

T. C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA YÖRESİNDE İMMUNSUPRESE  
HASTALARDA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP SIKLIĞININ  
KİNYOUN ASİT-FAST BOYAMA VE ELISA  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. ADEM DAĞ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sami TAŞÇI

ŞANLIURFA

2010

T. C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA YÖRESİNDE İMMUNSUPRESE  
HASTALARDA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP SIKLIĞININ  
KİNYOUN ASİT-FAST BOYAMA VE ELISA  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. ADEM DAĞ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sami TAŞÇI

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurumu Başkanlığı tarafından 921 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIUFA

2010

## TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmaların yürütülmesine kadar her aşamada bilgi ve desteğinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Sami TAŞÇI'ya en içten şükran duygularımı sunarım.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden buyana desteğini gördüğüm sayın Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e ve yine eğitimimde katkısı olan, bakteriyolojide mesafe kat etmemi sağlayan sayın Doç. Dr. Mehmet Bayraktar'a, hastanemiz Pediatri Anabilim Dalı'nda desteklerini gördüğüm sayın Yrd. Doç. Dr. Ali Ayçiçek'e, tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan ve yardımını esirgemeyen sevgili eşim Safiye'ye, minik kızlarım Elif Nisa ile Esnanur'a ve aileme, asistanlığım ve tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini gördüğüm Dilek Esen, Esmâ Ceylan, Ahmet Demir, Reşat Dikme, Şükrü Biçek, Mehmet Kaya, Ali Küçük ile tüm laboratuvar personeline, Dr. Seray Tümer ve tüm asistan arkadaşlarıma, Şanlıurfa Sağlık Meslek Yüksekokulu'nda öğretim görevlisi olan sevgili arkadaşım Nebiye Yentür Doni'ye, hastanemizin Hematoloji servisi ile Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına, Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarı personeline, Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesi ve Onkoloji Ünitesi görevlilerine, hastanemiz biyokimya laboratuvarında bulunan öğretim görevlisi Hakim Çelik ve Abdullah Taşkın'a, Refik Saydam Hıfzı Sıhha Salgın Hastalıklar ve Araştırma Müdürlüğü Parazitoloji Laboratuvarı personeline ve yine Şanlıurfa Meteoroloji Bölge Müdürlüğü'ne en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca asistanlığım boyunca sorularıyla bunalttığım, yazı işlerimde son dayanağım olan değerli kardeşim Murad Alkan'a ve sevgili Tevrat Zeray'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2. 1. Tarihçe.....	4
2. 2. Taksonomi.....	5
2. 3. Morfolojisi ve Evrimi.....	7
2. 3. 1. Ekskistasyon Dönemi.....	11
2. 3. 2. Merogoni Dönemi.....	11
2. 3. 3. Gametogoni Dönemi.....	12
2. 3. 4. Döllenme (Fertilizasyon) Dönemi.....	12
2. 3. 5. Ookist Dönemi.....	12
2. 3. 6. Sporogoni Dönemi.....	13
2. 4. Epidemiyolojisi.....	14
2. 5. Patogenezi.....	17
2. 6. İmmunolojik ve Antijenik Yapısı.....	19
2. 6. 1. İmmun Sistemi Sağlam Konaklarda Hümorale ve Hücresele İmmun Yanıt.....	19
2. 6. 2. İmmun Sistemi Baskılanmış Konaklarda Hümorale ve Hücresele İmmun Yanıt.....	22
2. 7. Cryptosporidiosisin Klinik Şekilleri ve Klinik Belirtileri.....	23
2. 7. 1. İntestinal Cryptosporidiosis.....	23
2. 7. 2. Respiratuar Cryptosporidiosis.....	24
2. 7. 3. Hepatobiliyer Cryptosporidiosis.....	24
2. 7. 4. Pankreatik Cryptosporidiosis.....	25
2. 8. Tanısı.....	27
2. 8. 1. Direkt Yöntemler.....	27
2. 8. 2. Serolojik Yöntemler.....	32
2. 8. 3. Moleküler Yöntemler.....	34
2. 8. 4. Histopatolojik Yöntemler.....	37
2. 9. Hücre Kültürü.....	37

2. 10. Tedavisi.....	38
2. 11. Korunma.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	43
3. 1. Formol-Etil Asetat Çöktürme Yöntemi.....	45
3. 1. 1. Kullanılan Maddeler.....	45
3. 1. 2. Yapılışı.....	45
3. 2. Kinyoun Asit-Fast Boyama Yöntemi.....	46
3. 2. 1. Kullanılan Maddeler.....	46
3. 2. 2. Hazırlanan Solüsyonlar.....	47
3. 2. 3. Yapılışı.....	48
3. 2. 4. Değerlendirme.....	48
3. 3. ELISA Yöntemi İle Antijen Arama.....	49
3. 3. 1. Kit İçinde Bulunan Reaktifler.....	49
3. 3. 2. İlave Gerekli Reaktifler ve Gerekli Malzemeler.....	50
3. 3. 3. Yıkama Solüsyonu ve Örneklerin Hazırlanması.....	50
3. 3. 4. Testin Çalışılması.....	51
3. 4. Pozitif Örneklerin DFA Yöntemi İle Test Edilmesi.....	51
3. 4. 1. Testin Çalışılması ve Değerlendirilmesi.....	52
3. 5. İstatistiksel Analizler.....	52
4. BULGULAR.....	53
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	77
7. KAYNAKLAR.....	79

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.	<i>Cryptosporidium</i> 'a ait yaşam döngüsü.....	9
Şekil 2.	<i>Cryptosporidium</i> 'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri.....	10
Şekil 3.	Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle boyanmış <i>Cryptosporidium</i> ookistleri.....	31
Şekil 4.	İmmunsuprese grupta immun yetmezliğe neden olan durumlar.....	57

## TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.	<i>Cryptosporidium</i> cinsine ait sınıflandırma.....	6
Tablo 2.	Tanımlanan <i>Cryptosporidium</i> türleri.....	8
Tablo 3.	Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile ELISA yönteminin karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.	Her iki grubun hastalarında tespit edilen şikayetler.....	57
Tablo 5.	İmmüsuprese hastalar ile immünkompetan hastaların gaita örneklerinde saptanan parazitlerin karşılaştırılması.....	58
Tablo 6.	Cryptosporidiosisli 4 hastanın sosyo-demografik özellikleri ve <i>Cryptosporidium</i> açısından dışkı numunelerine uygulanan testlerin sonuçları.....	59
Tablo 7.	Çalışma süresi boyunca tespit edilen aylık meteorolojik parametreler.....	60
Tablo 8.	<i>Cryptosporidium parvum</i> 'ların tespit edildiği tarihler.....	60
Tablo 9.	Cryptosporidiosisli hastalarda gözlenen klinik belirtiler, bazı biyokimyasal test sonuçları ve hastalık seyri.....	61

## FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Sayfa

Fotoğraf 1.	Non Hodgkin Lenfoma hastasının (2 nolu hasta) gaita numunesinde Kinyoun asit-fast boyama ile <i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri.....	54
Fotoğraf 2.	İlk 94 hastanın ELISA sonuçları.....	55
Fotoğraf 3.	Son 86 hastanın ELISA sonuçları.....	55
Fotoğraf 4.	Cryptosporidiosisli 4 vakada DFA yöntemi ile floresan mikroskopta gözlenen <i>Cryptosporidium parvum</i> ookistleri.....	56



## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat Derece
Cl	Klor
gr	Gram
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O	Potasyumdikromat
KOH	Potasyum Hidroksit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mm <sup>3</sup>	Milimetre Küp
Na	Sodyum
nm	Nanometre

### Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Acquired Immune Defeciency Syndrome
AML	Akut Myeloid Lösemi
AO	Acridine Orange
AP-PCR	Arbitrary Primed PCR
AR	Auramin-Rhodamine
Coca-2	İnsan Kolon Karsinoma Hücre Kültürü
COWP	<i>Cryptosporidium</i> Ookist Duvar Proteini

DFA	Direkt Floresan Antikor
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent assay
Fc	Fragment crystallizable
FITC	Flourescein Isothiocyanate
HAART	Yüksek Derecede Aktif Antiretroviral Tedavi
HCT-8	İnsan İlioçekal Karsinoma Hücre Kültürü
HIGM3	Hiperimmunglobulin M sendromu Tip 3
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSP70	Heatschock Protein 70 kDa
HÜTF	Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
IFA	İmmun Floresan Antikor
IFAT	İndirekt Floresan Antikor Tekniği
IFN $\gamma$	İnterferon Gama
Ig A, Ig G	İmmunglobulin A, İmmunglobulin G
IL	İnterlökin
KMH	Kalıtsal Metabolik Hastalık
MDBK	Mardin Darby Kidney
NHL	Non Hodgkin Lenfoma
NK	Natural Killer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE2	Prostoglandin E2
PIs	Proteaz İnhibitörleri
RABD	Random Amplified Polymorphic Deoksiribonükleik Asit
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SÇSH	Şanlıurfa Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi
ŞEAH	Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi
ss rRNA	Small Subunit Ribozomal Ribonükleik asit
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
XHIM	Hiperimmunglobulin M Sendromu Tip 3

## ÖZET

### ŞANLIURFA YÖRESİNDE İMMUNSUPRESE HASTALARDA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP SIKLIĞININ KİNYOUN ASİT-FAST BOYAMA VE ELISA YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

*Cryptosporidium* spp. özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda uzun süren ağır ishalleri neden olmaktadır.

