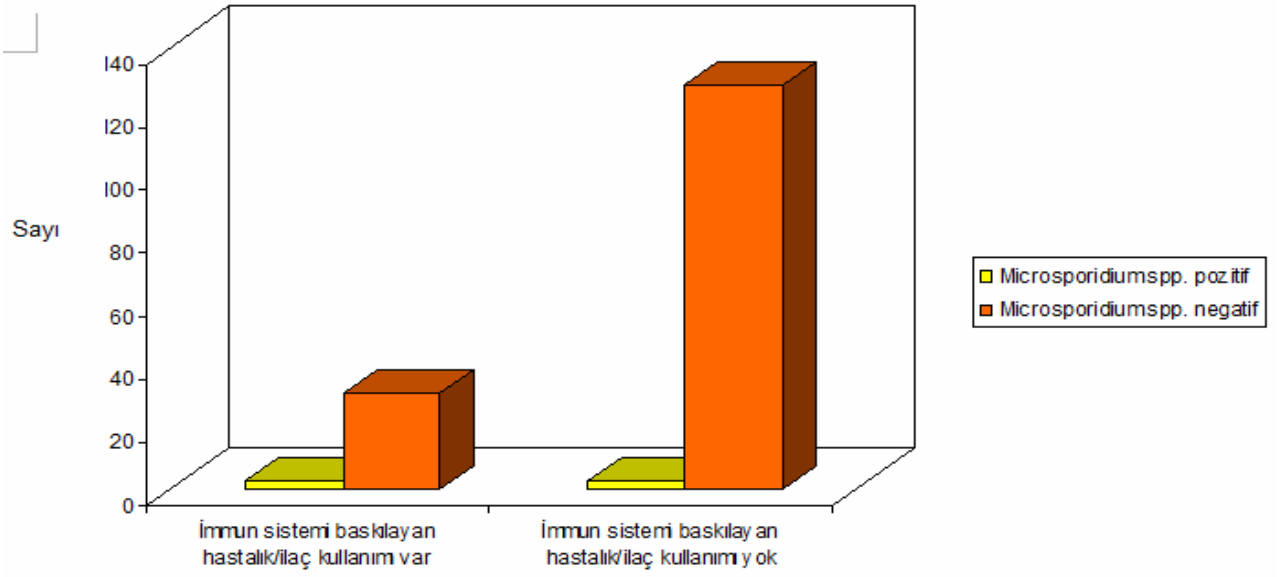
Microsporidium spp. saptanan olguların ishal dereceleri değerlendirildiğinde 1'inin (%25) Bristol dışkı skalası 5, 2'sinin (%50) Bristol dışkı skalası 6, 1'inin (%25) Bristol dışkı skalası 7 ile uyumlu olduğu belirlendi.

Olguların ishal süresi ile *Microsporidium* spp. görülmesi arasındaki değerlendirildiğinde 2'sinin (%50) 1 haftadan kısa süreli, 2'sinin (%50) ise 1 haftadan uzun süreli ishali olduğu belirlendi.

Microsporidium spp. saptanan olgulardan 3'ünün (%75) günde 1-5 kez, 1'inin (%25) ise günde 5'in üzerinde dışkılması olduğu belirlendi.

İshal yakınmasına yönelik tedavi alınması değerlendirildiğinde *Microsporidium* spp. saptanan olguların 2'sinin (%50) ishale yönelik antibiyotik tedavisi aldığı belirlendi.

Olguların immun sistemi baskılayan hastalık ve buna yönelik ilaç kullanımı ile *Microsporidium* spp. görülmesi arasındaki ilişki Şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 15: İmmün sistemi baskılayan hastalık ve buna yönelik ilaç kullanımı ile *Microsporidium* spp.'nin saptanması arasındaki ilişki.

4.3.3 *Microsporidium* spp. Saptanan Olgulara Ait Çevresel Faktörler

Microsporidium spp. saptanan olgulardan 2'sinin (%50) aile bireylerinde benzer yakınmalar olduğu belirlendi.

Olguların tümünün şehirde yaşadığı belirlendi.

Olguların tümünün içme suyu olarak şebeke ve damacana suyu kullandığı belirlendi.

Olguların tümünün tuvaletinin evin içinde olduğu ve tuvaletten sonra el yıkama alışkanlığı olduğu belirlendi.

4.3.4 *Microsporidium* spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirmesi

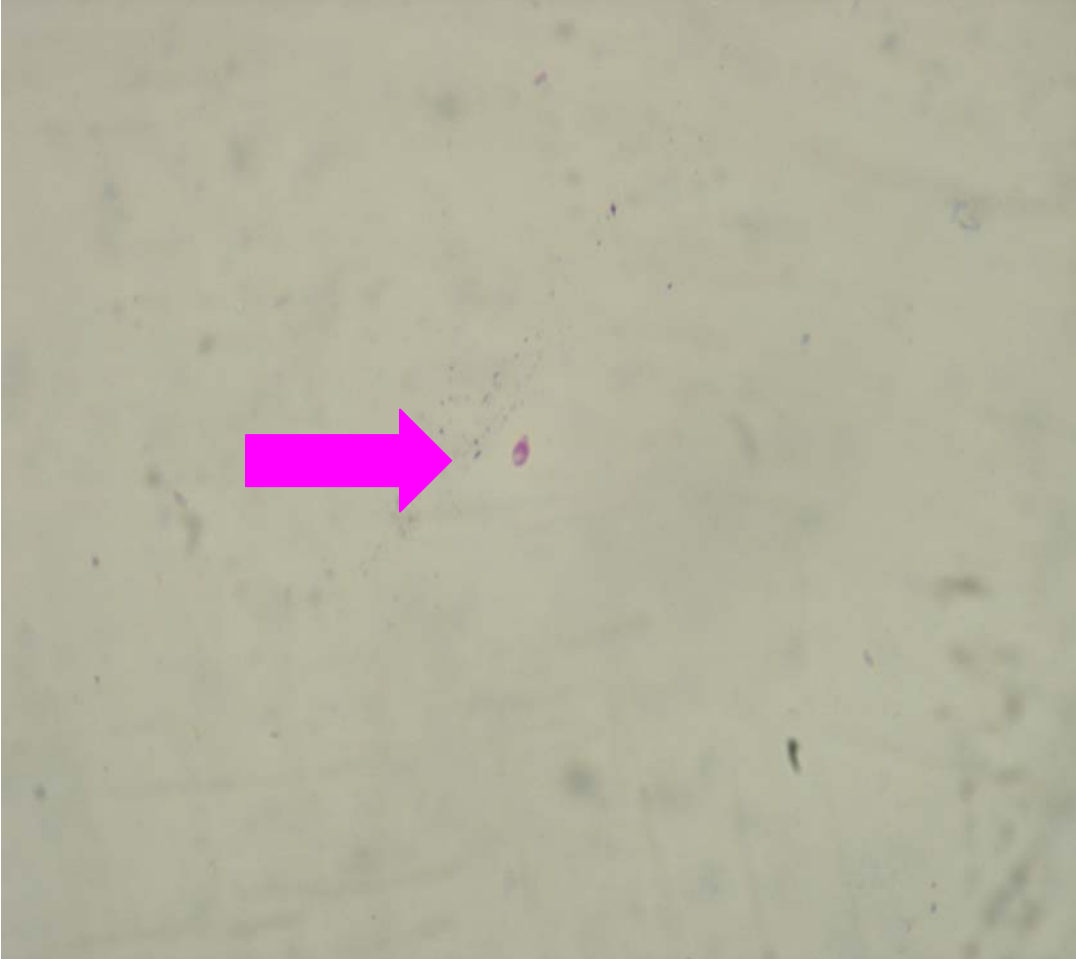
Olguların dışkı örnekleri Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi ile boyandıktan sonra x100 büyütme ile mikroskopik olarak değerlendirildi. Mikroskopik değerlendirme sonucu 4'ünde (%2.4) *Microsporidium* spp. saptandı.

Pozitif olgularda etkenin yoğunluğu Tablo 9'da verilmiştir.

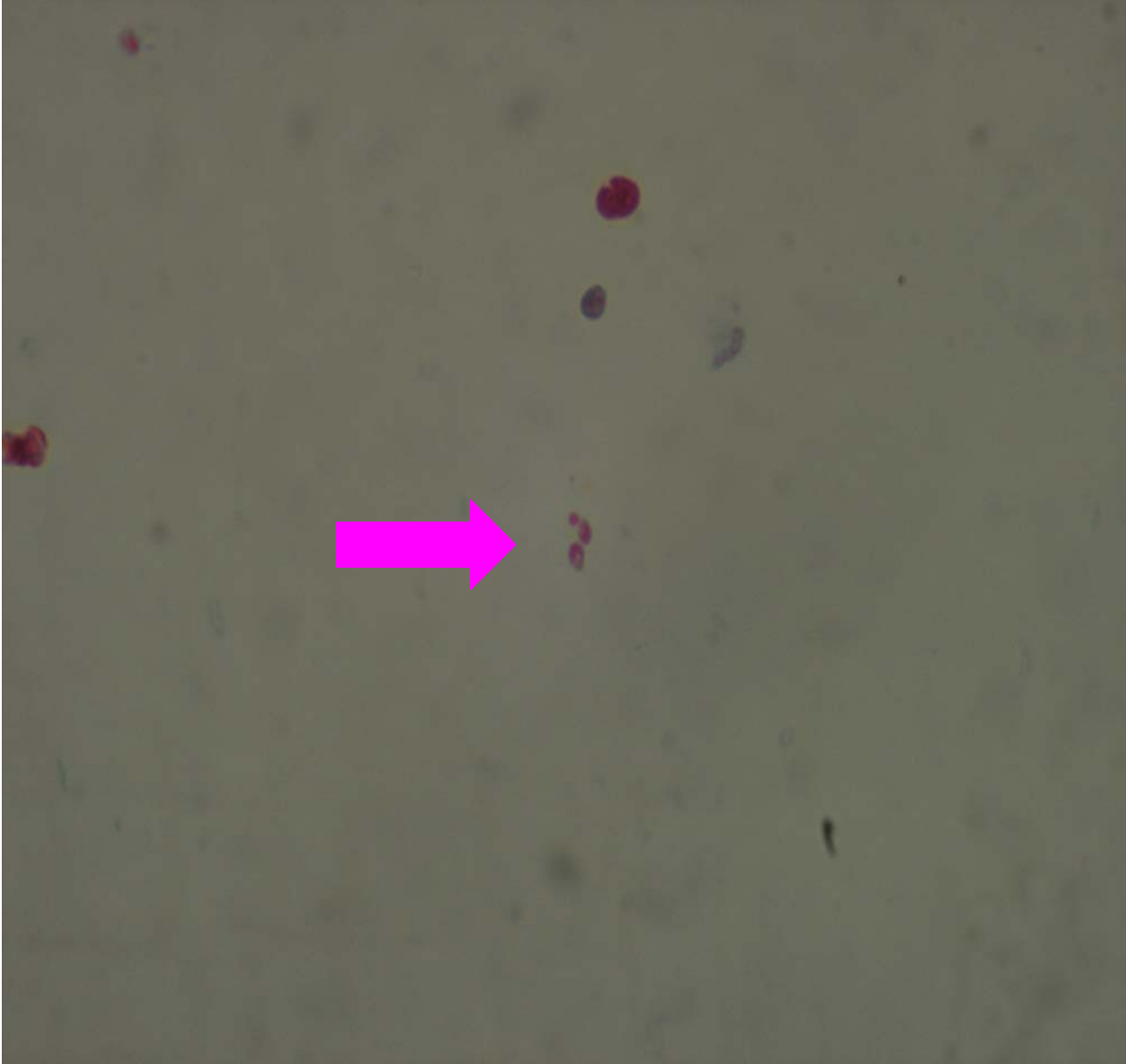
Tablo 9: Pozitif olgularda *Microsporidium* spp. yoğunluğu.

Weber'in Modifiye Trichrome Boyası	Sayı (%)
Etken yok	158 (97.5)
Her 10 alanda 1'den az	3 (1.9)
Her 10 alanda 1/her alanda 2	1 (0.6)
Toplam	162 (100)

Boya yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilen olguların *Microsporidium* yoğunluğuna göre değerlendirilmesi Şekil 16'da verilmiştir.



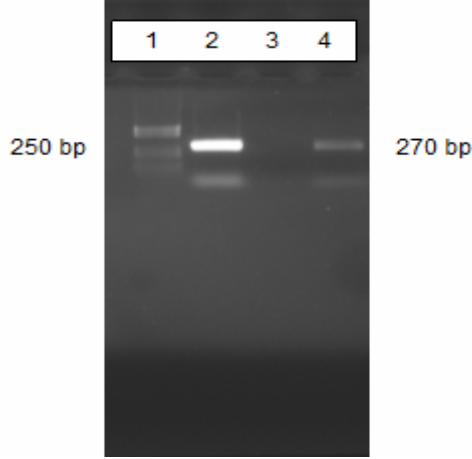
Şekil 16.a: “her 10 alanda 1'den az” *Microsporidium* spp. yoğunluğuna ait boyalı preparat görüntüleri.



Şekil 16.b: “her 10 alanda 1/her alanda 2” *Microsporidium* spp. yoğunluğuna ait boyalı preparat görüntüleri.

4.3.5 *Microsporidium* spp. Saptanan Olguların PCR Sonuçları

PMP1 ve PMP2 primerleri kullanılarak yapılan PCR yöntemi ile 270 bp bandın *E. intestinalis*'e ait olduğu belirlendi. Buna göre PCR ile pozitif olarak saptanan tek dışkı örneğinin *E. intestinalis* türüne ait olduğu belirlendi. Bu olguya ait PCR görüntüsü Şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 17: *E. intestinalis* saptanan olguya ait %1.5 agaroz jelde PCR görüntüsü. **1:** Marker (25 bp ladder). **2:** *E. intestinalis* pozitif kontrol. **3:** Negatif kontrol. **4:** *E. intestinalis* saptanan olgu.