Bu çalışmada *Cryptosporidium* spp'nin Şanlıurfa yöresinde görülme sıklığını araştırmayı, cryptosporidiosisin gastrointestinal şikayetleri olan immunsuprese ve immunkompetan hastalarda oluşturduğu klinik semptomlar arasındaki farklılığı belirlemeyi ve bu parazite yönelik her iki gruptaki hastalara ait dışkı numunelerine uygulanan Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile ELISA yöntemi sonuçlarını karşılaştırmayı amaçladık.

Çalışmada Şanlıurfa yöresinde gastrointestinal şikayetleri bulunan 100 immunsuprese ve 80 immunkompetan hastaya ait dışkı numunelerinin bir miktarına Kinyoun asit-fast boyama yöntemi uygulandı. Dışkı numunelerinin bir miktarına da daha sonra bu örneklerde ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium parvum* koproantijenleri araştırılmak amacıyla ependorf tüplerine alınarak hiçbir koruyucu madde eklenmeden – 20 °C'de saklandı. Her iki yöntemden en az biri ile pozitif sonuç alınan dışkı örnekleri DFA yöntemi ile de çalışılmak amacıyla %10 formolde oda ısısında saklandı.

İmmunsuprese grupta bulunan 100 hastanın 4'ü (%4) ELISA ile, 3'ü (%3) Kinyoun asit-fast boyama ile cryptosporidiosis tanısı aldı. Kontrol grubunda ise her iki yöntemle de *Cryptosporidium* saptanamadı. Kinyoun asit-fast boyama ile *Cryptosporidium* ookistleri saptanan 3 dışkı numunesi ELISA yöntemi ile de pozitif sonuç verdi. ELISA ile pozitif saptanan dışkı numuneleri, DFA yöntemiyle de doğrulandı. Cryptosporidiosisli 4 hastanın ikisi öldü, diğer ikisinde klinik ve parazitolojik düzelme sağlandı.

Bu çalışmada konak faktörlerinin ve immunitenin *Cryptosporidium* enfeksiyonunun prognozunu belirlediği görülmüştür. Sırasıyla %100 ve %99 sensitivite ve spesifiteye sahip kolay, güvenilir ve daha az subjektif olan ELISA yöntemi, rutin tanıda ve kısa sürede çok sayıda örneğin taranmasında özellikle büyük ölçekli epidemiyolojik surveyansda çok faydalı olabilir. Bununla birlikte immunsuprese hastalarda ishale neden olan *Isospora* ve *Cyclospora* gibi diğer patojenlerin olup olmadığının da saptanmasına imkan verdiği için asit-fast boyama yönteminin de faydasının küçümsenmemesi gerektiği kanaatindeyiz. Gastrointestinal şikayeti olan her immunsuprese hastanın ve sulu ishali olan her hastanın cryptosporidiosis açısından asit-fast boyama yöntemiyle incelenmesinin ve boyama yöntemiyle ookist saptanamayan dışkı numunelerinde ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium* antijeni aranmasının cryptosporidiosis tanısında duyarlılığı arttıracadığı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** şanlıurfa, *Cryptosporidium* spp, immunsuprese hasta, Kinyoun asit-fast boyama, ELISA

## ABSTRACT

### INVESTIGATING THE FREQUENCY OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP AMONG IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS IN ŞANLIURFA PROVINCE USING THE KINYOUN ACID-FAST STAIN AND ELISA METHODS

*Cryptosporidium* spp. causes long-lasting severe diarrhea especially in immunosuppressed patients.

In this study, we aimed to investigate the frequency of *Cryptosporidium* spp. in Şanlıurfa province, to determine the difference of clinical symptoms of immunosuppressed and immunocompetent patients with gastrointestinal complaints that caused by cryptosporidiosis and also to compare the results of stool samples of both groups which studied by Kinyoun acid-fast stain and ELISA methods.

In this study, the Kinyoun acid-fast staining method was applied to a number of the fecal samples taken from 100 immunosuppressed and 80 immunocompetent patients with gastrointestinal complaints in Şanlıurfa province. A number of the fecal samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  after being transferred to eppendorf tubes without the addition of any preservatives towards the aim of probing for *Cryptosporidium parvum* coproantigens in these samples using the ELISA method. The fecal samples for which positive results had been obtained with at least one of the two methods were stored at room temperature at 10% formaldehyde so that they could be examined using the DFA method.

Four (4%) out of 100 patients in the immunosuppressed group were diagnosed with cryptosporidiosis as a result of ELISA method and 3 (3%) received this diagnosis as a result of Kinyoun acid-fast stain method. In the control group, *Cryptosporidium* spp. could not be detected with either method. Three fecal samples in which *Cryptosporidium* oocysts were detected using Kinyoun acid-fast stain provided positive results as a result of the ELISA

method, as well. The fecal samples detected to be positive using the ELISA method were also confirmed to be positive using DFA method. Two out of 4 patients with cryptosporidiosis passed away; clinical and parasitological improvements were achieved in the other two patients..

This study suggested that the host factors and immunity determined the prognosis of *Cryptosporidium* infection. The ELISA method, which has 100% sensitivity and 99% specificity and which is easy, reliable and less subjective, can be very beneficial in routine diagnosis and in screening several samples in a short period of time, especially in large scale epidemiological surveillance. On the other hand, we hold the opinion that the benefit of acid-fast stain method should not be underestimated, either; because it enables us to determine whether other pathogens causing diarrhea in immunosuppressed patients such as *Isospora* and *Cyclospora* are available. It has been concluded that examining every immunosuppressed patients with gastrointestinal complaints and every patients with watery diarrhea for cryptosporidiosis using acid-fast stain method and using the ELISA method to search for *Cryptosporidium* in the fecal samples in which no oocysts were detected with stain method will raise sensitivity in cryptosporidiosis diagnosis.

**Keywords:** Şanlıurfa, *Cryptosporidium* spp, immunosuppressed patient, Kinyoun acid-fast stain, ELISA

## 1. GİRİŞ

Cryptosporidiosis; *Cryptosporidium* cinsi parazitlerin ookist formu ile oluşan enfeksiyona verilen addır. Her geçen gün gerek bağışıklık sistemi baskılanmış olguların sayısındaki artış gerekse bağışıklık sistemi sağlam kişilerde de büyük salgınların saptanması, cryptosporidiosisin önemini arttırmaktadır. *Cryptosporidium* enfeksiyonları yalnızca çocuklarda değil aynı zamanda yaşlı kişiler ve immun yetmezliği olan hastalarda da ishalin bir nedeni olarak gittikçe tanınmaktadır (1-3). Primer immun yetmezliği olan hastalar arasında *Cryptosporidium* enfeksiyonuna olan duyarlılık; CD40 ligand (CD40L) eksikliğinin olduğu X'e bağılı hiper immunglobulin M sendromu tip 1 (XHIM)'i ve CD40 yetmezliğinin görüldüğü hiper IgM sendromu tip 3 (HIGM3)'ü olan ve yine primer CD40 lenfopenisi, ağır kombine immun yetmezlik sendromu ve interferon gama (IFN- $\gamma$ ) eksikliği olan çocuklarda gözlenmektedir (4-6). İnsan immum yetmezlik virus (Human Immunodeficiency Virus, HIV) enfeksiyonu ve akut lösemi gibi sekonder immun yetmezlik durumlarında da enfeksiyon riskinde artma olduğu belirlenmiştir (7).

Parazit genellikle ince bağırsağın epitelyal hücrelerini infekte eder ancak immunkompromize kişilerde *Cryptosporidium* tüm gastrointestinal sistem boyunca, solunum yollarında ve safra kesesinde bulunabilir (8). Gerek bağışıklığı sağlam, gerekse bağışıklığı baskılanmış bireylerde cryptosporidiosisin tipik klinik belirtisi ishaldir. Non inflamatuvar özellikteki ishal karakteristik olarak bol ve sulu olup; mukus içerebilmekte ancak dışkıda kan ve lökosit nadiren bulunmaktadır. Bu tabloya sıklıkla kilo kaybı da eşlik etmektedir. Daha az sıklıkla rastlanan diğer klinik belirtiler karın ağrısı, bulantı, kusma ve 39 °C altında ateş, bazen halsizlik, baş ağrısı gibi özgül olmayan belirtiler de gözlenebilmektedir (9-12). Belirtilerin şiddeti kişiden kişiye değişebilmekte ve sıklıkla atılan ookist miktarı ile paralellik göstermektedir. Klinik semptomların şiddeti ve süresi konağın yaş ve bağışıklık sisteminin

durumuna bağlı olarak değişmektedir. Kazanılmış immun yetmezlik sendromu (Acquired Immune Defeciency Syndrome, AIDS) hastalarında daha sık olarak uzun süren ve yaşamı tehdit eden enfeksiyon, bağışıklığı sağlam bireylerde kısa sürmekte ve kendiliğinden tamamen iyileşme ile sonuçlanmaktadır (10,12). İmmunkompromize kişiler enfeksiyonla başetmede yetersiz olduklarından ishal daha uzun devam etmektedir. Örneğin, hastalarda zamanla malabsorbsiyon, steatore ve ekstraintestinal belirtiler gelişir (13). Kronik karaciğer inflamasyonu veya karaciğer sirozuna ilerleyebilen ekstraintestinal enfeksiyonların en yaygın olduğu bölge safra yollarıdır (6,14).

Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ishal etkeni olarak birçok patojen saptanabilirken, yapılan çalışmalarda Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bu olguların %16'sında, gelişmekte olan dünya ölkelerinde ise yaklaşık %50'sinde ishalden *Cryptosporidium* türlerinin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (15-17).