E. intestinalis spesifik bant 270 bp.

4.3.6 *Microsporidium* spp. Saptanan Olguların Mikroskopik Değerlendirme ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Boya yöntemi ile PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10: Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

		Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi	
		Pozitif	Negatif
PCR yöntemi	Pozitif	1 (%25)	0
	Negatif	3 (%75)	158 (%100)
Toplam		4 (%100)	158 (%100)

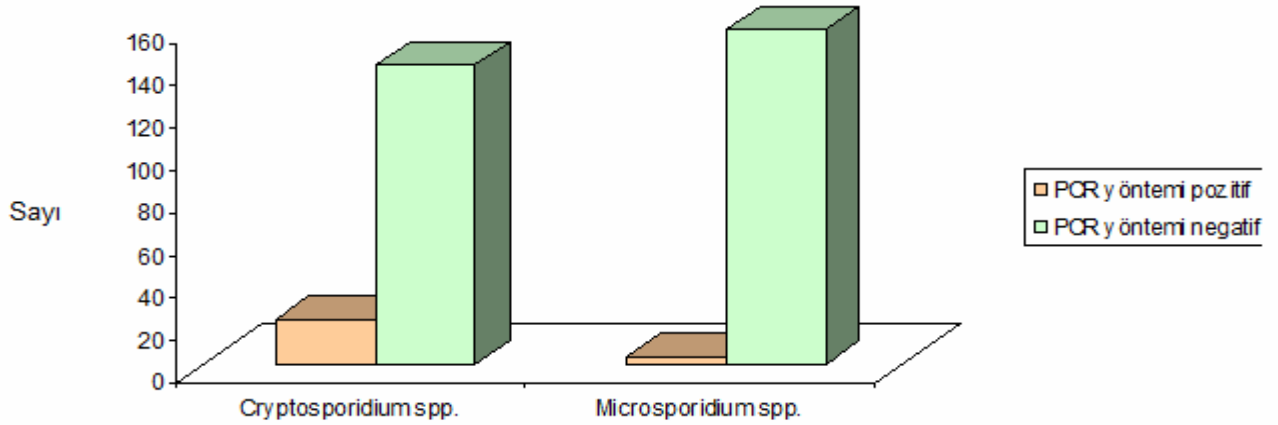
Pozitif olguların *Microsporidium* yoğunlukları ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: *Microsporidium* spp. için boyalı preparattaki etkenin yoğunluğu ile PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

		PCR		Toplam
		Pozitif	Negatif	
Weber'in Modifiye Trichrome Boyası	Etken yok	0	158	158
	Her 10 alanda 1'den az	1	2	3
	Her 10 alanda 1/her alanda 2	0	1	1

Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde PCR yönteminin duyarlılığı %25, seçiciliği %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %98.1 olarak hesaplandı.

PCR yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp.'nin saptanma durumları Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18: Her iki etkenin PCR ile saptanma durumu.

Olgulardan birinde hem boya yöntemleri, hem de PCR sonucunda her iki etken birden saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bulaş yolları, kliniği, enfeksiyon için risk grupları açısından benzer özellikler gösteren *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. tüm dünyada giderek daha fazla ilgi çeken etkenler olarak görülmektedir.

Cryptosporidium spp. özellikle gelişmekte olan ülkelerde, yetersiz beslenme koşullarında, çocuklarda, yaşlılarda ve immun sistemi baskılanmış kişilerde daha sık görülmekte, son yıllarda özellikle AIDS hastalarında önemli fırsatçı enfeksiyon etkenleri arasında kabul edilmektedir (136, 137, 138).

Son yıllarda görülen su kaynaklı *Cryptosporidium* salgınları önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (139).

Cryptosporidium spp. insanlar ve hayvanlarda ishale neden olan önemli bir patojendir. Türlerin identifikasyonu insan ve hayvanlardaki *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin ortaya konması açısından önemli olacaktır (140).

Bu konuda yapılmış epidemiyolojik çalışmalarda özellikle cryptosporidiosisin bulaş yolları ve kliniğine yönelik verilerin değerlendirildiği görülmektedir.

Cinsiyetin enfeksiyonun görülmesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde cinsiyet farkı ile enfeksiyon görülmesi arasında ilişki saptanmadığı belirlenmiştir (141, 142). Çalışmamızda kısıtlı sayıda dışkı örneğinin değerlendirilmiş olmasına karşın enfeksiyonun görülmesinde cinsiyetin etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Birçok gelişmiş ülkede cryptosporidiosis 1-4 yaşlar arasında daha fazla görülmektedir (138, 141, 142, 143). Çocukluk çağındaki prevalansı, bu yaş grubunda hijyen eksikliğine bağlı bulaşmanın daha kolay olması ve henüz immun sistemin gelişmemesi etkilemektedir (144). Bu nedenle *Cryptosporidium*'un çocukluk çağındaki ishallerde önemli bir etiyolojik ajan olduğu ve ishallerin rutin parazitolojik değerlendirilmesinin gerektiği düşünülmüştür (142).

Çocukluk yaş grubunda cryptosporidiosisin prevalansının yüksek olduğunu belirten çalışmaların yanı sıra, enfeksiyonun 35 yaş ve üzeri yetişkinlerde daha yüksek oranda görüldüğünü bildiren çalışmalara da rastlanmaktadır. Bu durumun, olguların cryptosporidiosis enfeksiyonu açısından çevresel faktörlerle daha fazla karşılaşması veya riskli davranışlar göstermesi nedeniyle olabileceği düşünülmüştür (39).

Çalışmamızda enfeksiyon çocukluk ve üretken yaş gruplarında daha yüksek oranda görülmüştür. Bu durum çocukluk yaş grubunda immun sistemin tam olarak gelişmemiş olması ve hijyen eksikliği ile açıklanabilirken, üretken yaş grubunda, literatürde belirtildiği gibi enfeksiyon açısından çevresel faktörlerle sık karşılaşılması ile açıklanabilir.

Cryptosporidiosisde en sık görülen yakınmalardan biri olan karın ağrısının %40 ile %96 arasında değiştiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (141, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151). Ancak bu yakınmanın diğer ishal yapan ajanlarda da görülebilmesi nedeniyle klinik tanı koyulmasının güç olduğu bildirilmiştir (148). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan %55.6'sının karın ağrısı yakınması olduğu saptanmıştır.

Enfeksiyonun en sık görülen klinik bulguları şiddetli, sulu ve genellikle mukuslu ishaldir (23). Arap ülkeleri ve Asya'da yapılan çalışmalarda enfeksiyonun ishallerde hastalarda, ishal yakınması olmayanlara göre daha yüksek oranda saptandığı bildirilmiştir (149, 152, 153, 154).

Cryptosporidiosis meteorizmin ishale eşlik edebildiği bildirilmiştir (141, 149, 150, 151). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan %22.2'sinin meteorizm yakınması olduğu saptanmıştır.

Enfeksiyonda görülen bir diğer yakınma olan bulantının ise %44 ile %48.3 arasında değiştiği bildirilmektedir (141, 146, 147, 148, 149, 150, 151). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan %38.9'unun bulantı yakınması olduğu saptanmıştır.

Kusma cryptosporidiosis salgınlarının en belirgin özelliğidir. Kusmanın şiddeti parazitin suşu ve yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir (155). Bu konuda yapılan çalışmalarda kusma yakınmasının %33 ile %65 arasında değiştiği bildirilmektedir (141, 145, 148, 149, 150, 151, 154). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan %16.7'sinin kusma yakınması olduğu saptanmıştır.

Enfeksiyonda daha az sıklıkta görüldüğü bilinen ateş yakınmasının ise %37 ile %80.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (145, 146, 147, 148, 154). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan %11.1'inin ateş yakınması olduğu saptanmıştır.

Projemizde *Cryptosporidium* spp. saptanması ile karın ağrısı, meteorizm, bulantı, kusma, ateş, anal bölgede kaşıntı, kanama gibi diğer yakınmaların varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu nedenle yalnızca ishal yakınması olan olgularda *Cryptosporidium* spp.'nin akıldan çıkarılmaması gerektiği düşünülmüştür.

İshal yakınmasının süresi ile ilgili çalışmalar gözden geçirildiğinde 2 haftadan kısa süreli ishalin akut, 2 haftadan uzun süreli ishalin ise kronik ishal olarak değerlendirildiği görülmektedir (141, 143, 156). Enfeksiyonun kronik ishal yakınması ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra, akut ishal yakınması ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalara da rastlanmaktadır (141, 145, 146, 150, 154, 156). Ayrıca Xiao ve ark.'nın Peru'da yaptıkları bir çalışmada *Cryptosporidium*'un türleri ile ishal süresi arasındaki bağlantı araştırılmıştır. *C. hominis* ve *C. parvum* arasında

ishal süresi ve ishal dereceleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (143). Çalışmamızda olguların ishal süreleri değerlendirildiğinde büyük kısmının 1 haftadan kısa süreli, daha az bir kısmının ise 2 haftadan uzun süreli ishal yakınmasının olduğu saptanmış, bunun nedeninin olguların enfeksiyonun erken döneminde saptanmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Çalışmaya katılan olgularda *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması ile ishal süresi karşılaştırıldığında parazit varlığının ishal süresini etkilemediği belirlenmiştir.

Cryptosporidium saptanan hastalarda günlük dışkılama sayısının 10 ve üzeri olabildiği bildirilmektedir (25, 154). Çalışmamızda enfeksiyon saptanan hastaların büyük kısmının günde 1-5 kez dışkılamasının olduğu, daha az bir kısmının ise günlük dışkılama sayısının 10'un üzerinde olduğu saptanmış, *Cryptosporidium* spp.'nin varlığının günlük dışkılama sayısını etkilemediği düşünülmüştür.

Adjei ve ark.'nın Gana'da yaptıkları çalışmada olguların %56'sının ishal yakınmasına yönelik antibiyotik tedavisi aldığı bildirilmiştir (148). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların %16.7'sinin ishal yakınmasına yönelik tedavi aldığı belirlenmiştir. Bu nedenle yakınmaların baskılanmış olabileceği ve parazit yoğunluğunun azalmış olabileceği düşünülmüştür.

İmmun sistemin durumunun *Cryptosporidium* spp.'nin görülmesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde, immün sistemi çeşitli nedenlerle baskılanmış olgularda enfeksiyonun daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (21, 157, 158). Ayrıca immün yetmezliğin enfeksiyona karşı konak duyarlılığını değiştirdiği düşünülmektedir (157). Antiretroviral tedavi alan HIV pozitif hastalarda *Cryptosporidium* spp.'nin görülme sıklığı, antiretroviral tedavi almayanlara göre azalmaktadır (159).

Cryptosporidium spp.'nin görülme sıklığının en fazla olduğu hasta grubu olan HIV pozitif hastalarda yapılan çalışmalarda oranın %3 ile %74.2 arasında değiştiği görülmektedir (157, 160, 161, 162, 163, 164). Enfeksiyon oranının bu kadar farklı olmasının nedeninin ülkeler arasındaki HIV pozitifliğinin farklılığına, su kaynaklarının

kontaminasyon derecesine, sosyoekonomik düzey farklılığına ve tanıda kullanılan yöntemlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

İmmun sistemin baskılandığı bir başka durum olan malign hastalıklarla cryptosporidiosisin ilişkisinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Çeşitli maligniteleri olan olgularda *Cryptosporidium* spp.'nin görülme oranının %1.3 ile %17 arasında değiştiği bildirilmiştir (162, 165, 166).

Enfeksiyon immün sistemi baskılanmış kişilerin yanı sıra immün sistemi sağlam kişilerde de görülmektedir (162, 167).

Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan 2'sinin (%11.1) immün sistemi baskılayan bir hastalığı ve buna yönelik ilaç tedavisi uygulaması olduğu saptanmıştır. Bu olguların tümünün HIV pozitif olduğu, 1'inin (%5.5) ayrıca lenfoma hastası olduğu saptanmıştır. Bu nedenle immün sistemi baskılanmış kişilerde *Cryptosporidium* spp.'nin akıldan çıkarılmaması gerektiği düşünülmüştür. Ancak çalışmaya katılan olgular arasında immün sistemi baskılayan ilaç kullanımı arasında ve immün sistemi baskılayan hastalığı olma durumu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışma grubumuzda immün sistemin durumunun bu parazitin görülmesinde çok etkili olmadığı, buna karşın azalan yaş faktörünün daha etkili olduğu düşünülmüştür.

Enfeksiyon saptanması ile aile bireylerinde benzer yakınmalar görülmesi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar gözden geçirildiğinde bu oranın %0.5 ile %37.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (142, 145, 154). Çalışmamızda *Cryptosporidium* saptanan olguların %44.4'ünün ailesinde benzer yakınmalar olduğu belirlenmiş, *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması ile ailede benzer yakınmalar olması arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Bu nedenle çalışma grubumuzda enfeksiyonun bulaşında aile içi temasın daha fazla etkili olduğu düşünülmüştür. Bu yakınmaların birçok barsak enfeksiyonunda ortak olması nedeniyle sadece yakınmaların değerlendirilmesinin yeterli olmayacağı, bu nedenle aile bireyelerine ait dışkı örneklerinin de değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Enfeksiyonun kırsal alanlarda yaşayanlarda kentsel alanlarda yaşayanlara göre daha fazla görülmesinin, yoksul yaşam alanlarında genel hijyenik kurallara uyumun az olması, cryptosporidiosis prevalansının yüksek olduğu sığır, koyun, domuz gibi çiftlik hayvanları ile direkt temas, ookistlerle kontamine besinler ve su aracılığıyla bulaşıyla açıklanabileceği düşünülmüştür (158, 168). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan %61.1'inin kırsal bölgede, %38.9'unun şehirde yaşadığı saptanmıştır. Kırsal yörede yaşayanların hayvancılıkla uğraşma öykülerinin olduğu belirlenmiştir.

Su kaynaklarının incelenmesi sırasında *Cryptosporidium* saptanması halinde tür ayrımının yapılması önemlidir (169). McLauchlin ve ark.'nın bildirdiğine göre, İngiltere'deki su kaynaklı 8 cryptosporidiosis salgınından 5'inin *C. hominis* ile, 3'ünün *C. parvum* ile olduğu belirlenmiştir. *C. parvum*'un saptandığı 3 salgında su kaynaklarının koyun dışkısı ile kontamine olduğu, salgınların ilkbahar aylarında görüldüğü ve zoonotik bulaş sonucu olduğu düşünülmüştür. Bu durumdan farklı olarak *C. hominis*'in saptandığı 5 salgının, tüm yıl boyunca, kanalizasyon sularıyla kontaminasyon sonucu ortaya çıktığı anlaşılmıştır (135). Çalışmamızda enfeksiyonun bulaş yolunun kırsal alanda yaşayan olgularda aşırı yağış nedeniyle kullanılan artezyen suyuna hayvan dışkılarının karışması sonucu olduğu düşünülmüştür.

Kullanılan içme suyu kaynağı ile enfeksiyon saptanması arasındaki ilişki değerlendirildiğinde olguların kaynatılmamış çeşme suyu tüketimi ile enfeksiyon arasında ilişki saptanan çalışmalar olduğu gibi (170), çeşme suyu kullanımının enfeksiyonun temel bulaş yolu olmadığını bildiren çalışmalara da rastlanmaktadır (143, 145). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulardan büyük kısmının içme suyu olarak artezyen ve kuyu suyu, az sayıdaki olgunun ise şebeke ve damacana suyu kullandığı saptanmıştır. Şebeke ve damacana suyu kullanımına göre artezyen ve kuyu suyu kullanımı olanlarda *Cryptosporidium* spp. saptanma oranlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum parazitin bulaş yolunun özellikle kırsal alanda yaşayan olgularda kontamine su kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. *Cryptosporidium* spp. saptanan şehirde yaşayan olguların

içtikleri suyun analizi yapılamadığı için parazitin bulaş yolu açıklanamamıştır. Bunların kontamine yiyeceklerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Zoonotik türlerin hayvanlarla direkt temasla bulaş gösterdiğinin söylenemeyeceği, enfekte hayvan veya insan dışkıyla kontamine olmuş su ve gıdanın tüketilmesi veya kontamine ellerle direkt bulaşın olabileceği düşünülmektedir. Kırsal alanlarda enfeksiyonun birden fazla yolla bulaş göstermesi nedeniyle çalışmaların bu bölgelerde yoğunlaştırılması gerektiği düşünülmektedir (143). Çalışmamızda saptadığımız her iki türün de zoonotik potansiyeli olan türler olması ve bu olguların büyük kısmının kırsal alanda yaşayan olgular olması nedeniyle çalışma grubumuzda enfeksiyonun zoonotik bulaş gösterdiği düşünülmüş, ancak hayvanlardan örnek alınmadığı için bu konuda kesin karar verilememiştir.

Enfeksiyonun kliniği ile atılan ookist sayısı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ishal yakınması ile atılan ookist miktarı arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra (152), olumsuz görüş bildiren çalışmalara da rastlanmaktadır (171). Çalışmamızda Kinyoun acid fast boya yöntemi ile parazit yoğunlukları değerlendirildiğinde olguların büyük kısmında mikroskopik değerlendirmede “20 alanda birden az parazit” saptanmıştır. Bu durum parazit atılımının az olması nedeniyle olgularımızın yakınmaları ile enfeksiyon varlığı arasında ilişki saptanmaması şeklinde açıklanabilir.

Dışkı örneklerinin *Cryptosporidium* açısından incelenmesinde mikroskopik değerlendirme en sık kullanılan yöntemdir (172). Mikroskopik değerlendirmede en sık kullanılan modifiye Kinyoun acid fast boya yöntemi kolay uygulanması, preparatların değerlendirme öncesi bekletilebilmesi, düşük maliyetli olması, ookistlerin iç yapısını ayrıntılı olarak gösterebilmesi ve kalıcı olması nedeniyle yararlı bulunmuştur. Ancak bu boya yönteminin referans bir yöntem olduğu bildirilmesine karşın, mikroskopik değerlendirmenin zaman alıcı olması ve deneyimli uzman tarafından değerlendirilmesine ihtiyaç duyulması gibi nedenlerle alternatif bir tanı yöntemine gereksinim duyulduğu düşüncesindeyiz.

Cryptosporidium antijenlerine karşı monoklonal antikorlarla hazırlanan IFAT ve ELISA gibi antikor temelli testlerin diğer mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon verebilmesi nedeniyle duyarlılıkları düşüktür (172, 173). Ayrıca klinik örneklerdeki *Cryptosporidium* türlerinin antijenik değişkenlik göstermesi, immunolojik testlerin yorumlanmasında farklılıklara neden olmaktadır (172).

Balatbat ve ark. Amerika'da yaptıkları bir çalışmada *Cryptosporidium* spp.'nin Kinyoun acid fast boya yöntemi ile sulu dışkılarda 10.000 ookist/gr, şekilli dışkılarda ise 50.000 ookist/gr'i saptayabildiğini bildirmiş, asemptomatik veya kronik taşıyıcı olgularda daha duyarlı bir yöntemin kullanılması gerektiğini ileri sürmüştür (58).

Mikroorganizmaların morfolojik özelliklere göre tanımlanması hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. Ancak son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemlerden mikroorganizmaların genomlarını esas alan nükleik asit analizleri sayesinde etkene hızlı ve güvenilir tanı koyulması, uygun sınıflandırmanın yapılması, bulaş yollarının saptanması, gerekli koruyucu önlemlerin anlaşılması ve etkili tedavi verilmesi mümkün olacaktır.

Özellikle salgın durumunda enfeksiyonun kaynağının ve bulaşındaki risk faktörlerinin anlaşılmasında *Cryptosporidium* tür ve alt türlerinin ayrımının yapılması önemlidir (11).

IFAT ve ELISA yöntemlerine alternatif olan PCR, dışkıda *Cryptosporidium*'un saptanmasında duyarlı ve seçici bir yöntem olarak bildirilmektedir (27, 37, 173). Ayrıca tek bir ookisti saptayabilecek kadar güçlü bir tanı aracı olduğu düşünülmektedir (27, 37, 162). Bu yöntemin mikroskopik değerlendirmeden daha avantajlı olduğu kanıtlanmıştır. PCR yönteminin duyarlılığı, hedef gene bağlı olarak 1 ml dışkı örneğinde 20 ookist kadar olabilmektedir. Bu yöntem çok sayıdaki örneğin değerlendirilmesinde daha kolay uygulanabilen, maliyeti göreceli olarak daha düşük olan ve aynı zamanda ookistlerin genotiplendirmesinin yapılabilmesine olanak veren bir yöntemdir (174). Ayrıca RFLP ve sekans analizi gibi yöntemlerle kombine edilerek tür ayrımı yapılmasına olanak vermektedir. Bu şekilde enfeksiyon kaynağının insan

ve hayvan enfeksiyonları için risk faktörlerinin belirlenmesinde yararlı olmaktadır (11). Ancak hızlı, güvenilir ve duyarlı bir yöntem olmasına karşın bazı kısıtlılıkları vardır. Canlı olmayan mikroorganizmaların saptanması ve laboratuvar kontaminasyonu gibi nedenlerle yalancı pozitif sonuçlar verebilmektedir (37). Bu yöntemin rutin tanıda kullanılabilmesi için bu sorunların ortadan kaldırılması ve yöntemin standardize edilmesi gerekmektedir (37, 175). Az sayıdaki örneğin incelenmesinde oldukça pahalı bir yöntemdir (175). Dışkı örneği içerisinde çok az sayıda ookist olması ve ookistlerin dışkının her yerine homojen şekilde dağılmamış olması nedeniyle PCR yönteminin mikroskopik değerlendirmeden daha az sayıda pozitif sonuca neden olabileceği bildirilmektedir (175, 176). Çalışmamızda Kinyoun acid fast boya yöntemi ile 18 olguda (%11.1) *Cryptosporidium* spp. saptanırken, PCR yöntemi ile 21 olguda (%12.9) *Cryptosporidium* spp.'ye özgü bantlar saptanmıştır. *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların büyük kısmının düşük yoğunlukta ookist içerdiği belirlenmiştir. Parazit yoğunluğunun fazla olduğu dışkı örneklerinde PCR yönteminin saptama gücünün daha fazla olduğu görülmüştür. Dışkıda ookistlerin çok az sayıda bulunmasının ve literatürde belirtildiği gibi homojen olarak dağılım göstermemesinin bu sonuca yol açtığı düşünülmüştür. Ancak yine de PCR, boya yönteminden çok daha az sayıda ookisti saptayabilecek güçte bir yöntemdir.

Bazı ookistler DNA ekstraksiyonundan önce hasar görmüş olabileceği için PCR sonucu ile mikroskopik değerlendirme arasında farklılıklar olabilmektedir (175, 176). Ookistler sıcaklık değişikliklerinden hasar görmektedir. Koruyucu olarak potasyum dikromat içerisinde saklanan ookistlerin +4°C'de hasar görmeden korunabildiği, bu şekilde 1 yıldan daha uzun süre saklanan dışkılarda yapılan moleküler çalışmaların olumlu sonuç verebildiği bildirilmektedir. Ancak dışkının uzun süreli saklanmasında kullanılan potasyum dikromat ve formaldehidin çok güçlü PCR inhibitörleri olduğu, DNA ekstraksiyonu öncesinde bu maddelerin uzaklaştırılması gerektiği bildirilmektedir (177). Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların formaldehitte sulandırılarak +4°C'de saklanan dışkı örneklerine de PCR yöntemi uygulanmış, ancak sadece %50'sinde pozitiflik saptanabilmiştir. Bu sonucun formaldehitin PCR üzerine inhibe edici etki göstermesi nedeniyle ortaya çıktığı, bu yöntem için -80°C'de saklanan dışkı örneklerinin daha yararlı olduğu düşünülmüştür.

Amar ve ark.'nın İngiltere'de barsak patojenlerinin saptanmasında konvansiyonel mikroskopik yöntemlerle PCR'in karşılaştırıldığı çalışmada *Cryptosporidium*'un saptanmasında PCR'in 22 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Tanıda rutin olarak kullanılan mikroskopik değerlendirmenin düşük duyarlılığa sahip olduğu, parazitin görülme sıklığının belirlenmesinde yetersiz olduğu, bu yöntemle bazı olguların atlanabildiği düşünülmüştür. Bu nedenle İngiltere'de *Cryptosporidium* ve *Giardia* gibi protozoon parazitlerin düşük risk grubu organizmalar arasında yer aldığı, yüksek duyarlılığa sahip PCR yönteminin enfeksiyonun kaynağı ve bulaş yolunun anlaşılmasında yararlı olacağı bildirilmiştir (178).

Cryptosporidium'un genotiplendirilmesinde sıklıkla COWP ve 18S rRNA genleri kullanılmaktadır (131). COWP geni ile amplifikasyonun oldukça spesifik sonuçlar verdiği bildirilmektedir (176). Bu gen ile yapılan bir çalışmada, 1 ml dışkıda 100 ookist içeren örneklerin tümünün, 1-10 ookist içeren örneklerin ise %75'inin pozitif olarak saptandığı bildirilmiştir (179). Çalışmamızda kullanılan primerler *Cryptosporidium* duvar proteinini kodlayan gene yöneliktir, duyarlılığı ve seçiciliği yüksektir ve bu şekilde istenmeyen amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesi engellenmiştir.

McLauchlin ve ark.'nın İngiltere'de yaptıkları *Cryptosporidium* ookistleri saptanan dışkı örneklerinde mikroskopi ve PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada mikroskopi ile %96.8'inde parazit saptandığı bildirilmiştir. PCR yöntemi ile COWP, TRAP-C1 ve 18S rRNA genlerine yönelik primerlerin karşılaştırılması sonucu duyarlılıklar 18S rRNA için %97, COWP için %91, TRAP-C1 için %66 olarak belirlenmiştir. Her 3 PCR prosedürünün duyarlılığının, mikroskopide gözlenen ookist sayısı artışı ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir. Bu PCR prosedürleri ile negatif sonuç alınma nedeninin DNA'nın uygunsuz saklama koşulları ve PCR inhibitörleri ile hasar görmesi, cryptosporidial DNA'nın olmaması ya da çok az miktarda olması, ookistlere morfolojik olarak benzer yapıdaki diğer organizmaların olması ve bunların monoklonal antikor olarak reaksiyon göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Alternatif olarak yüksek kopya sayısı veya nested PCR prosedürü ile yöntemin duyarlılığının artırılacağı bildirilmiştir (131). Morgan ve ark.'nın Avustralya'da yaptıkları bir çalışmada mikroskopik değerlendirme sonucu Ziehl-Neelsen boya yöntemi ile,

PCR'in saptadığı örneklerden sadece %80.5'inin pozitif olarak saptandığı bildirilmiştir. Klinik ve çevresel örneklerde *Cryptosporidium*'un araştırılmasında PCR'in mikroskopik değerlendirmeye alternatif olacağı düşünülmüştür. PCR'in *Cryptosporidium* ookistlerini sadece saptamakla kalmayıp tür ayrımı yapılmasına da olanak verdiği bildirilmiştir. PCR ile karşılaştırıldığında mikroskopinin duyarlılığı %83.7, seçiciliği %98.9 olarak hesaplanmıştır. PCR'in daha duyarlı ve kolay uygulanabilir olduğu, ancak mikroskopik değerlendirmeden daha fazla zamana gereksinim olduğu ve başlangıçta daha yüksek maliyete sahip olduğu bildirilmiştir. Buna karşın PCR'in çok sayıdaki örneğe aynı anda uygulanabilir olması maliyeti düşürebilmektedir. Acid fast boya yönteminin uygulanması PCR yöntemine göre daha kısa sürmektedir. Ancak boyalı preparatın değerlendirilmesi için deneyimli uzmana gereksinim varken, PCR'in değerlendirilmesi spesifik bandın olup olmamasına bakılarak oldukça kolay şekilde yapılmaktadır. Ayrıca mikroskopik değerlendirme ile 1 gram dışkıda 50.000-500.000 ookistin saptanabildiği bildirilmiştir. PCR'in diğer bir avantajı da yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olması, kolay uygulanabilir olması, çok sayıda örneğin aynı anda işlenebilmesine olanak vermesi ve tür ayrımının yapılabilmesidir. Bu nedenlerle, epidemiyolojik araştırmalarda özellikle salgının etiyolojisinin araştırılmasında gelecek vadeden bir yöntem olma özelliğindedir (172).

Çalışmamızda Kinyoun acid-fast boya yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde PCR yönteminin duyarlılığı %83.3, seçiciliği %95.8 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak *Cryptosporidium* spp.'nin saptanmasında PCR'in güvenle kullanılacak bir yöntem olduğu ve Kinyoun acid fast yöntemine tercih edilebileceği kanısına varılmıştır.

Duyarlılık ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle PCR, dışkıda *Cryptosporidium*'un araştırılmasında uygun bir yöntemdir. Ancak bilirubin, safra tuzları, polisakkarid kompleksleri gibi dışkıda bulunan bazı maddeler, çok küçük miktarlarda bulunmaları halinde bile PCR'ı inhibe edebilmektedir. Bu nedenle basit, hızlı, PCR inhibitörlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan, daha düşük maliyetli ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine gereksinim vardır (172).

Dışkıda *Cryptosporidium* türlerinin saptanmasında yukarıda belirtilen kısıtlılıklar olmasına karşın, DNA izolasyonu sırasında dışkıdaki inhibitörlerin etkisini ortadan kaldıran spesifik izolasyon kitleri geliştirilmiştir. Çalışmamızda bu konuda en iyi sonucu verdiği bilinen Qiagen DNA stool mini kit kullanılmıştır. Bu şekilde kit içeriğinde bulunan ve dışkıdaki birçok inhibitörün ortadan kaldırılmasını sağlayan tablet ile PCR'ı inhibe eden maddelerin uzaklaştırılması sağlanarak maksimum miktarda DNA elde edilmiştir.

Ülkemizde *Cryptosporidium*'un tanısına yönelik çalışmalar gözden geçirildiğinde, bu konuda yapılan çalışmaların büyük kısmının boya yöntemlerine dayandığı, bu nedenle enfeksiyonun bulaş yolları, risk faktörlerine ait bilgilerin kısıtlı olduğu görülmektedir.