Cryptosporidiosisde klinik bulgular özgül olmadığından tanı yalnızca laboratuvar incelemesi ile konur. Özellikle salgınların saptanması ve zamanında kontrol önlemlerinin alınabilmesi için cryptosporidiosisin sürveyansı önemlidir. Bu parazitlerin hızlı ve duyarlı yöntemlerle saptanabilmesi halen teknik bir problemdir. Antijen-antikor temeline dayalı testler çeşitli organizmalarla çapraz reaksiyon oluşturabilmekte ve patojen olmayan türleri de saptayabilmektedir (18, 19). Mikroskopta direkt arama yöntemlerinin duyarlılığı düşük olabildiği gibi, mikroskopi yapan kişinin tecrübesine göre değişebilen ve uzun zaman gerektiren yöntemlerdir. Bu nedenle laboratuvarda *Cryptosporidium* spp'nin tanımlanabilmesi hastalığın epidemiyolojik verilerinin şekillenmesine yardımcı olabileceği gibi gerçek etken olarak ishallerin tanı ve tedavisine ışık tutacaktır.

Bu tez çalışmasındaki amacımız *Cryptosporidium* spp'nin şanlıurfa yöresinde görölme sıklığını araştırmak, cryptosporidiosisin immunkompetan ve immunkompromize hastalarda oluşturduğu klinik semptomlar arasındaki farklılığı belirlemek ve yine *Cryptosporidium* spp.'nin tespitine yönelik uygulanan testlerin etkinliğini karşılaştırmaktır. Gastrointestinal şikayeti olan immunkompetan veya immunsuprese bireylerde cryptosporidiosisin sıklığının belirlemenin epidemiyolojik ve çevresel çalışmaları yürütmeye yönelik katkı sağlayacağı kanısındayız. Bu yöredeki araştırmanın cryptosporidiosisin halk sağlığındaki öneminin değerlendirilmesine katkıda bulunacağı ve paraziti bulaştırma



dinamiklerinin daha iyi anlaşılması, rezervuar konakların ve risk faktörlerinin tanımlanması ile koruyucu önlemlere katkıda bulunması açısından araştırmacılara imkan vereceği inancındayız.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Cryptosporidium* spp. ookistleri, 4-6 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) çapında koksidian bir protozoon olup zorunlu hücre içi parazittir. Çeşitli omurgalıların solunum epitelinde ve mide-bağırsak epitel mikrovilluslarında yerleşerek insanlarda enterokolit, ishal ve kolanjiopatiye neden olur (20, 21). Cryptosporidiosisli bağışıklık sistemi gelişmiş çocuk ve erişkinlerde genellikle sulu ishal, emilim bozukluğu ve kilo kaybının olduğu kısa süren bir hastalık görülür. Bağışıklık sistemi baskılanmış kimselerde ise enfeksiyon, hayatı tehdit eden ve uzun süren bir hastalık oluşturabilir (7).

### 2.1. Tarihçe

*Cryptosporidium* spp. ilk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilerek “ fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri ” şeklinde tarif edilmiş ve bundan yaklaşık 12 yıl sonra 1907 yılında Tyzzer tanımlamış, 1910 yılında *Cryptosporidium muris* adı ile hem cinsi hem de türünü tarif etmiş ve evrimini açıklamıştır. Yine 1912’de *Cryptosporidium parvum*’u bildirmiştir. Önceden bilinen koksidian parazitlerin aksine ookistlerin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistlerin olmaması nedeniyle *Cryptosporidium* (gizli sporokistler) olarak isimlendirilmiştir (22, 23, 24, 25).

İlk insan olguları 1976 yılında gastroenteritli 3 yaşındaki bir kızda ve daha sonra da bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide görülmüş olup bu olgu bir çiftlikte yaşayan hayvanlarda saptanan enfeksiyonla aynı zamanda ortaya çıkmıştır. Bu nedenle

cryptosporidiosis bir zoonoz olabileceği düşünülmüştür. 1981-1982 yıllarında ise AIDS'li hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları saptanmış ve şiddetli enterite neden olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerde görülen uzun süreli sıklıkla bol sulu dışkı, zayıflama gibi belirtiler parazitin fırsatçı patojen olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki yıllarda yayımlanan araştırmalarda hayvan bakıcılarında, turistlerde ve bağışıklığı sağlam kişilerde de salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (22, 24, 26- 29).

## 2. 2. Taksonomi

*Cryptosporidium* cinsi Apicomplexa bölümü, Sporozoasida sınıfı, Coccidiasina alt sınıfı, Eucoccidiorida takımı, Eimeriorina alt takımı, Cryptosporidiidae ailesi içinde yer alan bir protozoondur (30). Bu türün araştırmacılar tarafından belirlenmiş sınıflandırılması Tablo 1'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (31).

Farklı konaklardan izole edilen *Cryptosporidium* türlerinin ookist duvarı ve sporozoit antijenleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve türler arasındaki farklılıklar gösterilmiştir (32). *Cryptosporidium* türleri; morfolojileri, konak özgüllükleri, konakta yerleşim yerleri ve son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler ile belirlenen moleküler özelliklerine göre isimlendirilmiştir. Bugüne kadar bu cinse ait farklı omurgalı konaklarda parazitlenen 16 ayrı tür tanımlanmıştır (33).

*Cryptosporidium* türleri arasındaki ilişkinin anlaşılması ancak moleküler biyoloji alanındaki yenilikler ve bu alanda uygulanan Western-blot, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Random Amplified Polymorphic DNA (RABD) gibi tetkikler sayesinde mümkün olmuştur. Heatschock protein 70kDa (HSP70), small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) ve aktin kodlayan genlerin varlığı izole edilen tüm *Cryptosporidium* türlerinde ortaya konmuş olup ilgili genlerin genomda 400-500 baz çiftinden oluşan bir bölgede yerleşim gösterdikleri anlaşılmıştır (34). Memelileri enfekte eden *Cryptosporidium parvum* türünün ookistlerinde bulunan sporozoitlerin çeşitli nükleik asit ve enzimlerini (18 ssrRNA ve HSP70 gibi)

kodlayan genlerin moleküler analizlerine göre konakta adapte olmuş 7 farklı genotipinin bulunduğu bildirilmiştir (35).

**Tablo 1.** *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma (31)

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

Son yıllarda belirli genetik bölgeleri çoğaltmak amacı ile restriction fragment length polymorphism (RFLP) gibi moleküler yöntemlerin yaygın kullanılmasıyla *Cryptosporidium*

türlerinin biyolojik özellikleri ve bulaşımın daha iyi anlaşıldığı bildirilmiştir (36). Bu moleküler biyoloji çalışmaları sonucunda, insanda cryptosporidiosisten sorumlu olan *Cryptosporidium parvum*'un iki farklı genotipinin olduğu, bunlardan insan genotipinin (genotip 1; genotip H; anthroponotik genotip) sadece insanlarda bulunduğu, sığır genotipinin (genotip 2; genotip C; zoonotik genotip) ise sığır, koyun, geyik, insanlar ve nadiren domuz ve farelerde enfeksiyona yol açabileceği saptanmıştır (37). İnsan enfeksiyonlarının çoğunluğunu genotip 2'nin oluşturduğu ve özellikle bahar mevsiminde daha çok görüldüğü bildirilmiştir (38). Bu genotipler sonradan *Cryptosporidium hominis* (genotip 1, insan genotipi), *Cryptosporidium parvum* (genotip 2, sığır genotipi) olarak farklı iki tür olarak tanımlanmıştır (37).

Zoonotik karakterdeki *Cryptosporidium parvum* ile anthroponotik karakterdeki *Cryptosporidium hominis* insandaki cryptosporidiosisten en sık sorumlu olan etkenler olmasına karşın *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium muris* ve *Cryptosporidium suis*'in de insanda enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Tablo 2) (33, 38).