İshalli dışkı örneklerinin Kinyoun acid fast boya yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda Fındık ve ark. %1.6, Özçelik ve ark. %11.8, İnceboz ve ark. %0,4, Çeliksöz ve ark. %19.8, Atambay ve ark. %1.6, Doğancı ve ark. %4, Börekçi ve ark. %3,1 oranında *Cryptosporidium* oookistleri saptandığını bildirmiştir (44, 180, 181, 182, 183, 184, 185).

İnsan cryptosporidiosis enfeksiyonunun birçok rezervuarı ve bulaş yolu mevcuttur. Moleküler biyolojik yöntemler en sık görülen insan cryptosporidiosis etkeni olan *C. parvum*'un iki major genotipi ve bunların da 2 farklı bulaş yolu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle genotiplendirme yönteminin cryptosporidiosisin epidemiyolojisini ve bulaş kaynaklarını anlamamızda yararlı olacağı düşünülmektedir (65).

Cryptosporidium türlerinin ülkelere göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Soba ve ark.'nın Slovenya'da yaptıkları bir çalışmada ishalli hastalarda, hayvanlarda görüldüğü bilinen *Cryptosporidium* türlerinin saptandığı bildirilmiştir (26 olguda *C. parvum*, 1 olguda *Cryptosporidium cervine* genotipi, 2 olguda *C. hominis*). Bu nedenle Slovenya'da enfeksiyonun temelde zoonotik orijinli olduğu düşünülmüştür. Ancak genellikle hayvanlarda görülen türlerin insanlarda görülmesinin nedeninin, enfeksiyonun insana adapte olmuş *C. parvum* alt türleri ile olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle *C. parvum* ve genellikle hayvanlarda enfeksiyona neden

olduğu bilinen diğer *Cryptosporidium* türlerinin antroponotik bulaşının da nadir olmadığı düşünölmüştür (186). Wangeci ve ark.'nın Kenya'da yaptıkları bir çalışmada PCR yöntemi ile tür ayrımı sonucu %87'sinin *C. hominis*, %9'unun *C. parvum*, geri kalan %4'ünün de *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* ve *C. muris* türlerine ait olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Kenya'da antroponotik *Cryptosporidium* türlerinin sık görölen türler olduğu ve temel bulaş yolunun da insandan insana bulaş şeklinde olduğunu göstermiştir (141).

Çalışmamızda PCR ile *Cryptosporidium* spp. saptanan olgulara uygulanan RFLP yöntemi sonucu, olguların %12.3'ünün *C. parvum*, %0.6'sının *C. meleagridis* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Her iki türün de zoonotik enfeksiyona neden olan türler olması, olgularımızın büyük kısmının tarım ve hayvancılıkla geçinen kırsal alanlarda yaşıyor olması nedeniyle çalışma grubumuzda enfeksiyonun zoonotik bulaş gösterdiği kanısına varılmıştır. Ancak zoonotik bulaşa neden olan türlerin antroponotik bulaşa da yol açabileceği akıldan çıkarılmamalıdır.

Cryptosporidium, hem immun yetmezlikli, hem de immun sistemi sağlam insanlarda ishelli hastalıkların önemli bir etiyolojik ajanıdır (139, 175, 177, 187).

Araujo ve ark.'nın Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada hem HIV ile enfekte, hem de immun sistemi sağlam çocukların dışkı örneklerine PCR-RFLP yöntemi uygulanmış, olguların %17.3'ünde *C. parvum*, %34.8'inde *C. hominis*, %8.7'sinde *C. meleagridis* saptanmıştır (188).

Glaeser ve ark.'nın İsviçre'de yaptıkları bir çalışmada ishal yakınması olan immun sistemi sağlam çocuklarda %5.5 oranında *Cryptosporidium* spp. saptandığı bildirilmiştir. Olguların %81.8'inin *Cryptosporidium hominis* olması nedeniyle bu nedenle bölgede enfeksiyonun antroponotik bulaş gösterdiği sonucuna varılmıştır (156).

COWP bölgesinin amplifikasyon ürününe Rsa I enzimi kullanılarak yapılan RFLP yöntemi ile *C. hominis*, *C. parvum* ve *C. wrairi* birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (189). PCR sonucu elde edilen ürünler daha sonra RFLP yöntemi ile kesici enzimler

kullanılarak veya sekans analizi yapılarak tür ayırımına olanak vermektedir. Çalışmamızda RFLP yöntemi ile tür ayırımı başarılı bir şekilde yapılmıştır.

Özellikle HIV enfeksiyonunun yaygın olarak görülmeye başlaması ile birlikte, immun sistemi baskılanmış hastalarda görülebilen birçok mikroorganizmaya ilgi artmıştır. Bunlar arasında *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* ve *Microsporidium* spp. en önemlileridir (190). Özellikle immun sistemin baskılandığı durumlarda *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. enfeksiyonlarının birlikteliği görülebilmektedir. Garcia ve ark.'nın çalışmasında immun sistemi baskılanmış hastaların dışkı örneklerinin mikroskopik olarak değerlendirilmesi sonucu %30'unun sadece *C. parvum*, %42'sinin sadece *Microsporidium* ile, %28'inin ise her iki etken ile birden enfekte olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, her iki etkenin de immun sistemi baskılanmış hastalarda önemli ishal etkenleri olduğunu ve cryptosporidiosis olgularının aynı zamanda microsporidiosis enfeksiyonunu da taşıyabileceğini göstermesi açısından önemlidir (191). Benzer şekilde Samie ve ark.'nın bir hastane ve okulda yaptıkları bir çalışmada da olguların %8'inde hem *Cryptosporidium* spp., hem de *Microsporidium* spp. saptandığı bildirilmiştir (82). Çalışmamızda olgulardan ikisinde her iki etken enfeksiyonunun birlikte olduğu saptanmıştır. Bu nedenle özellikle ishal yakınması olan olgularda dışkının protozoonlar açısından değerlendirilmesi yeterli olmadığı gibi, koksidian parazitler açısından değerlendirilmesi de yeterli olmamaktadır. Son yıllarda immun yetmezliklilerde önemi vurgulanan *Microsporidium* spp. enfeksiyonu göz ardı edilmemelidir.

Samie ve ark.'nın Güney Afrika'da yaptıkları bir çalışmada 3-5 yaş arası çocuklarda %25 oranında *Microsporidium* enfeksiyonu saptandığı, 2 yaş altında ise bu enfeksiyonun saptanmadığı bildirilmiştir (82). Çalışmamızda *Microsporidium* spp. saptanan bir olgunun 4 yaşında olduğu, diğer olguların 60 yaş altı erişkinler olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda yaş grupları, nüfus piramidi üzerinde bağımlı nüfusların değerlendirilmesi şeklinde yapılmıştır. Parazit saptanan olguların genç bağımlı ve üretken yaş gruplarında yer aldığı belirlenmiştir. Genç bağımlı grupta hijyenik alışkanlıkların yeterince oluşmaması, üretken grupta ise enfeksiyonun bulaşı

açısından çevresel risk faktörleri ile daha fazla karşılaşmaları nedeniyle bu sonucun elde edildiği düşünülmüştür.

Microsporidium spp. tüm dünyada, hem immun sistemi sağlam, hem de immun sistemi baskılanmış insanları ve tüm hayvanları enfekte edebilen bir etkidir. İnsanları enfekte eden türleri immun sistemi sağlam kişilerde subklinik veya klinik enfeksiyona neden olurken, immun sistemi baskılanmış hastalarda kronik ishal, emilim bozukluğu, şiddetli kilo kaybı ve hatta ölüme neden olabilmektedir (2, 116, 192).

Microsporidiosisin immun sistemi sağlam kişilerdeki gerçek prevalansı ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. İmmun sistemi sağlam kişilerde olduğu kadar farklı etiyolojilere bağlı olarak immun sistemi baskılanmış hastalarda da daha fazla epidemiyolojik çalışmaya gereksinim vardır. Ayrıca dışkı örneklerinin etkene yönelik tanısında güvenilir, standart, invaziv olmayan yöntemlere ve etkili tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (190).

E. bienesi'nin tedavisinde uygun bir antiparazitik ilacın olmaması ve ART'nin gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak uygulanamaması nedeniyle enfeksiyonun önlenmesine dair çalışmalar önemini korumaktadır. Enfeksiyonun önlenmesine yönelik stratejiler ise, enfeksiyonun su kaynaklı, besin kaynaklı, zoonotik ve antropotik bulaşı gibi pek çok farklı bulaş kaynağının olması nedeniyle tam olarak oluşturulamamıştır (193).

Etkenin birçok türü ve alt türü olması nedeniyle bu konudaki epidemiyolojik veriler araştırmacıların ele aldığı çalışma grupları ile ilişkili olarak farklılıklar göstermektedir. Bu konuda sıklıkla barsak enfeksiyonuna yol açan türler olan *E. bienesi* ve *E. intestinalis* ile ilgili çalışmalara daha fazla rastlanmaktadır. *E. bienesi* ve *E. intestinalis* barsak microsporidiosis etkenlerinden en sık görülen iki türdür. *E. bienesi*'nin enfeksiyonların %90'ından sorumlu olduğu, hem HIV pozitif, hem de HIV negatif hastalarda en sık görülen tür olduğu bildirilmiştir.

Microsporidium'un epidemiyolojisi dünyanın farklı bölgelerinde büyük farklılıklar göstermektedir. Enfeksiyonun özellikle HIV pozitif hastalarda saptandığı, Afrika'da

oldukça yüksek oranlarda olduğu bildirilmektedir. Örneğin Uganda'da kronik ishal yakınması olan büyük çoğunluğu HIV pozitif çocuklarda %32.9, Zimbabwe'de %50 oranında *Microsporidium* enfeksiyonu saptanmıştır (82). Ülkemizde Yazar ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada bir AML hastasının bronkoalveoler lavaj (BAL) örneğinin Giemsa ile boyanarak değerlendirilmesinde *Microsporidium* spp. saptandığı bildirilmiştir. Olgunun antineoplastik ve steroid tedavisi ile immun sisteminin baskılanmış olduğu bildirilmiş, bu ilaçların kullanımının *Microsporidium* enfeksiyonunun oluşumunda predispozan faktör olabileceği düşünülmüştür (116). Çalışmamızda *Microsporidium* spp. saptanan olguların %50'sinin HIV enfeksiyonu ve organ transplantasyonu gibi immun sistemi baskılanmış olgular olduğu belirlenmiştir. Enfeksiyonun özellikle immun sistemin baskılandığı durumlarda belirgin kliniğe neden olduğu, bu hastalıkların varlığında önemli bir ishal etkeni olarak akıldan çıkarılmaması gerektiği düşünülmüştür.

HIV ile enfekte kronik ishal yakınması olan olgularda *E. bienensis*'nin %10-40 oranında yüksek prevalansa sahip olduğu bildirilmektedir. Ancak ishal yakınması olmayan HIV pozitif hastalarda bu oranın %3 civarında olduğu bildirilmektedir (190).

Çalışmamızda parazit saptanan olguların tümünün ishal yakınması olduğu, bu durumun olguların büyük kısmının immun sistemi baskılanmış olması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

İnsanları enfekte eden birçok türün hayvanlarda da enfeksiyon etkeni olarak saptanması sonucunda parazitin zoonotik enfeksiyona neden olabildiği bildirilmektedir. İnsanları enfekte eden birçok tür, yüzey suları ve yer altı sularında saptanmıştır. Ayrıca kontamine içme suyu ile meydana gelen salgınlar da bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Temsilciliği'nin "İçme Suyunu Kontamine Eden Ajanlar Listesi"nde [United States Environmental Protection Agency's (USEPA) Drinking Water Contaminate Candidate List (EPA 1998)] yer almaktadır. Hızlı, spesifik ve duyarlı tanı yöntemleri kullanılarak dışkı ve çevresel örneklerde parazitin varlığı daha iyi araştırılabilecek ve insan sağlığını tehdit eden türler daha iyi anlaşılacaktır (2, 192). Çalışmamızda ele aldığımız olgulardan bir

bölümü kontamine su kaynaklı olduğu düşünölen bir salgına ait olgulardır. Ancak bu olgularda *Microsporidium* spp. saptanmamıştır.

Enfeksiyonun tedavisi ve yayılma riskini azaltmak için tür ayrımını sağlayan yeni tanı yöntemlerine gereksinim vardır (1, 2, 190, 194, 195, 196). Tür ayrımı, özellikle vücutta yayılımı ve tedavi protokolü birbirinden farklı olan *E. intestinalis* ve *E. bienewsi* için önemlidir (194, 197).

Albendazol tedavisi *E. intestinalis* enfeksiyonlarına etkili olurken, *E. bienewsi* enfeksiyonlarında çok az yararlı bulunmuştur. Fumagilin *E. bienewsi* enfeksiyonunda etkili olabileceği bildirilmektedir (1, 194, 195, 196, 197).

Barsak microsporidiosis enfeksiyonlarının tanısında kullanılan klasik yöntemler etkenin ışık veya elektron mikroskobu ile direkt olarak saptanmasına dayanmaktadır (2, 194, 196, 197, 198). Bu amaçla barsak biyopsi materyali ışık veya elektron mikroskobisi ile değerlendirilmektedir (199). Ancak bu şekilde değerlendirme oldukça pahalıdır ve invaziv işlemler gerektirmektedir (2, 78, 190, 197, 198). Günümüzde dışkının ışık mikroskobisi ile değerlendirilmesine olanak veren daha basit ve hızlı sonuç veren boya yöntemleri geliştirilmiştir (2, 190, 197, 198, 199). Bunlardan en sık uygulanan Weber'in modifiye trichrome boya yöntemidir (200).

İşık mikroskobisi ile yapılan morfolojik değerlendirme, *Microsporidium* spp.'nin bakteri ve mayalardan ayrımını sağlayabilmekte, ancak klinik yaklaşım ve epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan tür ayrımına olanak vermemektedir (2, 195, 197, 198, 201, 202). Ayrıca mikroskobik değerlendirme için deneyimli uzmana gereksinim duyulmaktadır (195, 197, 202, 203).

Çalışmamız sırasında edindiğimiz deneyime göre barsak florasında bakterilerin artış gösterdiği durumlarda, dışkı örneğinden hazırlanan yayma preparatın *Microsporidium* spp. açısından değerlendirilmesinin oldukça güçleştiğini görmekteyiz. Preparatların çok ince olarak hazırlanması boya kalitesinin artmasını sağlamaktadır. Bu yöntem ile *Microsporidium* spp. parlak pembe renkte boyanmakta ve posterior vakuol veya santral diagonal bant görülebilmektedir. Barsak florasında yer alan bakteriler ve artefaktlar ise açık mavi-mor renkte boyanarak etken ile iyi bir kontrast oluşturmaktadır

ve kolayca ayırt edilebilmesine imkan vermektedir. *Candida albicans* gibi küçük mayalar da parlak pembe renkte boyanmakta, fakat koyu renkte homojen yapı göstermekte ve iç yapıları görülememektedir. Ayrıca bu boya yöntemi, çoklaştırma yöntemi uygulanmadan formolle sulandırılan dışkıdan direkt hazırlanan yaymalara uygulandığı için çoklaştırma sırasında sporların kaybı söz konusu olmamaktadır. Etkenin boyayı güç alması nedeniyle, bu yöntemde yer alan kromotrop bazlı boya basamağının 90 dakika kadar uzun bir süre uygulanmasının yeterli olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak bu boya yönteminin etkenin tanısında önemini koruduğu, deneyimli uzmanlar tarafından, pozitif kontrol preparatlarla karşılaştırılarak değerlendirilmesi durumunda etkenin atlanmayacağı düşüncesindeyiz.

Microsporidium'un tanısında floresan boyaların da kullanıldığını görmekteyiz. Calcofluor white ve Uvitex 2B gibi floresan boyalar endospor tabakasına bağlanmaktadır (2, 78, 195, 199, 200, 202). Ancak bu yöntemlerle tanı için floresan mikroskoba gereksinim duyulmakta, deneyimli uzmanlarca değerlendirme gerekmekte ve etkenin tür ayrımı da yapılamamaktadır (2, 78, 190, 195, 199, 202).

Işık mikroskobu ile değerlendirmede 1 gr dışkıdaki spor konsantrasyonunun 10^4 - 10^6 arasında olması gerektiği, ancak güvenilir bir değerlendirme için 1 gr dışkıda 10^6 spor konsantrasyonunun gerekli olduğu bildirilmektedir (198). Az sayıda spor içeren dışkı örneklerinin değerlendirilmesinde modifiye trichrome ve floresan boya yöntemlerinin birlikte uygulanmasının yararlı olacağı bildirilmektedir (1, 199). Dışkı örneğindeki spor konsantrasyonunun artırılması için uygulanan çöktürme ve yüzdürme gibi konsantrasyon yöntemlerinin modifiye trichrome boya yöntemi ile etkenin saptanmasında başarıyı azalttığı bildirilmiştir (191, 200). Çok az sayıda spor içeren örneklerde birden fazla preparatın değerlendirilmesinin yararlı olacağı, ancak daha fazla zamana gereksinim olacağı bildirilmiştir (191).

Çalışmamızda boya yöntemi ile mikroskobik değerlendirme sonucu pozitif saptanan örneklerin benzer şekilde çok az sayıda spor içerdiği görülmüştür. Bu nedenle birden fazla preparat hazırlanmış, farklı zamanlarda tekrar değerlendirilerek etkenin gözden kaçırılmamasına çalışılmıştır. Ayrıca değerlendirmeler pozitif kontrol preparatları ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Bu olgulara ait çoklaştırma yöntemi ile hazırlanan

preparatlardan başarılı sonuç elde edilememiştir. Çoklaştırma yöntemlerinin literatürlerde belirtildiği gibi spor kaybına neden olduğu düşünülmüştür. Ayrıca preparatların çok ince olarak hazırlanmasının, özellikle dışkı gibi birçok artefakt ve *Microsporidium*'a benzer yapı içeren materyalde etkenin saptanmasını kolaylaştırdığı, aksine kalın olarak hazırlanan preparatların oldukça yoğun boya alması ve içeriğinin karmaşıklığından dolayı kolayca gözden kaçabilecek kadar küçük boyuttaki etkenin atlanmasına neden olabildiği belirlenmiştir.

Etkenin saptanması ve tür ayrımının yapılabilmesini sağlayan floresan işaretli poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanılarak IFAT ile *Microsporidium* spp. araştırılabilmektedir (1, 2, 199, 200). Bu testler, yüksek maliyetleri, düşük duyarlılıkları ve uzun zaman gerektirmeleri nedeniyle tüm laboratuvarlarda etkenin rutin tanısında kullanılamamaktadır (2, 203). Bu nedenle çalışmamızda mikroskopik değerlendirme amacıyla duyarlılığı daha yüksek, maliyeti daha düşük ve uygulanması daha kısa zaman alan bir yöntem olan Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi kullanılmıştır.

İnce barsak biyopsi materyalinin elektron mikroskopi ile değerlendirilmesi tanının doğrulanması ve tür ayrımının yapılabilmesi için halen güvenilir bir tanı yöntemidir (1, 190, 194, 196, 197, 198, 202). Elektron mikroskobunda polar tüp sarmalının yerleşimi ile *E. bienensis*'nin *Encephalitozoon* türlerinden ayrımı yapılabilmektedir (2, 200). Ancak elektron mikroskobisi ile değerlendirmenin bazı kısıtlılıkları vardır. Bu kısıtlılıklardan en önemlisi invaziv bir işlem olan biyopsi alınmasını gerektirmesi, biyopsi kesitlerinin hazırlanma ve değerlendirilmesinin zahmetli olmasıdır (2). Diğer kısıtlılıkları ise pahalı, uzmanlık gerektiren, her laboratuvarında bulunmayan ekipmanlara gereksinim duyulan ve uzun zaman alan bir yöntem olmasıdır (78, 190, 197, 200). Bu kısıtlılıkları nedeniyle etkenin tanısı için daha basit ve kolay uygulanabilir yöntemlere doğru bir eğilim vardır. *E. intestinalis*'e özgü monoklonal antikorlar kullanılarak ELISA, WB gibi serolojik yöntemlerle serumdaki microsporidia antikorları saptanabilmektedir (2, 200). İmmun sistemi baskılanmış hastalarda düşük antijenik yanıtın görülmesi, farklı microsporidia türleriyle çapraz reaksiyon görülmesi ve tüm türlere özgü reagenlerin bulunmaması bu yöntemlerin dezavantajlarıdır (2,

197). Bu nedenle tanı halen etkenin direkt olarak görülmesine dayanmaktadır (200). Çalışmamızda uzun zaman alan, duyarlılıkları düşük ve maliyetleri oldukça yüksek olan bu yöntemler tercih edilmemiştir.

Günümüzde moleküler yöntemlerin, konvansiyonel yöntemlerin kısıtlılıklarını ortadan kaldıracığı düşünülmektedir. Dikkatli primer ve prob seçimi, uygun çalışma koşulları ile klinik örneklerden etkenin saptanması ve tür ayrımlarının yapılması mümkün olmaktadır. PCR yöntemi invazif bir girişim gerektirmemesi nedeniyle oldukça önemli bir tanı aracı olarak kabul edilmektedir. Floresan boyalar ve modifiye trichrome boya yöntemi ile tanıda PCR'ın doğrulama ve tür ayrımı yöntemi olarak kullanılması tavsiye edilmektedir (2).

PCR ile biyopsi materyalleri, safra ve dışkı örnekleri gibi klinik örneklerde ve çevresel örneklerde etkenin saptanabilmesi ve sonrasında tür ayrımları kolaylıkla yapılabilmektedir (1, 2, 78, 82, 198, 201).

PCR için örnekler invaziv olmayan basit yöntemlerle alınabilmekte, birçok uygulama için ortak koşullarda saklanabilmekte ve aynı örneklere rutin parazitolojik inceleme de yapılabilmektedir. Özellikle AIDS hastalarında barsak microsporidiosisinin tanısında PCR'ın oldukça yararlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir (194).

PCR yöntemi ile "panmicrosporidian primerler" (PMP1 ve PMP2) kullanılarak türlerin ayrımı yapılabildiği gibi, araştırılmak istenen türe özgü primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününe uygulanan RFLP yöntemi ile de tür ayrımı yapılabilmektedir (2, 203). PMP1 ve PMP2 primerleri ile amplifikasyon sonucu elde edilen 250 bp bandın *E. bienersi*, 270 bp bandın *E. intestinalis*, 268 bp bandın *E. cuniculi*, 279 bp bandın *E. hellem* ve 240 bp bandın *V. cornea*'ya ait olduğu bildirilmektedir (1, 198, 204). Türe özgü primerler olarak ise sıklıkla small subunit ribosomal RNA'ya (SSU rRNA) dayalı spesifik primerlerin kullanıldığı bildirilmektedir (197).

Çalışmamızda PMP1 ve PMP2 primerleri kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Spor duvarının parçalanmasını sağlayan ticari kitlelerle yapılan DNA

ekstraksiyonu sonrasında panmicrosporidian primerlerle yapılan amplifikasyonun oldukça pratik olduğu ve başarılı sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

Ancak PCR'in dışkıdan DNA ekstraksiyonu yapılırken sporun parçalanmasındaki güçlükler, özellikle dışkıda bulunan bazı inhibitörlerin yeterince uzaklaştırılmaması veya DNA ekstraksiyonun zayıf olması gibi bazı kısıtlılıkları da mevcuttur (1, 202). PCR miksi içerisine kazein ve bovin serumun eklenmesiyle inhibitörlerin etkisinin azaltılabileceği bildirilmiştir (195).

Çalışmamızda -80°C'de dondurularak saklanan dışkı örneğinde PCR ile pozitif sonuç alınan olgunun formalinle saklanan dışkı örneğine uygulanan DNA ekstraksiyonunun başarılı olmadığı belirlenmiştir. Formalinin PCR üzerine güçlü inhibitör etki gösterdiği, ekstraksiyondan önce tamamıyla uzaklaştırılması gerektiği düşünülmüştür. *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması için kullanılan ticari izolasyon kitinin içerisinde bulunan tabletin formalinin inhibitör etkisini ortadan kaldırabildiği belirlenmiştir. Ancak *Microsporidium* spp. araştırılan formalinle saklanan örneklerde izolasyonun, bu kitin sporların duvar yapısını parçalayamadığı için kullanılamaması, onun yerine içerisinde inhibitörlerin uzaklaştırılmasını sağlayan tabletin bulunmadığı dokudan izolasyon kitinin kullanılmasının başarısız sonuca neden olduğu düşünülmüştür.

PCR yönteminin duyarlılığının artırılması için etkili bir DNA ekstraksiyon yöntemine gereksinim vardır (198, 202). Bu konuda yararlı olduğu bildirilen manuel yöntemlerin yanı sıra ticari kitler de önerilmektedir. Bu kitlerden bazıları QIAamp stool mini kit, Instagene Matrix, RapidPrep Micro Genomic DNA isolation kitidir (202). DNA ekstraksiyonu basamağı, sporların oldukça dayanıklı olması ve dışkıda birçok PCR inhibitörü bulunabilmesi nedeniyle önemlidir (198). Bakterilere yönelik çalışmalarda DNA'nın açığa çıkarılması için örneklerin kaynatılması şeklindeki DNA ekstraksiyonunun basit ve ekonomik bir yöntem olduğu rapor edilmektedir. Ombrouck ve ark. *Microsporidium* spp.'nin bu yöntemle başarı ile saptandığını bildirmiştir (1). Dışkı örneğinin dilüe edilmesinin (1) veya kaynatılmasının ardından dilüe edilmesinin de PCR inhibitörlerini uzaklaştırarak duyarlılığın artırıldığı ileri sürülmektedir (198).

Çalışmamızda kaynatma işleminin spor duvarının parçalanmasını sağlamadığı görülmüş, ancak dışkı örneğinin dilüe edilmesinin sonucu olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

DNA ekstraksiyonunun başarısını artırmak için önerilen bir diğer yöntem, lizis buffer içerisinde, 80°C'de 10 dakika ısıtılmasıdır (195). Alkalın veya guanidyum tiosiyanat ile hücre lizisinin sağlandığı da bildirilmektedir. Modifiye su-eter sedimentasyon prosedürü ile duyarlılığın artırıldığı, DNA ekstraksiyonu için spor konsantrasyonunun artırıldığı bildirilmektedir. Spor duvarındaki kitin yapısının parçalanabilmesi için kitinaz enzimi de kullanılabilenekte, ayrıca cam boncuklarla mekanik parçalanma da sağlanabilmektedir. Elde edilen DNA ekstraktı, QIAamp spin kolonların silika membranıyla pürifiye edilmekte, dışkıda bulunan PCR inhibitörleri uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca hipoklorit veya formalinle işlemlenmesine gerek kalmamaktadır. Bu işlemler 3 saatten daha kısa sürmektedir. Bu prosedür ile mükemmel sonuçlar alındığı bildirilmiştir (198).

Pozitif kontrol örnekleri ile yaptığımız çalışmalar ile dışkıdan DNA izolasyon kitinin spor duvarını parçalamakta yeterli olmadığı görülmüş, bu nedenle farklı ekstraksiyon prosedürleri denenmiştir. Bu prosedürlerden biri, dışkı örneklerinin DNA izolasyon kiti ile ekstraksiyon prosedürü uygulanmadan önce 10 dakika kadar kaynatılmasıdır. Ancak bu işlem ile sonuç elde edilememiştir. Ayrıca kitin lizis bufferına ek olarak farklı bir lizis buffer ile işlem yapılmıştır. Bu işlem ile de istenilen düzeyde başarı elde edilemediği için dokudan DNA izolasyonu amacıyla kullanılan bir ticari kit kullanılmış ve bu uygulamadan başarılı sonuç elde edilebilmiştir. Daha sonra tüm dışkı örneklerine bu prosedür uygulanmış, PCR sonucunda, mikroskopi ile pozitif olarak değerlendirilen örneklerden sadece birinde etkene özgü bantlar elde edilmiştir. Bu sonucun özellikle dışkı örneklerinin partikül içermesi ve spor konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüştür. Örneklerin farklı oranlarda dilüe edilerek DNA ekstraksiyonunun tekrarlanması sonucunda, 1/2 oranında dilüe edilen örnekler dışındaki dilüsyonlarda sporların, izolasyon kitinin spin kolonundan geçerken kolonda tutunduğu, buna bağlı olarak PCR'da başarılı sonuç alınamadığı düşünülmüştür.

DNA ekstraksiyonunun duyarlılığının artırılması için spor konsantrasyonunun artırılması veya daha sonra DNA'nın pürifiye edilmesi gerekmektedir (202). Işık mikroskopisinin 1 gr dışkıda 10^4 - 10^6 spor gibi yüksek spor konsantrasyonuna sahip örneklerde daha duyarlı bir yöntem olduğu bildirilirken (205), PCR yöntemi ile dışkı örneklerindeki spor konsantrasyonunun 1 gr dışkıda en az 10^2 spor olması gerektiği bildirilmektedir (198, 205). Bu yöntem ile güvenilir sonuçlar için ise 1 gr dışkıda 10^3 spor veya yüksek miktarlar olması gerektiği bildirilmektedir (192). Günümüzde kullanılan yöntemlerin en önemli kısıtlılıklarından biri, çok küçük miktardaki dışkı örneklerinin incelenmesidir. Genellikle 1 gr'dan daha az, hatta 0.1 gr kadar az miktarlarda dışkı kullanılmaktadır. Küçük miktardaki dışkı örnekleri daha kolay işlenebilmesi ve daha az PCR inhibitörü içermesine karşın, tüm örneği yansıtmayabilmektedir. Ayrıca örnekteki etken konsantrasyonu düşük olduğunda yöntem etkenin saptanmasında yeterince duyarlı olmamaktadır (192).