### 2 3. Morfolojisi ve Evrimi

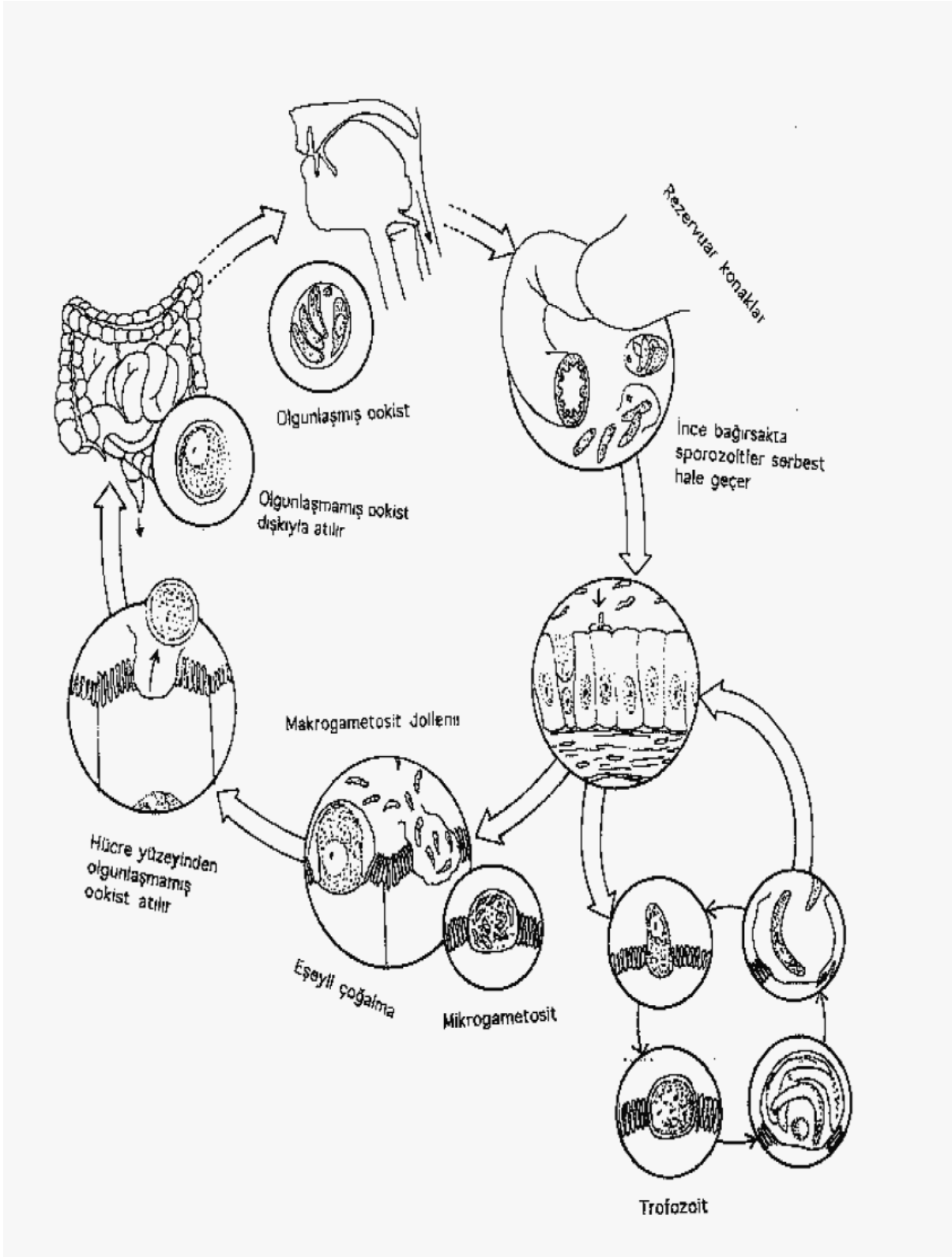
*Cryptosporidium* spp. ookistleri 4-6 µm çapında, kalın bir duvarla çevrilmiş, sferik ve içerisinde 4 sporozoit bulunan yapılardır ve sporokistleri bulunmamaktadır. Sporozoitler rhoptri, mikronem ve yoğun granüller içeren, konak hücreye invazyonu sağlayan apikal kompleks adı verilen bir organelle sahiptir. Hareketli sporozoitler ince bağırsak epitelyum hücrelerinin yüzey reseptörlerine parazitlerin bazı bağları (gp900, CP47, Cpg40/15 gibi) ile bağlanırlar. Bağlanma sonrası parazitler aktin polimerizasyonuna neden olur ve ince bağırsak epitel hücre membranında bir çıkıntı oluşur. Bu membran sporozoiti sarar ve epitel hücresinin mikrovillus tabakasında parazitofor vakuölü meydana getirir (39, 40).

**Tablo 2.** Tanımlanan *Cryptosporidium* türleri (22)

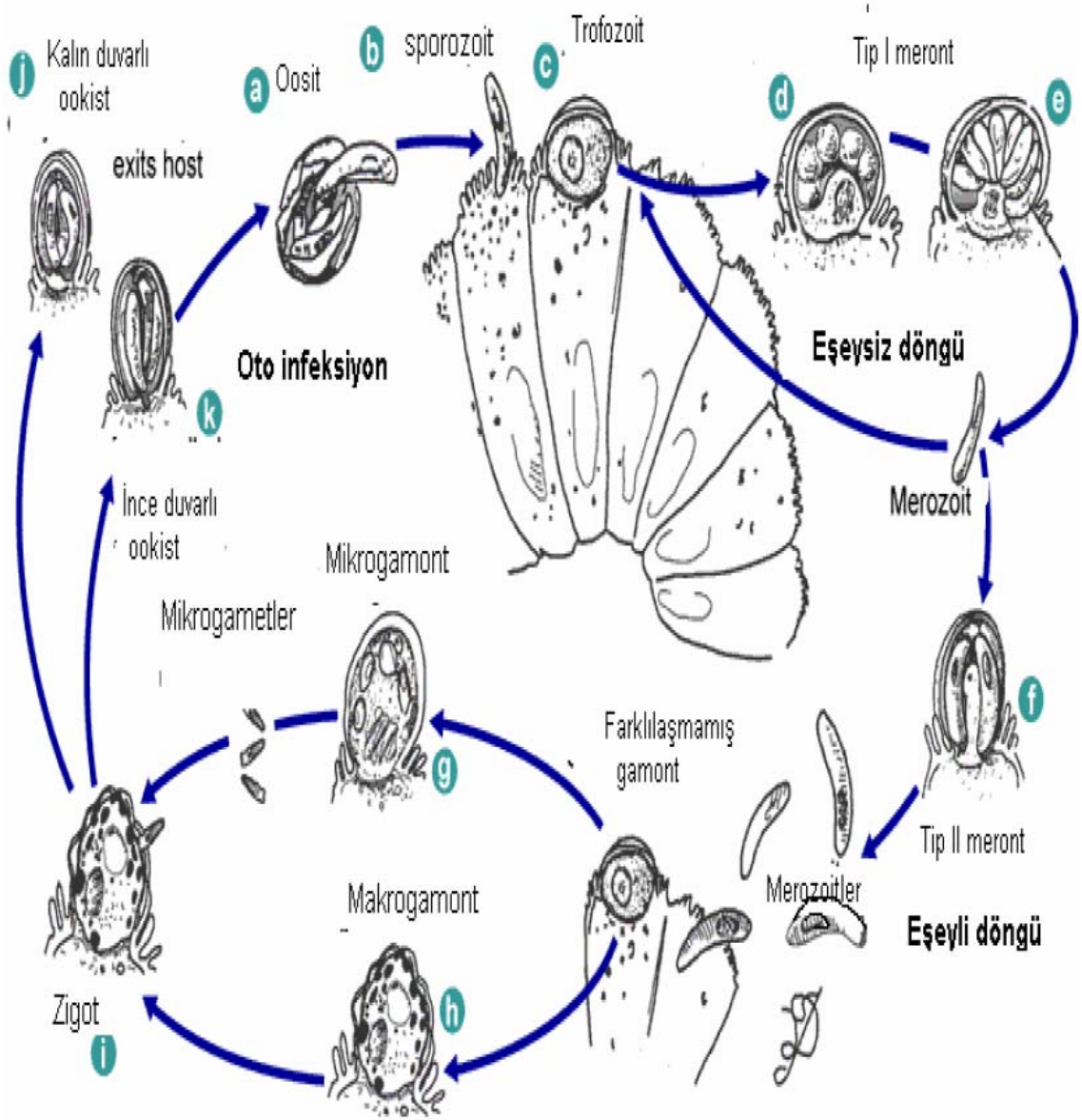
<b><i>Cryptosporidium</i> türleri</b>	<b>Konak</b>	<b>Yerleşim yeri</b>
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Öküz, İnek	Mide
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Hindi	Kloak, bursa
<i>Cryptosporidium canis</i>	Köpek, İnsan	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium felis</i>	Kedi, İnsan	İnce bağırsak
<i>Cryptosporidium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

Konak enterositleri içinde bulunan ookistlerin %80'i kalın duvarlı ve çift cidarlı iken yaklaşık %20'si ince cidarlıdır. Ookist duvarı ile elektron lucent boşlukla birbirinden ayrılmış elektron yoğun tabakadan oluşmaktadır (41). Kalın duvarlı ookistlerin tip1 ve tip2 duvar şekillendirici cisimlere sahip olduğu, ince duvarlı ookistlerde ise bu cisimlerin bulunmadığı bildirilmiştir (20). Dış ortama dirençsiz yalnızca tek bir zarla çevrili olan ince cidarlı ookistler oto enfeksiyondan sorumludurlar.

*Cryptosporidium* türleri, aseksüel (şizogoni, merogoni) ve seksüel (gametogoni, sporogoni) döllenme şekillerinin değişimi ile karakterize yaşam döngüsünü tek bir konakta (monoksen) tamamlar. Yaşam döngüsü memelilerde enfeksiyona neden olan *Eimeria* ve *Isospora* gibi diğer koksidian paraziterlerin yaşam döngülerine benzerlikler göstermektedir. Buna göre başlıca 6 gelişim evresi bulunmaktadır: Ekskistasyon, merogoni, gametogoni, döllenme, ookist ve sporogoni dönemi (20, 42) (Şekil 1, Şekil 2).



Şekil 1. *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsü (42).



Şekil 2. *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri (58).



### 2. 3. 1. Ekskistasyon Dönemi

Etkenin dışkı ile dışarı atılan formu sporlanmış ve enfektivite kazanmış ookist formlarıdır. Dışkı ile dışarı atılan bu ookistler kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde 4 sporozoit, birçok küçük tanecikler ve zara bağlı kürecikler yer alır. Ookist yiyecek, içecek veya bazı diğer çevresel etmenler aracılığı ile oral yoldan, konjuktiva yoluyla veya inhale edilerek alınabilmektedirler (43). Sindirim yoluyla konak hücre tarafından alınan ookistlerin normal şartlarda ince bağırsakta açılması “ekskistasyon” olarak da adlandırılır. Kist açılımında rol oynayan faktörler arasında pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik indirgeyici etmenler sayılabilir. Ağız aracılığı ile alınan ookistler uygun konakların sindirim yolunda açılır ve sporozoitler serbest hale geçer (44, 45).

### 2. 3. 2. Merogoni Dönemi

Konağın sindirim yolunda serbest kalan sporozoitler konağın bağırsak epitel hücreleri (enterositler) içine girerek epitel hücrelerin mikrovillus bölgesinde trofozoit (tek nükleuslu meront) formuna dönüşürler. Bununla beraber sporozoitler bağırsağa ek olarak pankreatik kanalları, safra kanalını ve solunum sistemini de tutabilirler. Sporozoitler 4.9x 1.2 µm çapında olup çekirdekleri 1/3 arka kısmındadır, duvarı ise 50 nm kalınlığında düz ve renksiz yapıdadır (23, 42, 46-48). Sporozoitlerden oluşan trofozoitler ise 2-2.5 µm çapında , yuvarlak veya oval yapılar olup ribozomal endoplazmik retikuluma gereksinim duyarlar. Apikal kompleks tam olarak farklılaşmamış halde olup trofozoitler olgunlaşınca kaybolur ve ribozomal endoplazmik retikulum meydana gelir. Konak hücre içerisinde beslenen ve büyüyen trofozoit eşeysiz olarak şizogoni ile çoğalarak 6-8 merozoit meydana getirir. Merozoitleri taşıyan hücreye meront I (şizont) adı verilmektedir. Meront I'lerin parçalanmasıyla serbest hale geçen merozoitler diğer hücelere girerek yeni bir şizogoniyi başlatırlar ve meront I veya meront II'ye dönüşürler. Şizogoni sonrasında meront II içerisinde 4 merozoit meydana gelir. Meront

II'lerden oluşan merozoitler yeni hücreleri enfekte eder ve gametogoninin oluşmasında rol oynarlar (42, 49).

### **2. 3. 3. Gametogoni Dönemi**

Şizogoni sonucunda tip II merontların içinde oluşan 4 merozoit hücre parçalanınca serbest hale geçer ve bu merozoitler yeni bir döngü oluşturmazlar. Fakat bu merozoitler konak içinde yeni hücelere girdiklerinde mikro ve makro gametositlere, daha sonra da makro ve mikrogametlere dönüşür (42, 46, 50). Her bir mikrogamonttan 16 tane mikrogamet ve her bir makrogamonttan ise yalnızca bir makrogamet meydana gelir (44, 51, 52).

### **2. 3. 4. Dölleme (Fertilizasyon) Dönemi**

Yaşam siklusunun 4. evresinde barsak lümeninde serbest olarak bulunan 0.4-0.5 µm büyüklüğünde ve ince yapılı kamçısız mikrogametlerden birisinin 4-6 µm büyüklüğündeki makrogameti döllemesi sonucunda zigot oluşur (52-54).

### **2. 3. 5. Ookist Dönemi**

Bu dönemde zigotun etrafı iki veya üç farklı tabakanın birleşmesinden oluşan ookist duvarı ile çevrili haldedir. Zigotun etrafındaki duvarın kalınlaşması, parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayacak olan ookistleri oluşturmak içindir (46). *Cryptosporidium* spp.'nin duvarı kimyasal ve mekanik etkilere karşı dirençli bir yapı arz eder. Ookistin elektron mikroskopunda gözlenilebilen en önemli özelliklerinden birisi; ookist duvarı üzerinde

ookistin yarısını veya üçte birini saran şerit şeklinde bir yapının mevcut olmasıdır. Ookist duvarının dış tabakasında asidik özellikte glikoprotein filamentleri bulunmaktadır. Orta kısmında mikobakteriyel lipidler ve balmumu benzeri sert yapılı kompleks lipid tabakası yer alır. İç tabakası ise yine glikoproteinleri içerir. Hüce duvarında bol miktarda lipid bulunması, karbol fuksin ile boyamadan sonra ookistin asit alkol ile dekolarizasyon işleminden etkilenmemesini sağlar (45, 53).

### **2. 3. 6. Sporogoni Dönemi:**

Bu dönemde konak hücrede olgunlaşan ookistlerin içinde sporlanma ile enfektif sporozoitler meydana gelir. *Cryptosporidium* spp'nin eşeyli üremesi sonucunda 2 farklı tip ookist oluşumu gözlenir. Oluşan ookistlerin yaklaşık %80'i kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlı bir yapı gösterir (46, 48). İnce çeperli ookistler içinde 4 sporozoit yer alır. Bu ookistler konak vücudu dışına çıkmadan bağırsak boşluğuna atılıp bağırsak içinde açılırlar. İçlerinde bulunan sporozoitler serbest kalarak yeni epitel hücrelerine girerler ve konakta enfeksiyonun devamından sorumludurlar. Bu tip bulaş şekli yuvarlak solucanlardan *Strongyloides stercoralis*'in evriminde görülen duruma benzetilerek "iç oto enfeksiyon adını almıştır" (42, 50). Kalın çeperli yapıya sahip 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışı ile dışarıya atılırlar ve konaklar arası bulaşmada rol oynarlar (23, 43, 48). Bu tip ookistler hem dış oto enfeksiyon yoluyla hem kişiler arası direkt temasla hem de bulaşlı yiyecek içeceklerle ağızdan alınırlar ve bu şekilde parazit insanlararası bulaşma gösterir. Yani bulaşma fekal-oral yolla, ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir. Bu kistler çevre ve iklim koşullarına uzun süre dayanıklı yapıdadır (42, 55-57).

## 2. 4. Epidemiyolojisi

Düşük sayıda ookistin enfeksiyonu oluşturma yeteneğine sahip olması, ookistlerin uzun süre dış ortamda canlı kalması ve birçok dezenfektana karşı dirençli olması, konaktan atıldığında ookistlerin enfektif özellikte olması, bazı genotipler için hayvanların rezervuar olması ve son olarak konağın bağışıklık sisteminin baskılanmış olması cryptosporidiosis epidemiyolojisini belirleyen faktörlerdir (59).

Birçok çalışmada, HIV pozitif olgularda cryptosporidiosis insidansı ve epidemiyolojisi araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları çok büyük farklılıklar göstermekte; bu durumun, çalışmaların planlanmasına, coğrafik yerleşime, laboratuvar yöntemlerinin duyarlılığına, seçilen çalışma grubundaki farklılıklara ve hastalığın safhasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber ortalama %32'lik oran bildirilmiştir (7).

Araştırma ve yöntemlerdeki farklılıklar nedeni ile sonuçların karşılaştırılması zor olsa da diyarelilerde, az gelişmiş ülkelerde, özellikle 2 yaşın altındaki çocuklarda, beslenme bozukluğu olanlarda, evcil hayvan besleyenlerde, sıcak ve nemli mevsimlerde enfeksiyonun daha sık olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyona yakalanma riskinin bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde CD4 sayısı ile doğru orantılı olduğu, enfeksiyon riskini çeşitli sosyal ve davranışsal faktörlerin de arttırdığı bildirilmiştir. Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, cryptosporidiosisin homoseksüellerde ilaç bağımlılarına göre daha sık görülmesi; ABD'deki benzer bir çalışmada ise, enfeksiyona HIV enfeksiyonunu cinsel yolla alanlarda diğer yollarla alanlara göre daha fazla rastlanması seksüel davranış ile cryptosporidiosisin yakın ilişki içinde olduğunu düşündürmüştür. Diğer bir çalışmada ise köpek sahibi olmanın HIV olgularında enfeksiyon riskini arttırdığı gözlenmiştir (22).

Ülkemizde cryptosporidiosisle ilgili ilk çalışma Özcan ve arkadaşları tarafından yapılmış ve ishali çocuklarda %8.2, ishali olmayan çocuklarda %4.1 olarak saptanmıştır. İstanbul'da 5 yaşın altındaki diyareli 73 çocuğun yalnızca birinde, Ankara'da ise 50 çocuğun 7'sinde (%3.5) *Cryptosporidium* ookistleri saptanırken, Sivas'ta ishali olgularda yapılan iki ayrı çalışmada %19.8 ve %11.8, Antalya'da diyareli çocuklarda %0.97, Eskişehir'de diyareli çocuklarda %3.6, Ankara'da Parazitoloji laboratuvarına başvuran 32.582 kişinin 45'inde

(%0.13), diğerk bir çalışmada da kronik ishallerin %20'sinde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır. Ülkemizde bağışıklığı baskılanmış hasta gruplarında yapılan araştırmalarda řu sonuçlar alınmıştır: Kemoterapi gören ishallerde %17, hemodiyaliz, böbrek transplantasyonu ve çocuk onkoloji olgularında sırasıyla %30.4, %18.8 ve %35.5, kronik böbrek yetmezliklerinde %19.1 oranında cryptosporidiosis saptanmıştır. Bağışıklık sistemi baskılanmış 18 olgunun 7'sinde (%38.8) *Cryptosporidium* ookistlerinin saptandığı bir araştırmada, bu grup içerisinde yer alan 7 AIDS olgusunun tamamı cryptosporidiosis tanısı almıştır (22).

*Cryptosporidium* paraziti Antartika dışında, sıcak iklime sahip bölgelerde daha yaygın olmak üzere tüm dünyada bulunmaktadır. Enfeksiyonun mevsimsel özellik gösterebildiğı, sıcak ve nemli aylarda daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir. Farklı ülkelerde, dışkıda ookistlerin görülmeleriyle belirlenen enfeksiyon insidansının, Avrupa ve Amerika'da %1-3, gelişmekte olan ülkelerde ise %5-10 oranında değıştiğı bildirilmiştir (60).

Finlandiya'da erişkinlerin %9.1'inde, 5 yaşın üzerindeki olguların %2.6'sında *Cryptosporidium* enfeksiyonuna rastlanmıştır. ABD'de yapılan araştırmalarda, Massachusetts, Ohio, New York ve Oregon eyaletlerinde incelenen dışkı örneklerinde %0.3 ile %2.8 arası değışen oranlarda *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır. Başta diyare olmak üzere semptomatik hastalar araştırıldığında İngiltere'de %5.0, Brezilya'da %8.0, Hindistan'da %13.1, Gana'da %12.9, Bangladeş'te farklı iki çalışmada %4.3 ve %3.0, Kosta Rika'da %4.3, Nepal'de diyareli turistlerde %5.0, Zaire'de %30.0 oranında cryptosporidiosis saptandığı bildirilmiştir (22).