Mikroskobik değerlendirme ve PCR'ın karşılaştırıldığı çalışmalar gözden geçirildiğinde çalışmaların büyük bir kısmında barsak microsporidiosis tanısı ve epidemiyolojisinin belirlenmesinde PCR'ın duyarlı, hızlı ve tür ayrımı yapılmasını da sağlayan değerli bir tanı yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır (1, 197).

Müller ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada mikroskobide pozitif saptanan tüm örneklerin PCR ile de pozitif saptandığı, mikroskobinin saptayamadığı 2 örnekte PCR ile etkenin saptandığı bildirilmiştir (198). Katzwinkel- Wladarsch ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada mikroskobik değerlendirme ile %47, PCR ile %82 oranında pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir. Mikroskopi ile negatif olarak değerlendirilen örneklerden 4'ünün PCR ile pozitif olarak saptandığı, mikroskobide pozitif olarak değerlendirilen 2 örneğin ise PCR ile negatif olarak saptandığı bildirilmiştir (203). Kock ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ise her iki yöntemin de %82 oranında pozitif sonuç verdiği, PCR ile pozitif olarak saptanan 4 örneğin mikroskopi ile negatif olarak değerlendirildiği, mikroskopi ile pozitif olarak değerlendirilen 2 örneğin ise PCR ile negatif olarak değerlendirildiği bildirilmiştir (80).

Çalışmamızda mikroskopi ile etken saptanan dışkı örneklerinin çok az sayıda spor içerdiği belirlenmiştir. PCR ile elde edilen pozitiflik oranının mikroskobiden daha düşük olma nedenlerinin ise, çalışma için çok az miktarda dışkı örneği kullanılması ve

zaten az sayıda olan spor içeriğinin bu şekilde daha da azaltılmış olabileceği, ayrıca sporların dışkı içerisine homojen olarak dağılmaması nedeniyle dışkının spor içermeyen kısmından alınan örneğin PCR ile değerlendirilmiş olabileceği düşünülmüştür.

Dışkı örneklerinde *Microsporidium* spp.'nin saptanması özellikle az sayıda spor atılım olduğunda güç olmaktadır. Spor atılımının az olduğu dışkı örneklerinde hem boya, hem de PCR çalışmasının dışkının spor içermeyen kısmından alınarak yapılması durumunda etken atlanabileceği gibi, özellikle PCR'da ekstraksiyon sırasında sporların spin kolona tutunup işlemin bir sonraki aşamasına geçememesi nedeniyle de tanı atlanabilmektedir.

Müller ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ışık mikroskopi ile %3.3, PCR ile %6 oranında *Microsporidium* spp. saptanmıştır. Ancak ishallerde tanının genellikle spor atılımının azaldığı, enfeksiyonun geç dönemlerinde koyulduğu bildirilmektedir (206).

Çalışmamızda Weber'in modifiye trichrome boya yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde PCR yönteminin duyarlılığı %25, seçiciliği %100 olarak hesaplanmıştır. Olgu sayımız oldukça sınırlı olmasına karşın *Microsporidium* spp.'nin saptanmasında PCR yönteminin Weber'in modifiye trichrome boya yöntemine alternatif bir tanı yöntemi olarak kullanılamayacağı kanısına varılmıştır.

Çalışmamız ülkemizde PCR yöntemi ile *Microsporidium* spp.'nin saptandığı ilk çalışma olması açısından önemlidir. Ancak bu konuda daha fazla sayıda örnekle yapılacak çalışmalar ile etkenin ülkemizde görülme sıklığı, enfeksiyon için risk faktörleri, bulaş yolları ve kliniğine yönelik detaylı verilerin elde edilmesi mümkün olacaktır. Çalışmamızın bu konuda planlanacak çalışmalara yol gösterici nitelikte olacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak *Cryptosporidium* spp.'nin saptanmasında PCR'in güvenle kullanılacak bir yöntem olduğu ve Kinyoun acid fast yöntemine tercih edilebileceği, ancak *Microsporidium* spp.'nin saptanmasında Weber'in trichrome boya yönteminin PCR'dan daha güvenilir bir tanı aracı olduğu kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Her yaş grubundan ishalleri ile immun sistemi baskılanmış hastalara ait dışkı örneklerinin, rutin parazitolojik incelemelere ek olarak *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. açısından da değerlendirilmeleri gerektiğini düşünmekteyiz. *Cryptosporidium* spp.'nin saptanmasında Kinyoun acid fast boya yöntemi referans bir tanı yöntemi olarak kabul edilmesine karşın bazı kısıtlılıklarının olduğu, PCR'ın ise hem daha duyarlı bir yöntem olduğu, hem de etkenin tür ayrımının yapılmasına da olanak verdiği ve bu nedenlerle daha kullanışlı bir tanı yöntemi olduğu düşünülmüştür. Günümüzde bu parazitin sadece saptanmasının yeterli olmadığı, özellikle bulaş yolları ve kaynaklarının anlaşılması, korunma yollarının belirlenmesi, farklı türlere ait kliniğinin ortaya koyulması ve son olarak uygun tedavi protokollerinin oluşturulması için tür ayrımının da gerekli olduğu bilinmektedir. Çalışmamız ülkemizde *C. meleagridis*'in bildirildiği ilk çalışma olması açısından özgündür. Ülkemizde bu konuda kısıtlı sayıda çalışma olması nedeniyle bundan sonraki çalışmaların parazitin moleküler yöntemler kullanılarak türlerinin saptanmasına yönelik olması gerektiğini düşünmekteyiz.

Aynı çalışma grubunda araştırılan bir diğer etken olan *Microsporidium* spp.'nin tanısında Weber'in modifiye trichrome boya yönteminin güvenle başvurulacak bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu yöntemin rutin tanıda kullanılması gereklidir. Ancak *Cryptosporidium* spp. gibi bu parazitin de epidemiyolojisinin ortaya konulması, uygun tedavi protokolünün oluşturulması ve tür ayrımı için PCR protokolünün oluşturulması gerekmektedir. Etkenini DNA'sının elde edilmesindeki zorluklar nedeniyle uygun DNA ekstraksiyon prosedürünün, spor konsantrasyonunun artırılması için uygun konsantrasyon yönteminin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. *Microsporidium* spp. ile ilgili ülkemizde oldukça az sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda etkenin rutin tanısında kullanılabilecek bir yöntem olan Weber'in modifiye trichrome boyasına ait uygun bir prosedür oluşturulmuştur. Çalışmamız ülkemizde insan microsporidiosis

olgularında PCR yöntemiyle *E. intestinalis* türünün ilk kez saptandığı çalışma olması açısından özgündür. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda etkenin tür ayırımına yönelik olarak moleküler yöntemlere ağırlık verilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

İnsan *Microsporidium* olgularının PCR ile tespitine yönelik ülkemizde yapılmış az sayıda çalışma olması bu konuda halen oluşturulması gereken tanı prosedürüne yönelik eksiklikleri de beraberinde getirmektedir. Edindiğimiz deneyimler doğrultusunda spor duvarının parçalanması aşamasında karşılaşılan güçlüklerin, yöntemin DNA ekstraksiyonu basamağındaki en önemli kısıtlılık olduğunu belirledik. Pozitif olgu sayımızın az olması tür ayırımına yönelik verilerin de sınırlı olmasına yol açmıştır. PCR ile ilgili net prosedür bilgilerinin verilebilmesi ve ülkemizdeki türlerin ortaya konabilmesi için daha fazla sayıda olgu ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- ¹ **Ombrouck C, Ciceron L, Biligui S, Brown S, Marechal P, van Gool T, et al.** Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35 (3): 652–655.
- ² **Fedorko DP, Hijazi YM.** Application of Molecular Techniques to the Diagnosis of Microsporidial Infection. *Emerging Infectious Diseases.* 1996; 2 (3): 183-191.
- ³ **Egyed Z, Sreter T, Szell Z, Varga L.** Characterization of *Cryptosporidium* spp.- recent developments and future needs. *Vet. Parasitol.* 2003; 111:103-114.
- ⁴ **Riggs MW.** Recent advances in cryptosporidiosis: the immun response. *Microbes Infect.* 2002; 4: 1067-1080.
- ⁵ **Miller DL, Ligett A, Radi ZA, Branch LO.** Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Vet. Parasitol.* 2003; 115: 199-204.
- ⁶ **Dirim D, Turgay N, Alkan MZ.** Bir Cryptosporidiosis olgusunun Kinyoun Asit-Fast boyası ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile takibi. *Türkiye Parazitol. Derg.* 2003; 27 (4): 237-239.
- ⁷ **Current WL, Garcia LS.** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 1991; p. 325-358.
- ⁸ **Fayer R.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology.* 2004; 126: 37–56.
- ⁹ **Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ.** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews.* 2004; 17: 172–197.
- ¹⁰ **Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR.** Waterborne Protozoan Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews.* 1997; 10 (1): 67–85.
- ¹¹ **Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection.* 2004; 6: 773–785.
- ¹² **Leav BA, Mackay M, Ward HD.** *Cryptosporidium* Species: New Insights and Old Challenges. *Clinical Infectious Diseases.* 2003; 36: 903–908.

- ¹³ **Waterloo Centre for Groundwater Research.** In: Butler BJ, Mayfield CI. editors. *Cryptosporidium* spp. - A Review of the Organism, the Disease, and Implications for Managing Water Resources. Ontario, Canada. 1996; 1-70.
- ¹⁴ **Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, et al.** Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology.* 2002; 32: 1773–1785.
- ¹⁵ **Tzipori S, Ward H.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection.* 2002; 4: 1047–1058.
- ¹⁶ **Joachim A.** Human Cryptosporidiosis: An Update With Special Emphasis on the Situation in Europe. *J. Vet. Med.* 2004; 51: 251–259.
- ¹⁷ **Fayer R.** Waterborne Zoonoses. Waterborne zoonotic protozoa. In: Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver D, Craun GF, Fayer R, Gannon VPJ. Editors. World Health Organization (WHO), Cornwall, UK, 2004; 255-282.
- ¹⁸ **Sears CL, Kirckpatrick BD.** Cryptosporidiosis and isosporidiosis. Principles and Practice of Clinical Parasitology. John Wiley & Sons Ltd. Pres. 2001; p. 139-164.
- ¹⁹ **Dubey JP, Speer CA, Fayer R.** Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Raton, CRC Pres. 1990; 199.
- ²⁰ **Mandel GL, Bennett JE, Dolin R.** Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, and other species). In: White AC, editor. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, Churchill Livingstone Inc. 2005; p. 3215-3228.
- ²¹ **Starling CR, Arrowood MJ.** Cryptosporidia. Parasitic Protozoa. Academic Pres. 1993; 6 (65): 159-224.
- ²² **Ungar BLP.** Infectious Diseases and Their Etiologic Agents. in Principle and Practise of Infectious Diseases in: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Editors. New York, Churchill Livingstone. 1995; p. 2500-2510.
- ²³ **Fayer R, Ungar BLP.** *Cryptosporidium* sp and Cryptosporidiosis. *Microbiol Rev.* 1986; 50: 458-483.
- ²⁴ **Goodgame RW.** Understanding intestinal spore-forming protozoa: cryptosporidia, microsporidia, isospora, and cyclospora. *Ann Intern Med.* 1996; 124 (4): 429-41.

- ²⁵ **Xian-Ming C, LaRusso NF.** Human intestinal and biliary cryptosporidiosis. *World Journal of Gastroenterology*. 1999; 5 (5): 424-429.
- ²⁶ **Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF.** Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* Infection. *Microbes and Infection*. 1999; 2: 141–148.
- ²⁷ **Clark DP.** New Insights into Human Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12 (4): 554–563.
- ²⁸ **Sasahara T, Maruyama H, Aoki M, Kikuno R, Sekiguchi T, Takahashi A, et al.** Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. *J Infect Chemother*. 2003; 9: 278–281.
- ²⁹ **Laberge I, Griffiths MW.** Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *Int. J. Food Microbiol*. 1996; 32: 1–26.
- ³⁰ **Markell EK, Voge M, John DT.** Medical Parasitology. In: Ozmat S. editor. Philadelphia, WB Saunders Company. 1992; p. 85-88.
- ³¹ **Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M.** Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İstanbul, İstanbul Üniv. Cerrahpasa Tıp Fak. Vakfı Yay. 1995; 15.
- ³² **Cox FEG.** History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (4): 595–612.
- ³³ **Hashmey R, Smith NH, Cron S, Graviss EA, Chapell CL, White AC.** Cryptosporidiosis in Houston, Texas a report of 95 cases. *Medicine*. 1997; 76 (2): 118-139.
- ³⁴ **Garcia LA, Bruckner DA.** Parasitic infections in the compromised host. Diagnostic Medical Parasitology. Washington DC, ASM Press. 1997; p. 355-374.
- ³⁵ **McDonald V.** Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol*. 2000; 22: 597-604.
- ³⁶ **Chai JY, Guk SM, Han HK, Yun CK.** Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune response of mice experimentally infected with *C. parvum*. *J. Parasitol*. 1999; 85 (2): 234-239.
- ³⁷ **Fayer R, Morgan U, Upton SJ.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 1305-1322.
- ³⁸ **Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*. 2002; 4: 1059–1066.

- ³⁹ **Inungu JN, Morse AA, Gordon C.** Risk Factors, Seasonality, and Trends of Cryptosporidiosis Among Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 62 (3): 384–387.
- ⁴⁰ **Gilles H.** Cryptosporidiosis. In: Hart CA, editor. Protozoal Diseases. New York, Oxford University Press. 1999; p. 592-606.
- ⁴¹ **Çeber K, Aslan G, Otağ F, Delialioğlu N, Öztürk C, Babür C, et al.** Mersin İlinde İçme Suyu, Kullanma Suyu, Atık Su ve Deniz Sularında *Cryptosporidium* spp. Ookistlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 2005; 29 (4): 224-228.
- ⁴² **Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR.** Effects of Ozone, Chlorine Dioxide, Chlorine and Monochloramine on *Cryptosporidium parvum* Oocyst Viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56: 1423- 1428.
- ⁴³ **Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ.** Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 579-584.
- ⁴⁴ **Çeliksöz A, Çelik S.** Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde gastroenteritli ve malnütrisyonlu hastalarda *Cryptosporidium* spp. Araştırması. *Türkiye. Parazitol. Derg.* 2003; 27 (2): 85-88.
- ⁴⁵ **Hojlyng N, Holten-Andersen W, Jepsen S.** Cryptosporidiosis: A case of airborne transmission. *Lancet.* 1987; 2: 271-272.
- ⁴⁶ **Janoff NE, Reler BL.** *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25 (6): 967- 975.
- ⁴⁷ **Doğan N, Akgün Y.** İshalli olgularda *Cryptosporidium* oksitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 1998; 22 (3): 243-246.
- ⁴⁸ **Xiao L, Ryan UM.** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 2004; 17: 483–490.
- ⁴⁹ **Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H.** Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* spp. Araştırılması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 1995; 19 (1): 56-63.
- ⁵⁰ **Casemore DP.** Laboratory methods for diagnosing Cryptosporidiosis. *J.Clin. Pathol.* 1991; 44: 445-451.
- ⁵¹ **Garcia LA, Bruckner DA.** Intestinal protozoa: Coccidia and Microsporidia. Diagnostic Medical Parasitology. Washington DC, ASM Press. 1997; p. 59-63.
- ⁵² **MacPherson DW, McQueen R.** Cryptosporidiosis: Multiattribute Evaluation of Six Diagnostic Methods. *Journal of Clinical Microbiology.* 1993; 31 (2): 198-202.

- ⁵³ **Weber R, Bryan RT, Juranek DD.** Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30 (11): 2869-2873.
- ⁵⁴ **Fahey TMD.** Cryptosporidiosis. *Infectious Disease Update.* 2003; 10 (2): 75-80.
- ⁵⁵ **Gasser RB, O'Donoghue P.** Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 1379-1413.
- ⁵⁶ **Carey CM, Lee H, Trevors JT.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 2004; 38: 818-862.
- ⁵⁷ **Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y.** Further Evidence That Genotype I and Genotype II of *Cryptosporidium parvum* Are Distinct. *Tropical Medicine and Health.* 2004; 32 (1): 5-14.
- ⁵⁸ **Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva J.** Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in Human Feces by Nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1996; 34 (7): 1769–1772.
- ⁵⁹ **Limor JR, Lal AA, Xiao L.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (7): 2335-2338.
- ⁶⁰ **Awad-EI-Kar EM, Robinson HA, Petry F, McDonald V, Evans D, Casemore D.** Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitol. Res.* 1998; 84: 297-301.
- ⁶¹ **Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, Le Chevallier MW, Abbaszadegan M.** Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65 (8): 3427-3432.
- ⁶² **Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al.** Polygenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the Small-Subunit rRNA gene locus. *App. Env. Microbiol.* 1999; 64 (4): 1578-1583.
- ⁶³ **Widmer G, Orbach EA, Tzipori S.** β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *App. and Env. Microbiol.* 1999; 65 (4): 1584-1588.

- ⁶⁴ **Jenkins MC, Trout J, Abrahamsen MS, Lancto CA, Higgins J, Fayer R.** Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *J. Microbiol. Methods.* 2000; 43: 97-106.
- ⁶⁵ **Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J.** Nested Polymerase Chain Reaction for Amplification of the *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein Gene. *Emerging Infectious Diseases.* 2001; 7 (1): 49-56.
- ⁶⁶ **Fichtenbaum CJ, Ritchie DJ, Powderly WG.** Use of Paromomycin for Treatment of Cryptosporidiosis in Patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 298 - 300.
- ⁶⁷ **Garcia LS, Shimizu RY.** 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.
- ⁶⁸ **McDonald V, Stables R, Warhurst DC.** In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium parvum* and Screening for Anticryptosporidial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34 (8): 1498- 500.
- ⁶⁹ **Campbell PN, Current WL.** Demonstration of Serum Antibodies to *Cryptosporidium* sp. in Normal and Immunodeficient Humans with Confirmed Infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 1983; 18 (1): 165-169.
- ⁷⁰ **Mead JR, Arwood MJ, Sterling CR.** Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *Journal of Infection.* 1998; 74 (1): 135-143.
- ⁷¹ **White AC, Flanigan TP.** Cryptosporidiosis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases.* 2003; 5: 301-306.
- ⁷² **Tzipori S.** Cryptosporidiosis in Animals and Humans. *Microbiological Reviews.* 1983; p. 84-96.
- ⁷³ **Didier ES.** Microsporidiosis. *Clinical Infectious Diseases.* 1998; 27: 1–8.
- ⁷⁴ **Didier ES, Weiss LM.** Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 2006; 19: 485–492.
- ⁷⁵ **Weber R., Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL.** Human Microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7 (4): 426-461.

- ⁷⁶ **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** Microsporidia In: Weiss LM editor. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, Churchill Livingstone Inc. 2005; p. 3237-3257.
- ⁷⁷ **Sobottka I, Albrecht H, Schafer H.** Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS: Novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following treatment with albendazole. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (11): 2948.
- ⁷⁸ **Carville A, Mansfield K, Widmer G, Lackner A, Kotler D, Wiest P, et al.** Development and Application of Genetic Probes for Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in Formalin- Fixed Stools and in Intestinal Biopsy Specimens from Infected Patients, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunolog.* 1997; 4 (4): 405–408.
- ⁷⁹ **Field AS, Marriott DJ, Milliken ST, Brew BJ, Canning EU, Kench JG, et al.** Myositis Associated with a Newly Described Microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a Patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology.* 1996; 34 (11): 2803–2811.
- ⁸⁰ **Kock NR, Petersen H, Fener T, Sobottka I, Schmetz C, Deplazes R, et al.** Species-Specific Identification of Microsporidia in Stool and Intestinal Biopsy Specimens by the Polymerase Chain Reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997; 16 (5): 369-376.
- ⁸¹ **Costa SF, Weiss LM.** Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resistance Updates.* 2000; 3: 384–399.
- ⁸² **Samie A, Obic CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL.** Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2007; 101: 547—554.
- ⁸³ **Franzen C, Müller A.** Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 243-85.
- ⁸⁴ **Visvesvara GS.** In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15 (3): 401-413.
- ⁸⁵ **Didier ES.** Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 2005; 94: 61-76.
- ⁸⁶ Microsporidiosis. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Microsporidiosis.htm> 2005.

- ⁸⁷ **Joseph J, Vemuganti GK, Sharma S.** Microsporidia: Emerging Ocular Pathogens. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2005; 23 (2): 80-91.
- ⁸⁸ **Cavalier-Smith T.** A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 1998; 73: 203–266.
- ⁸⁹ **Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, Mc Laughlin GL, Katiyar SK.** Phylogenetic analysis of betatubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996; 5: 359–367.
- ⁹⁰ **Conteas CN, Berlin OGW, Ash LR, Pruthi JS.** Therapy for Human Gastrointestinal Microsporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63 (3, 4): 121–127.
- ⁹¹ **Shadduck JA, Greeley E.** Microsporidia and Human Infections. *Clinical Microbiology Reviews.* 1989; 2 (2): 158-165.
- ⁹² **Gilles H.** Microsporidiosis. In: Schwartz DA, Weber R, Bryan RT. Protozoal Diseases. New York, Oxford University Pres. 1999; p. 625-643.
- ⁹³ **Bigliardi E, Sacchi L.** Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection.* 2001; 3: 373–379.
- ⁹⁴ **Garcia LS.** Laboratory identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1892-1901.
- ⁹⁵ **Franzen C.** Microsporidia: how can they invade other cells?. *Trends in Parasitology.* 2004; 20 (6): 275-279.
- ⁹⁶ **Farthing MJG, Cevallos AM, Kelly P.** Intestinal Protozoa. Ed: Manson-Bahr: Manson's Tropical Diseases. 20 th ed, 1996; 1290-1292.
- ⁹⁷ **Farthing MJG.** Immune response-mediated pathology in human intestinal parasitic infection. *Parasite Immunology.* 2003; 25: 247–257.
- ⁹⁸ **Wasson K, Peper RL.** Mammalian Microsporidiosis. *Vet Pathol.* 2000; 37: 113–128.
- ⁹⁹ **Didier ES, Stovall ME, Green L, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ.** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology.* 2004; 126: 145–166.
- ¹⁰⁰ **Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA.** Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection.* 2000; 2: 709–720.
- ¹⁰¹ **Yachnis AT, Berg J, Martinez-Salazar A, Bender BS, Diaz L, Rojiani AM, et al.** Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys:

report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *Am J Clin Pathol*. 1996; 106: 535–543.

¹⁰² **Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, et al.** Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J Infect Dis*. 1991; 163: 617-621.

¹⁰³ **Lowder C Y.** Ocular microsporidiosis. *Int Ophthalmol Clin*. 1993; 33: 145–151.

¹⁰⁴ **Sakova K, Sak B, Ditrich O, Kvac M.** Humoral response of chicken infected with the *Microsporidium Encephalitozoon hellem*. *Parasitol Res*. 2006; 98: 88–92.

¹⁰⁵ **Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M.** CD8+ CTLs Are Essential for Protective Immunity Against *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *The Journal of Immunology*. 1999; 162: 6086–6091.

¹⁰⁶ **Curry A, Smith HV.** Emerging pathogens: *Isospora*, *Cyclospora* and microsporidia, *Parasitology*. 1998; 117: 143-159.

¹⁰⁷ **Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, et al.** Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1999; 180 (6): 2003-2008.

¹⁰⁸ **Mathis A, Weber R, Deplazes P.** Zoonotic Potential of the Microsporidia, *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18 (3): 423–445.

¹⁰⁹ **Silifko TR, Smith HV, Rose JB.** Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal of Parasitology*. 2000; 30: 1379-1393.

¹¹⁰ **Calvo M, Carazo M, Arias ML.** Prevalence of *Cyclospora* sp, *Cryptosporidium* sp, microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr*. 2004; 54: 428–432.

¹¹¹ **Avery SW, Undeen AH.** The isolation of microsporidia and other pathogens from concentrated ditch water. *J Am Mosq Control Assoc*. 1987; 3 (1): 54-8.

¹¹² **Deplazes P, Mathis A, Weber R.** Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol*. 2000; 6: 236-260.

¹¹³ **Schwartz DA, Visvesvara GS, Diesenhouse MC.** Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol*. 1993; 115 (3): 285-292.

- ¹¹⁴ **Schwartz DA, Visvesvara GS, Leitch GJ, Tashjian L, Pollack M, Holden J, et al.** Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired immunodeficiency syndrome: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. *Hum Pathol.* 1993; 24 (9): 937-943.
- ¹¹⁵ **Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S.** *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Med Hyg.* 2002; 67(3): 299-303.
- ¹¹⁶ **Yazar S, Eser B, Yalcin S, Sahin I, Koc AN.** A case of pulmonary Microsporidiasis in an acute myeloblastic leukemia (AML) - M3 patient. *Yonsei Med J.* 2003; 44 (1): 146-149.
- 117 Büget E, Büyükbaba-Boral Ö, Kırkoyun-Uysal H, Nazlıcan Ö, Öğüt T, Şengür G.** Türkiye'de bir AIDS hastasında ilk mikrosporidiyaz ve solunum sistemini tutan ilk kriptosporidiyaz olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2000; 30 (3-4):166-170.
- ¹¹⁸ **Ozkirim A, Keskin N.** A survey of *Nosema apis* of honey bees (*Apis mellifera* L.) producing the famous Anzer honey in Turkey. *Z Naturforsch.* 2001; 56 (9-10): 918-919.
- ¹¹⁹ **Eröksüz H, Eröksüz Y, Metin N, Özer H.** Bir tavşan kolonisindeki doğal encephalitozoonosis olguları üzerine morfolojik incelemeler. *Tr J Veterinary Animal Sciences.* 1999; 23: 191-95.
- ¹²⁰ **Yaman M, Radek R.** *Nosema chaetocnema* sp. (Microspora:Nosematidae), a microsporidian parasite of *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera:Chrysomelidae). *Acta Protozool.* 2003; 42: 231-237.
- ¹²¹ **Karaman Ü, Atambay M, Daldal N, Çolak C.** Kanser Tanısı Almış Hastalarda *Microsporidium* Görülme Sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2008; 32 (2): 109 -112.
- ¹²² **Gilles HM.** Section 15: Microsporidiosis. In: Schwartz DA, Weber R, Bryan RT. Protozoal Diseases. 1th ed. London. 1999; p. 637.
- ¹²³ **Franzen C, Müller A.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection.* 2001; 3: 389-400.
- ¹²⁴ **Dowd SE, Thurston-Enriquez JA.** Evaluation and guidelines for use of polymerase chain reaction-computer database homology comparison (PCR-CDHC)

for detection and species determination of human pathogenic microsporidia. *African Journal of Microbiology Research*. 2008; 2: 001-007.

¹²⁵ **Green LC, LeBlanc PJ, Didier ES.** Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidian) spores by dual staining with sytox green and calcofluor white M2R. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (10): 3811-3814.

¹²⁶ **Jordan CN, Zajac AM, Snowden KS, Lindsay DS.** Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology*. 2006; 135: 235–240.

¹²⁷ **Mo L, Drancourt M.** Monoclonal Antibodies for Specific Detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2004; 11 (6): 1060–1063.

¹²⁸ **Treating Opportunistic Infections Among HIV-Infected Adults and Adolescents. Morbidity and Mortality Weekly Report.** Recommendations and Reports. 2004; 53, RR,15.

¹²⁹ **Sobottka I, Iglauer F, Schüller T, Schmetz C, Visvesvara GS, Albrecht H, et al.** Acute and long-term humoral immunity following active immunization of rabbits with inactivated spores of various *Encephalitozoon* species. *Parasitol Res*. 2001; (87): 1-6.

¹³⁰ **Yılmaz S, Dursun M, Ertem M, Canoruc F, Turhanoglu A.** The epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Southeastern Anatolia: a stratified randomised community-based study. *Int J Clin Pract*. 2005; 59 (3): 361–369.

¹³¹ **McLauchlin J, Pedraza-Diaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL.** Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Strains from 218 Patients with Diarrhea Diagnosed as Having Sporadic Cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37 (10): 3153–3158.

¹³² **Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA, Shimizu RY.** Acid-fast staining of *Cryptosporidium* from human fecal specimens. *Clin. Microbiol. Newslett*. 1983; 5: 60-62.

¹³³ **Menotti J, Cassinat B, Porcher R, Sarfati C, Derouin F, Molina JM.** Development of a Real-Time Polymerase-Chain- Reaction Assay for Quantitative Detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in Stool Specimens from Immunocompromised Patients with Intestinal Microsporidiosis. *JID*. 2003; 187: 1469-1474.