Fekal- oral yolla bulaşan *Cryptosporidium* enfeksiyonunun ortaya çıkması için, ookistlerin enfekte insan, hayvan ya da kontamine yüzeylerle yakın temasla veya su ve yiyecekler aracılığıyla alınması gerekmektedir (57).

Deneysel ve epidemiyolojik verilere dayanarak, insanların 10-100 ookist ile enfekte olabileceğı ve primer enfeksiyondan kısa bir süre sonra 100-1000 ookistle reeneksiyonun gelişebileceğı gösterilmiştir (61).

*Cryptosporidium* türlerinin insana bulaşmada evcil hayvanların ve besi hayvanlarının, özellikle buzağuların dışkısının rolü büyüktür (42, 50, 55). Sığırların insan *Cyptosporidium*

enfeksiyonları için rezervuar olabileceği düşünülerek bir çalışma yapılmış ve enfekte sığır dışkısı ile teması olan immun direnci sağlam 12 kişide enfeksiyon geliştiği açıklanmıştır (62). Fare ve sıçanların ağız yoluyla, insan veya sığır kaynaklı ookistlerle enfekte edilebilmesi bu durumu güçlendirir hale gelmiştir (63). Yapılan farklı çalışmalarda insanlardan elde edilen ookistlerin kuzular için patojen olduğu, kedi ve köpek gibi ev hayvanlarının da parazitinin neden olduğu enfeksiyona yatkın oldukları bildirilmiştir (62-64).

İnsanlar arası kontaminasyon fekal-oral veya anal-oral yolla olabilmektedir (55). Özellikle çocuk bakımevlerinde ve hastanelerde ortaya çıkan salgınlar insandan insana bulaşın önemini kanıtlayan en önemli olaylar arasında yer alır (65-68). Günümüzde *Cryptosporidium* bir turist hastalığı etkeni olarak da bilinir (69-71).

Çocukluk dönemi diyarelerinde önemli bir etken olan *Cryptosporidium* insidansının 1-5 yaş arasında pik yaptığı, gelişmiş ülkelerde diyareli çocuklarda %1-3, gelişmekte olan ülkelere ise %4-17 arasında değiştiği belirtilmektedir (72).

Epidemiyolojik çalışmalarda, ishalin endemik olduğu yerlerde su sıklıkla *Cryptosporidium* bulaşmasının en büyük yolu olarak tarif edilmektedir. Çoğu tropikal ülkelere çocuklardaki *Cryptosporidium* enfeksiyonları genellikle yağışlı mevsimlerde pik yapar. Bu bölgelerde cryptosporidiosis oluşmasında en büyük yolun su kaynaklı bulaşma olduğu düşünülür. Endüstrileşmiş ülkelerdeki insan *Cryptosporidium* enfeksiyonunun insidansındaki mevsimsel değişiklikler de su kaynaklı bulaşmayı işaret etmektedir. ABD’de HIV pozitif kişiler arasında cryptosporidiosis sayısında bir yılda meydana gelen iki pik vardır. Bunun biri baharda, diğeri de yaz mevsiminin sonundadır. Genel toplumda da yaz ayı sonunda cryptosporidiosis sporadik olgularında yıllık bir pik görülür. Yazın sonunda görülen cryptosporidiosis olgularının pik yapmasının yüzme ve su sporları gibi eğlence faaliyetlerine bağlı olduğu kabul edilir. Bu da cryptosporidiosis epidemiyolojisinde su kaynaklı bulaşmanın önemli olabileceğini gösterir (73).

Bulaşmaya neden olan ookistler günümüzde kullanılan pek çok dezenfektana, soğuğa, sıcağa ve neme dirençli yapı gösterirler. Yapılan çalışmalar bu ookistlerin %10’luk formolde veya %50 derişik amonyak gibi kimyasal solüsyonlarda 30 dakika içinde, ayrıca 60 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda veya -20 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletmekle inaktive oldukları bildirilmiştir (74).

ABD’de bir kaynak suyundan 400.000 kişi enfekte olmuştur. Su kaynaklı epidemi nedenleri arasında; parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, klora dirençli olması ve çok az sayıda parazitin dahi enfeksiyona neden olabilmesi gösterilmektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve cryptosporidiosis vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından salgın şeklinde geliştiği bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Cryptosporidium* ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25 °C ve pH 7.0’de 2 saat içinde öldüğü kanıtlanmıştır. Su dezenfeksiyonunda kullanılan diğer bir yöntem olan ozonlama işleminin *Cryptosporidium* ookistleri üzerine etkisi araştırılmış, enfektivitelerinin 1 ppm konsantrasyonda 10 dakika sonra ortadan kalktığı gözlenmiştir. *Cryptosporidium* ookistlerinin aynı şartlarda, *Giardia* kistlerine göre ozona 30 kat, klora ise 14 kat daha fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dezenfektanlarla yapılan çalışmalar sonucunda, sulardaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun klor ya da klordioksitten daha etkili bir dezenfektan olduğu bildirilmiştir (75).

## 2. 5. Patogenezi

Bağışıklık sistemi sağlam olan konaklarda *Cryptosporidium parvum*’un sıklıkla terminal jejunum ve ileumda, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ise mide, duodenum, kolon, bilier ve pankreatik kanallar ve solunum sisteminde yerleşerek enfeksiyona neden olabileceği bildirilmiştir (36, 76).

Cryptosporidiosisin klinik belirtileri anatomik yerleşimiyle paralellik göstermektedir. *Cryptosporidium parvum* primer olarak intestinal sisteme yerleştiğinden, en sık rastlanan belirti diyaredir. *Cryptosporidium* enfeksiyonunun neden olduğu diyarenin fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. *Cryptosporidium parvum* ile enfekte edilen sığırlarla yapılan bir araştırmanın sonuçları, diyarenin ince bağırsaklardaki emilim bozukluğu ve sindirim bozukluğunun yanı sıra kalın bağırsaktaki malabsorbsiyon olduğunu düşündürmüştür. Bağışıklığı baskılanmış kişilerde sık görülen ve kolera benzeri olarak tanımlanan diyare, bağırsakta toksinlerin yol açtığı bir aşırı salgılanmayı düşündürse de böyle

bir toksin bulunamamıştır. Domuzların enfekte edilmesi ile yapılan bir çalışmada, en şiddetli morfolojik değişikliklerin inokülasyonun üçüncü gününde ileumda görülen villöz atrofi, kript hiperplazisi ve hücrel infiltrasyon olduğu, ortaya çıkan malabsorbsiyon tablosunun morfolojik yıkımla ilişkisi bulunduğu ve viral enfeksiyonlardaki tabloya benzediği bildirilmiştir. Kalın bağırsak epitel hücreleri ile yapılan bir in vitro çalışmada, epitelyum hücre bariyer bütünlüğünün bozulmasının, yalnızca iyon akışı ile sonuçlanan hücrelerarası kanalların açılmasına yol açmadığı, aynı zamanda *Cryptosporidium parvum* ookistlerinin bağırsak epiteli üzerindeki etkilerden sorumlu olduğunu ortaya çıkarmış bulunmaktadır (22).

*Cryptosporidium* enfeksiyonunda görülen diyarenin nedenleri arasında ince bağırsaklardaki enterositlerin ağır hasarı veya ölümü, villus atrofisi ve lamina propiadaki hücrel enflamasyon rol oynamaktadır. Enfekte epitel hücrelerinden sitokinler; Tümör Nekrozis Faktör- alfa (TNF- $\alpha$ ), İnterlökin 1 (IL1) ve İnterlökin 8 (IL8) salgılanarak enflamatuar ve bağışıklık sistem hücreleri bu bölgede toplanmaktadır. Epitel hücrelerinden prostoglandin E2 (PGE2), enflamasyon hücrelerinden substance P gibi nöropeptidler salınır. Sonuç olarak sodyum (Na) emiliminde azalma, epitelyal permeabilitesinde ve klor (Cl) sekresyonunda artış nedeniyle diyare ortaya çıkmaktadır (59).

Prostoglandinler Na azalmasına aracılık ederken Cl sekresyonunu, TNF- $\alpha$  ise prostoglandinlerin üretimini uyarırlar. Bununla beraber kronik cryptosporidiosisli AIDS olgularında serum sitokin düzeyleri ile semptomlar arasında bir korelasyon saptanmazken, prostoglandin inhibitörlerinin cryptosporidiosis semptomlarını ortadan kaldırmada etkili olamadığı bildirilmiştir. Robinson ve arkadaşları kronik cryptosporidiosisli AIDS olgularında ve *Cryptosporidium parvum* ile enfekte gönüllülerde diyarenin şiddeti ve durumu ile nöropeptid substance P arasındaki korelasyonu göstermişlerdir (77). Benzer şekilde farelerde, nöropeptid substance P inhibitörlerinin *Cryptosporidium parvum*'a bağlı bağırsaktaki yangıya karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (78). Örneğin nöropeptid substance P antagonisti olan octreotid, kronik cryptosporidiosiste daireyi kısmen azaltır.

*Cryptosporidium parvum*'la ilişkili apoptotik epitelyal hücre ölümü, intestinal epitelyal hücre kültürlerinde saptanmış olup bazı klinik bulgularla desteklenmiştir. *Cryptosporidium parvum*'un kompleks bir virulans kapasitesi olduğu bilinmektedir. Epitel hücrelerine tutunarak, enfekte olmayan komşu hücrelerde apoptozis yoluyla epitel



hücrelerinin absorpsiyon ve sekresyon özelliklerini bozduğu ileri sürülmektedir. AIDS’li hastalarda sinerjistik bir patolojik etkinin ortaya çıktığı düşünülmektedir. HIV-1 virusuyla enfekte T hücre ve makrofajlardan salınan “HIV-1 tat proteini”nin *Cryptosporidium* ile ilişkili apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (79).