- ¹³⁴ **The Enteric Opportunistic Infections Working Group, Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS.** Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med.* 1992; 326 (3): 161-166.
- ¹³⁵ **McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols GL.** Molecular Epidemiological Analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of Genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 Fecal Samples from Humans and 105 Fecal Samples from Livestock Animals. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000; 38 (11): 3984–3990.
- ¹³⁶ **Alpert G, Bell LM, Kirkpatrick CE, Budnick LD, Campos JM, Friedman HM, et al.** Outbreak of Cryptosporidiosis in day care center. *Pediatrics.* 1986; 77: 152-157.
- ¹³⁷ **Public Health Laboratory Service Study Group.** Cryptosporidiosis in England and Wales; prevalence and clinical and epidemiological features. *Br. Med J.* 1990; 300: 774-777.
- ¹³⁸ **Marshall A.R., Al-Jumaili I.J., Fenwick G.A., Bint A.J., Recort C.O.** Cryptosporidiosis in patients at a large teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 172-173.
- ¹³⁹ **Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, et al.** Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates Obtained from Humans in France. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001; 39 (10): 3472–3480.
- ¹⁴⁰ **Abe N, Kimata I, Iseki M.** Identification of Genotypes of *Cryptosporidium parvum* Isolates from a Patient and a Dog in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2002; 64 (2): 165-168.
- ¹⁴¹ **Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, et al.** Cryptosporidiosis: Prevalence, Genotype Analysis, and Symptoms Associated with Infections in Children in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75 (1): 78–82.
- ¹⁴² **Pereira MGC, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SAE, García-Zapata MTA.** Intra-Familial and Extra-Familial Risk Factors Associated with *Cryptosporidium parvum* Infection Among Children Hospitalized for Diarrhea in Goiania, Goias, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66 (6): 787–793.
- ¹⁴³ **Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al.** Identification of 5 Types of *Cryptosporidium* Parasites in Children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases.* 2001; 183: 492–497.

- ¹⁴⁴ **Current WL, Bick PH.** Immunology of *Cryptosporidium* sp. *Pathol Immunopathol Res.* 1989; 8: 141-160.
- ¹⁴⁵ **Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander NQ, Chalmers RM, et al.** Sporadic Cryptosporidiosis Case-Control Study with Genotyping. *Emerging Infectious Diseases.* 2004; 10(7): 1241-1249.
- ¹⁴⁶ **EI-Mahallawy HA, EI-Din NH, Salah F, EI-Arousy M, EI-Naga SA.** Epidemiologic profile of symptomatic gastroenteritis in pediatric oncology patients receiving chemotherapy. *Pediatr. Blood Cancer.* 2004; 42 (4): 338-342.
- ¹⁴⁷ **Tamer Sönmez G, Balıkçı E, Erbay A.** Lösemi ve lenfoma tanısı alan çocuklarda Cryptosporidiosis prevalansı. *Türkiye Parazitol. Derg.* 2008; 32 (3): 192-197.
- ¹⁴⁸ **Adjei AA, Rodrigues HO, Renner L, Borketey P, Ayeh-Kumi P, Adiku T, et al.** *Cryptosporidium* spp. a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu Teaching Hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004; 57: 216-219.
- ¹⁴⁹ **Nimri LF, Batchoun R.** Prevalence of *Cryptosporidium* Species in Elementary School Children. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994; 32 (4): 1040-1042.
- ¹⁵⁰ **Lee JK, Song HJ, Yu JR.** Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea. *The Korean Journal of Parasitology.* 2005; 43 (3): 111-114.
- ¹⁵¹ **Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al.** Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43 (6): 2805–2809.
- ¹⁵² **Mirzaei M.** Prevalence of *Cryptosporidium* sp. infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Korean Journal of Parasitology.* 2007; 45 (2): 133-137.
- ¹⁵³ **Iqbal J, Munir MA, Khan MA.** *Cryptosporidium* Infection in Young Children with Diarrhea in Rawalpind, Pakistan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60 (5): 868–870.
- ¹⁵⁴ **Khan WA, Rogers KA, Karim MM, Ahmed S, Hibberd PL, Calderwood SB, et al.** Cryptosporidiosis Among Bangladeshi Children with Diarrhea: A Prospective, Matched, Case-Control Study of Clinical Features, Epidemiology and Systemic Antibody Responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 71 (4): 412–419.
- ¹⁵⁶ **Glaeser C, Grimm F, Mathis A, Weber R, Nadal D, Deplazes P.** Detection and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. Isolated From Diarrheic Children in Switzerland. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2004; 23 (4): 359-361.

- ¹⁵⁷ **Hunter PR, Nichols G.** Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (1): 145–154.
- ¹⁵⁸ **Wang KX, Li CP, Wang J, Pan BR.** Epidemiological survey of cryptosporidiosis in Anhui Province China. *World J Gastroenterol*. 2002; 8 (2): 371-374.
- ¹⁵⁹ **Silva CV, Ferreira MS, Borges AS, Costa-Cruz JM.** Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. *Scand J Infect Dis*. 2005; 37 (3): 211-5.
- ¹⁶⁰ **Lim YA, Rohela M, Sim BL, Jamaiah I, Nurbayah M.** Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients in Kajang Hospital, Selangor. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36 (4): 30-33.
- ¹⁶¹ **Samie A, Bessong PO, Obi CL, Sevilleja JEAD, Stroup S, Houpt E, et al.** *Cryptosporidium* species: Preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. *Experimental Parasitology*. 2006; 114: 314–322.
- ¹⁶² **Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F.** Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (3): 1017–1023.
- ¹⁶³ **Saksirisampant W, Eampokalap B, Rattanasrithong M, Likanonsakul S, Wiwanitkit V, Nasingkarn A, et al.** Prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai*. 2002; 85 (1): 424-428.
- ¹⁶⁴ **Silva CV, Ferreira MS, Goncalves-Pires Mdo R, Costa-Cruz JM.** Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 2003; 98 (8): 1097-1099.
- ¹⁶⁵ **Sreedharan A, Jayshree RS, Sridhar H.** Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. *J. Diarrhoeal Dis. Res*. 1996; 14: 211–213.
- ¹⁶⁶ **Tanyüksel M. Gün HT, Doğancı L.** Prevalence *Cryptosporidium* spp. In patients with neoplasia and diarrhea. *Scand J. Infect Dis*. 1995; 27 (1): 69-70.
- ¹⁶⁷ **Bajer A, Bednarska M, Caccio SM, Wolska-Kusnierz B, Heropolitanska-Pliszka E, Bernatowska E, et al.** Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland. *Parasitol Res*. 2008; 103 (1): 37-42.

- ¹⁶⁸ **Llorente MT, Clavel A, Goni MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al.** Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*. 2007; 56: 201–205.
- ¹⁶⁹ **Jiang J, Alderisio KA, Xiao L.** Distribution of *Cryptosporidium* Genotypes in Storm Event Water Samples from Three Watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71 (8): 4446–4454.
- ¹⁷⁰ **Baumgartner A, Marder HP, Munzinger J, Siegrist HH.** Frequency of *Cryptosporidium* spp. as cause of human gastrointestinal disease in Switzerland and possible sources of infection, *Schweiz Med Wochenschr*. 2000; 130: 1252–1258.
- ¹⁷¹ **Bern C, Hernandez B, Lopez MB, Arrowood MJ, de Merida AM, Klein RE.** The Contrasting Epidemiology of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* Among Outpatients in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63(5, 6): 231–235.
- ¹⁷² **Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA.** Comparison of PCR and Microscopy for Detection Of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens: Clinical Trial. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36 (4): 995–998.
- ¹⁷³ **Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, et al.** Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42 (3): 1220–1223.
- ¹⁷⁴ **Lindergard G, Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO.** A novel multiplex polymerase chain reaction approach for detection of four human infective *Cryptosporidium* isolates: *Cryptosporidium parvum*, types H and C, *Cryptosporidium canis*, and *Cryptosporidium felis* in fecal and soil samples. *J Vet Diagn Invest*. 2003; 15: 262–267.
- ¹⁷⁵ **Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A.** *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol Res*. 2006; 98: 150–152.
- ¹⁷⁶ **Amar CFL, Dear PH, McLauchlin J.** Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*. 2004; 38: 217–222.

- ¹⁷⁷ **Jongwutiwes S, Tiangtip R, Yentakarm S, Chantachum N.** Simple method for long-term copro-preservation of *Cryptosporidium* oocysts for morphometric and molecular analysis. *Tropical Medicine and International Health*. 2002; 7 (3): 257–264.
- ¹⁷⁸ **Amar CFL, East C, Maclure E, McLauchlin J, Jenkins C, Duncanson P, et al.** Blinded application of microscopy, bacteriological culture, immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community-acquired diarrhoea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 529–534.
- ¹⁷⁹ **Kato S, Lindergard G, Mohammed HO.** Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. *Veterinary Parasitology*. 2003; 111: 153–159.
- ¹⁸⁰ **Fındık D, Karabayraktar A.** Gaita örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 1994; 18 (4): 415-419.
- ¹⁸¹ **Özçelik S, Dökmetaş S, Sümer Z, İçağasioğlu D, Dökmetaş İ.** Gastroenteritlerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg.* 1996; 20 (3): 333-337.
- ¹⁸² **İnceboz T, Sarı B, Orhan V.** Gastrointestinal şikayetleri olan olgularda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2002; 26: 149-150.
- ¹⁸³ **Atambay M, Daldal N, Çelik T.** Malatya'da İshalli Dışkılarda *Cryptosporidium* spp. Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2003; 27 (1): 12-14.
- ¹⁸⁴ **Doğancı T, Araz E, Ensari A, Tanyüksel M, Doğancı L.** Detection of *Cryptosporidium parvum* infection in childhood using various techniques. *Med Sci Monitor*. 2002; 8 (12): 223-226.
- ¹⁸⁵ **Börekçi G, Otağ F, Emektaş G.** Mersin'de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. *İnfek Derg.* 2005; 15 (1): 19-41.
- ¹⁸⁶ **Soba B, Petrovec M, Mioc V, Logar J.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12: 918–921.
- ¹⁸⁷ **Neira-Otero P, Munoz-Saldias N, Sanchez-Moreno M, Rosales-Lombardo MJ.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol Res*. 2005; 97: 63–67.
- ¹⁸⁸ **Araujo AJUS, Kanamura HY, de Almeida ME, de Souza Gomes AH, Pinto THL, da Silva AJ.** Genotypic Identification of *Cryptosporidium* spp. Isolated From

HIV-Infected Patients and Immunocompetent Children of Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2008; 50 (3): 139-143.

¹⁸⁹ **Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan UM, Le Bianco SM, et al.** Multilocus analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 3255- 3259.

¹⁹⁰ **Svenungsson B, Capraru T, Evengard B, Larsson R, Lebbad M.** Intestinal Microsporidiosis in a HIV-Seronegative Patient. *Scand J Infect Dis.* 1998; 30: 314–316.

¹⁹¹ **Garcia LS, Shimizu RY, Bruckner DA.** Detection of Microsporidial Spores in Fecal Specimens from Patients Diagnosed with Cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994; 32 (7): 1739-1741.

¹⁹² **Kahler AM, Thurston-Enriquez JA.** Human pathogenic microsporidia detection in agricultural samples: method development and assessment. *Parasitol Res.* 2007; 100: 529–538.

¹⁹³ **Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, et al.** The Epidemiology of Intestinal Microsporidiosis in Patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. *JID.* 2005; 191: 1658-1664.

¹⁹⁴ **Velasquez JN, Carnevale S, Guarnera EA, Labbe JH, Chertcoff A, Cabrera MG, et al.** Detection of the Microsporidian Parasite *Enterocytozoon bienewisi* in Specimens from Patients with AIDS by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1996; 34 (12): 3230–3232.

¹⁹⁵ **Notermans DW, Peek R, de Jong MD, Wentink-Bonnema EM, Boom R, van Gool T.** Detection and Identification of *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon* Species in Stool and Urine Specimens by PCR and Differential Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43 (2): 610–614.

¹⁹⁶ **Carnevale S, Velasquez JN, Labbe JH, Chertcoff A, Cabrera MG, Rodriguez MI.** Diagnosis of *Enterocytozoon bienewisi* by PCR in Stool Samples Eluted from Filter Paper Disks. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2000; 7 (3): 504–506.

¹⁹⁷ **Kumar SS, Ananthan S, Joyee AG.** Detection of *Enterocytozoon bienewisi* (Microsporidia) by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primer in stool samples of HIV patients. *Indian J Med Res.* 2005; 121: 215-219.

- ¹⁹⁸ **Müller A, Stellerman K, Hartmann PIA.** A powerful DNA extraction method and PCR for detection of Microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6 (2): 243-246.
- ¹⁹⁹ **Ignatius R, Henschel S, Liesenfeld O, Mansmann U, Schmidt W, Koppe S, et al.** Comparative Evaluation of Modified Trichrome and Uvitex 2B Stains for Detection of Low Numbers of Microsporidial Spores in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 1997; 35 (9): 2266–2269.
- ²⁰⁰ **Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA.** Comparison of Three Staining Methods for Detecting Microsporidia in Fluids. *Journal of Clinical Microbiology.* 1995; 33 (12): 3138–3145.
- ²⁰¹ **Raynaud L, Delbac F, Broussolle V, Rabodonirina M, Girault V, Wallon M, et al.** Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in Travelers with Chronic Diarrhea by Specific PCR Amplification. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998; 36 (1): 37–40.
- ²⁰² **Subrungruang I, Mungthin M, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S.** Evaluation of DNA Extraction and PCR Methods for Detection of *Enterocytozoon bienuesi* in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 42 (8): 3490–3494.
- ²⁰³ **Katzwinkel-Wladarsch S, Deplazes R, Weber R, Löscher T, Rinder H.** Comparison of Polymerase Chain Reaction with Light Microscopy for Detection of Microsporidia Clinical Specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997; 16 (1): 7-10.
- ²⁰⁴ **Fedorko DP, Nelson NA, Didier ES, Bertucci D, Delgado RM, Hruszkewycz AM.** Speciation of Human Microsporidia by Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65 (4): 397–401.
- ²⁰⁵ **Rinder H, Janitschke K, Aspöck H, da Silva AJ, Deplazes P, Fedorko DP, et al.** Blinded, Externally Controlled Multicenter Evaluation of Light Microscopy and PCR for Detection of Microsporidia in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998; 36 (6): 1814–1818.
- ²⁰⁶ **Müller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C.** Detection of Microsporidia in Travelers with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001; 39 (4): 1630–1632.

8. EKLER

ETİK KURUL ONAYI



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 03.05.2005/116

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Doç. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Doç. Dr. Uğur MÜNGAN
Doç. Dr. Hüray İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Doç. Dr. Özgül SAĞOL
Doç. Dr. Görsev YENER
Yard. Doç. Dr. Cenk ERDAL
Doç. Dr. Kamer UYSAL
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR

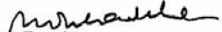
Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 03 Mayıs 2005 tarih ve 12/09/05 no.lu toplantısında, Parazitoloji Anabilim Dalı, Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Ümit AKSOY'un sorumlu olduğu 51 protokol no.lu "İshalli Dışkılarda *Microsporidium* spp. Ve *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması ve PCR yöntemi ile tür tayininin yapılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54