İnsan ilioçekal ve kolonik adenokarsinom hücre kültürlerinde görülen ve 24. saatte en üst seviyeye ulaşan apoptozis *Cryptosporidium parvum* tarafından sınırlandırılabilir. Parazit bu eylemi ile enfeksiyonun erken döneminde kendi büyüme ve olgunlaşması için gerekli olan konak hücrenin süregenliğini sağlamayı hedeflemektedir. Kaldı ki apoptozis, enfekte hücrenin kendini ölüme taşıyarak enfeksiyonun ilerlemesi durumundan ve olası bazı diğer komplikasyonlardan vücudu koruma çabasından başka bir şey değildir (80).

*Cryptosporidium* oookistlerinin gastrik epitel, özofagus ve appendiks gibi organlara yerleşim göstererek atipik gastrointestinal enfeksiyona yol açtığı gösterilmiştir. AIDS olgularında cryptosporidiosis komplikasyonu olarak nadiren pneumatosis cystoides intestinalis adı verilen yapılar ortaya çıkabilmektedir. Bunlar ince bağırsak duvarına yerleşen gaz içeren ince cidarlı bir duvara sahip oluşumlardır; yırtıldıklarında pneumoretroperitonit veya pneumomediastenium tabloları gelişebilmektedir (22).

## **2. 6. İmmunolojik ve Antijenik Yapısı**

### **2. 6. 1. İmmun Sistemi Sağlam Konaklarda Hümorale ve Hücrele İmmun Yanıt**

*Cryptosporidium parvum*, hücre içi yerleştiği için immunitede antikorların rolü tartışmalıdır. Antikorlar luminal olarak konak hücreyle *Cryptosporidium parvum*’un ilişkisini bloke edebilirler. Tutunma ve / veya invazyonu önleyerek bu blokajı yapabilirler. Bu etki; kompleman aktivasyonu, lizis veya opsonofagositoz, Fc (Fragment crystallizable) reseptörlerine bağlanma, antikora bağlı hücrele sitotoksosite gibi efektör mekanizmalarla kolaylaşabilmektedir. *Cryptosporidium parvum*’a karşı oluşan antikorlar, kısmen hücre içi de

etkili olabilirler. Özellikle salgısal immunglobulin A (IgA)'nın transepitelyal transportu sırasında patojenin nötralize olabileceği ileri sürülmüştür. *Cryptosporidium parvum*'un biyokimyasal kompozisyonu komplekstir. Hümorale cevapta karbonhidrat, lipid, glikoprotein ve diğer glikokonjugatlar tanınır. Bunların bir kısmı nötralizan antikorlar için önemli hedeflerdir. *Cryptosporidium parvum*'a karşı antikorlar enfekte konağın kolostrum ve kanında saptanabilmiştir. Ookist atılımındaki azalmanın 23-27 kilodalton (kDa) ve 15-17 kDa'luk antijenlere karşı oluşan antikorlarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. 27 kDa'luk antijenin serum immunglobulin G (IgG), 15 kDa'luk antijenin ise tükrükteki IgA antikorlarıyla güçlü reaksiyon verdiği saptanmıştır. İmmün sistemi sağlam kişilerde daha önce *Cryptosporidium parvum*'la karşılaşmış olmak tam koruyuculuk sağlamamaktadır. Ancak hastalık şiddetini ve atılan ookist sayısını azaltabileceği ileri sürülmüştür (25).

Cryptosporidiosisde doğal immün cevapta enterositler aktive olur, proinflamatuvar sitokinler ve defensinler gibi antimikrobiyal peptitler oluşur. Örneğin TNF- $\alpha$ , enterositlerde *Cryptosporidium parvum*'un konak hücreye invazyonunu önleyici etki gösterebilmektedir (81, 82).

Doğal immün cevap, başlangıçta parazit sayısını kısıtlasa da enfeksiyonun tam olarak temizlenmesinde T hücre cevabı gerekmektedir. Özellikle CD4 T lenfositleri, özelleşmiş hücre yüzey proteinleri (MHC sınıf II, CD40-CD154) *Cryptosporidium parvum*'a karşı koruyucu immunitede önemlidir. CD8 T hücrelerinin rolü ise kısıtlıdır. *Cryptosporidium parvum*'un parazitofor vakuoldeki yerleşimi, sporozoit antijenlerinin MHC sınıf I yoluna girmesini engeller. Primer enfeksiyon sırasında major T hücre popülasyonları villuslarda artar, enfeksiyondan sonra normal seviyelerine döner. Luminal parazit antijenleri M hücrelerince alınarak Peyer plakları ve intestinal yolun lenfoid folliküllerinde lokalize olan CD4 T hücrelere sunulurlar. Aktive olan T hücreleri lamina propria veya intestinal epitelyuma göç ederler. *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunu takiben intestinal dokuda sitokin profili değişir. Bulgulara göre *Cryptosporidium parvum*'a karşı intestinal immün cevapta çoklu sitokinlerin sıralı ekspresyonu söz konusudur. Temel sitokinler IFN- $\gamma$  ve IL-12'dir (83, 84).

Aktive T hücrelerinin eksprese ettiği CD154 (CD40L) ve antijen sunucu hücrelerin eksprese ettiği CD40 ilişkisi, *Cryptosporidium parvum*'a karşı koruyucu immunitenin

gelişmesinde temel immunoregülatör rol oynar. Örneğin CD40 sinyali, IL-12 ve IFN- $\gamma$  yapımını stimüle eder, T hücre cevabını uyarır, infekte hücrelerin apoptozisini tetikler.

IFN- $\gamma$ , T hücre yoluyla *Cryptosporidium parvum*'un eliminasyonunda kritik rol oynayan bir stokindir. Parazitin konak hücreye invazyonunu inhibe edebilir. İntestinal epitelyum ve lamina propriadaki makrofaj ve lenfositleri aktive eder. Bu hücreler parazitin temizlenmesinde efektör fonksiyon gösterirler. IFN- $\gamma$ , doğal öldürücü hüce (NK) cevabı için de önemlidir.

$\gamma\delta$  T hücre reseptörü (TCR) taşıyan T hücreleri *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunda erken primer cevapta rol alarak, minor koruyucu rol oynarlar. Primer enfeksiyon sırasında  $\gamma\delta$  TCR taşıyan T hücre cevabı hızlı ve geçicidir. Bu hücreler deri ve bağırsakta dokuların girişinde yerleşirler.  $\alpha\beta$  TCR taşıyan T hücreleri ise enfeksiyonun temizlenmesinde önemlidirler. Bu T hücreleri ( $\alpha\beta$  TCR) IFN- $\gamma$ 'nın kaynağıdır (25).

Cryptosporidiosis enfeksiyonu sırasında hem Th1 hem Th2 cevabı oluşabildiği gözlenmiştir. Sadece Th2 hücrelerin sitokinlerinin *Cryptosporidium parvum*'un temizlenmesinde etkili olmadığı saptanmıştır (85).

Th<sub>2</sub> sitokinlerinden IL-4, IFN  $\gamma$  ile sinerjistik etki göstererek *Cryptosporidium parvum* üremesini inhibe eder. IL-4 ayrıca salgısal IgA yapımını da stimüle edebilir. IL-12, Th1 cevabını yönlendiren anahtar regülatör sitokindir. İmmunitede temel rol oynar. İnfeksiyonun geç dönemlerinde (21. gün) iyileşme sırasında IL-10 yapımında artış saptanmış ancak rolü tam açıklığa kavuşmamıştır (25).

İmmun sistemi sağlam erişkinlerde *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunun rezolüsyonu IL-15 yapımı ile de ilişkili bulunmuştur. IL-15 eksprese eden gönüllülerin daha az ookist çıkarttıkları gözlenmiştir. IL-15 antijen sunucu hücrelerce sitokin ekspresyonunun ve intestinal epitelyal hücrelerce kemokin yapımının regülasyonunda rol alır. IL15'e bağlı NK hücre aktivasyonu, insanlarda cryptosporidiosisin iyileşmesinde kritik rol oynar. Ayrıca CD8 T hücrelerin sitotoksik aktivitesi de IL-15 ile artabilmektedir (86). Epitelyal hücrelerin oluşturduğu IL-18 koruyucu Th1 cevabında önemli rol oynar. IL-18 pro inflamatuvar etkisinin yanı sıra (IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  yapımındaki artış) konak parazit ilişkisinin erken döneminde önemlidir. IL-18'e bağlı olarak bazı epitelyal bakterisidal ajanlarda artış olabilir. Bu artış

konak immunitesinde önemlidir. IL-18'in IFN- $\gamma$  yapımını indükleyici etkisi de söz konusudur (87).

## **2. 6. 2. İmmun Sistemi Baskılanmış Konaklarda Humoral ve Hücreyel İmmun Yanıt**

İmmun sistemi baskılanmış kişilerde *Cryptosporidium parvum*'un 27 kDa'luk antijenine karşı güçlü bir serolojik cevap olduğunda diyare ve kilo kaybı riskinde azalma gözlenmiştir. Su kaynaklı bulaşlarda az sayıda ookist alan kişilerde oluşan serolojik yanıt daha güçlüdür. HIV pozitif hastalarda yaş ilerledikçe oluşabilecek immunité nedeniyle enfeksiyon riskinin azalacağı ileri sürülmektedir (88).

HIV pozitiflerde cryptosporidiosis sırasında immunglobulin M (IgM), kronik enfeksiyonlarda IgG türü antikorlar oluşsa da immunolojik korumada özgül antikor cevabının rolü fazla değildir (89, 90). Serum ve / veya mukozal IgG, IgM ve IgA antikorları olan AIDS'li hastalarda persistan cryptosporidiosis gözlenmiştir. Fekal IgA cevabı esas olarak IgA1 alt grubundandır. Polipeptit ve glikoproteinlere karşı oluşur. HIV seropozitif ve cryptosporidiosisi temizlenmiş kişilerde özgül salgısal IgA, AIDS ve kronik cryptosporidiosisi olan kişilere göre daha yüksak bulunmuştur (25).

Özellikle AIDS'li hastalarda CD4 hücre sayısı immün sistemin mukozal yüzeyde *Cryptosporidium* enfeksiyonunu temizleme yeteneği için en iyi göstergedir. CD4 hücre sayısı 180 hücre/milimetre küp ( $\text{mm}^3$ )'ten yüksek olan kişilerde enfeksiyon spontan olarak temizlenebilirken 180 hücre/ $\text{mm}^3$ 'ten az olanlarda %87 oranında persistan hastalık oluşur. CD4 hücre sayısının 50 hücre/ $\text{mm}^3$ 'ün altında olduğu durumlarda ölüm riski vardır (14, 76).

AIDS'te antiretroviral tedavi ile CD4 hücre sayısı düzeldiğinde inflamasyonun potent mediatörü olan bazı kemokinlerin yapımında (CXCL-10 gibi) azalma görülür. Bu durumda intestinal mukozada inflamatuvar cevap azalır, kronik diyarede düzelme gözlenebilir (91).

AIDS'te kolonik cryptosporidiosis'te lamina propria T hücreleri sitotoksik mekanizmada yer alırlar. CD8 T hücreleri granzim B ekspresyone ederek apoptozisi indüklerler. İmmun sistemi baskılanmış kişilerdeki cryptosporidiosis'te IFN- $\gamma$  ve anti inflamatuvar sitokinlerden IL-10'daki paralel artış bu iki sitokin arasında bir denge olduğuna işaret eder (25).

## **2. 7. Cryptosporidiosis'in Klinik Şekilleri ve Klinik Belirtileri**

*Cryptosporidium* spp.'nin bağışıklık sistemi sağlam bireylerde sıklıkla terminal jejunum ve ileuma, bağışıklık sistemi baskılanmış grupta akciğerlere, özofagus, mide, karaciğer, pankreas, safra kesesi, apendiks, düodenum, kolon, rektum, orta kulak ve konjonktivada da bulunabileceği ve klinik belirtilerin yerleştiği organlara göre ortaya çıktığı bildirilmiştir (14, 20, 76).

Cryptosporidiosis, intestinal, respiratuvar, hepatobilier ve pankreatik cryptosporidiosis olmak üzere dört farklı klinik tablo ile karşımıza çıkabilir (61):

### **2. 7. 1. İntestinal Cryptosporidiosis**

Dört farklı klinik tablo görülebilmektedir.

Asemptomatik taşıyıcılar: özellikle salgınlarda bulaştan sorumlu olduğu düşünülen bu klinik tablodaki olgularda hiçbir klinik belirti gözlenmez. Asemptomatik taşıyıcılık oranı HIV pozitif olgularda normal toplumdan daha yüksektir. Akut sınırlı enfeksiyon: Bağışık sistemi sağlam olan kişilerde daha yaygın görülen bu klinik tablonun, kuluçka dönemi ortalama 6 (2-30 gün) gün olarak belirtilmektedir. En sık görülen semptom bol ve sulu, mukuslu olabilen, çok nadiren kan veya lökositlerin de bulunabildiği diyaredir. Bağırsak hareketlerinde artış, hızlı kilo kaybı ve dehidratasyona neden olabilmektedir. Karın ağrısı, anoreksia, hafif ateş (39

°C'nin altında), bulantı, kusma, başağrısı, halsizlik, orta dereceli malabsorbsiyon en çok gözlenen belirtilerdir. Klinik belirtiler birkaç gün ile birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebilmektedir. CD4 sayısı 200 hücre/mm<sup>3</sup>'ten fazla olan HIV pozitif olgularda bu klinik şekil gözlenebilmektedir. Kronik enfeksiyon: Daha çok malnütrisyonlu çocuklarda ve AIDS olgularında başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış grupta görülen klinik tablodur. Olguların %85'inde dirençli diyare, %100'ünde kilo kaybı ve malnütrisyon gözlenmektedir. Fulminant enfeksiyon: AIDS hastalarında ve kemoterapi ile bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. En belirgin özelliği kolera benzeri klinik tablo oluşturmakta ve çok yüksek mortalite ile karakterize olmaktadır. Hipovolemi ve şoka neden olabilmekte, bu nedenle tedavide öncelikle sıvı elektrolit dengesinin sağlanması önerilmektedir.

### **2. 7. 2. Respiratuar Cryptosporidiosis:**

Normal toplumda özellikle çocuk yaş grubunda görülen geçici bir enfeksiyon olup olguların çoğunda diyare bulunmaktadır.

Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde yaygın olarak görülen bu klinik tablo şiddetli-dirençli öksürük, krup, wheezing, ses kısıklığı, ateş, trakeal sekresyon ve solunum güçlüğü ile karakterizedir. Özellikle AIDS olguları başta olmak üzere malign lenfoma ve kemik iliği transplant olguları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde öldürücü solunum sistemi tabloları daha çok görülmektedir.

### **2. 7. 3. Hepatobiliyer Cryptosporidiosis:**

Genellikle AIDS'li ve kronik cryptosporidiosis'li hastalarda gelişen safra kesesi ve safra yolları epitelinin tutulumu, taşsız kolesistit veya sklerozan kolanjit tablosuyla ortaya çıkmaktadır. En sık gözlenen belirtiler ateş, sağ üst kadranda ağrı ve duyarlılık, bulantı,

kusma, nadiren diyare ve sarılıktır. AIDS olgularında intestinal enfeksiyonların tekrarı (dirençli cryptosporidiosis) veya paramomisin gibi intraluminal ajanlarla sağaltım biliyer enfeksiyon için risk oluşturmaktadır.

#### **2. 7. 4. Pankreatik Cryptosporidiosis:**

Pankreatik kanalların kolonizasyonu ile gelişen ve genellikle AIDS'li hastalar başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde gözlenen bu klinik tablo sıklıkla hepatobiliyer cryptosporidiosis eşlik eder (22).

Gerek bağışıklığı sağlam, gerekse bağışıklığı baskılanmış bireylerde cryptosporidiosis diyare ile kendini gösteren bir enfeksiyondur. Non inflamatuvar özellikteki diyare karakteristik olarak bol ve sulu olup mukus içerebilmekte ancak dışkıda kan ve lökosit nadiren bulunmaktadır. Bu tabloya sıklıkla kilo kaybı da eşlik etmektedir. Daha az sıklıkla rastlanan diğer klinik belirtiler karın ağrısı, bulantı, kusma ve 39 °C altında ateş, bazen halsizlik, baş ağrısı gibi özgül olmayan belirtilerdir (9, 10, 11, 12).

Belirtilerin şiddeti kişiden kişiye değişebilmekte ve sıklıkla atılan ookist miktarı ile paralellik göstermektedir. Klinik semptomların şiddeti ve süresi konağın yaş ve bağışıklık sisteminin durumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. AIDS hastalarında daha sık olarak uzun süren ve yaşamı tehdit eden enfeksiyon, bağışıklığı sağlam bireylerde kısa sürmekte ve kendiliğinden tamamen iyileşme ile sonuçlanmaktadır (10, 12).

İnsanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun kuluçka dönemi 2 ile 14 gün arasında değişmektedir. Bağışıklığı sağlam bireylerde bildirilen ilk cryptosporidiosis olgularında ve son zamanlarda saptanan çok sayıda olguda en sık belirtiler bol ve sulu, koleraya benzeyen diyare, karın ağrısı, bulantı, kusma, hafif ateş ve baş ağrısıdır. Normal bireylerde diyare genellikle 3-12 gün arasında kendiliğinden geçerken, malnütrisyonlu çocuklarda aşırı sıvı kaybı sonucunda üç haftadan daha uzun süreli oral ve parenteral rehidratasyona gereksinim olabilmektedir (22).

Gelişmekte olan ülkelerde en sık rastlanılan cryptosporidiosis kliniği, çocukluk çağı ishalleridir. Asya, Afrika ve Latin Amerika'da yapılan çalışmalar diyareli çocuklarda cryptosporidiosis sıklığının %5-10 arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Akut hastalık, sulu diyare, abdominal ağrı ve kramp ile karakterizedir. Hastaların çoğunluğu hızlı bir şekilde iyileşirken az bir kısmında hastalık 14 güne kadar uzamaktadır. *Cryptosporidium* spp. , gelişmekte olan ülkelerdeki önemli kronik ishal nedenlerindedir. Gelişmekte olan ülkelerdeki çocukluk çağı ishallerinde yapılan çalışmalarda malnütrisyon ile cryptosporidiosis ilişkili bulunmuştur. Cryptosporidiosis malnütrisyonlu çocuklarda çok ciddi seyretmektedir. Ölümlerin çoğu malnütrisyonlu çocuklarda görülmektedir (42, 92).

Bağırsak cryptosporidiosisinin direnci, şiddeti ve prognozu hastanın bağışıklık durumu ile yakın ilişki göstermektedir. AIDS gibi bağışıklığın en fazla baskılandığı durumlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonuna bağlı diyare zamanla ağırlaşarak ölüme yol açan en önemli unsur haline gelebilmektedir. Bağışık direncin aşırı düştüğü durumlarda zamanla gastrointestinal mukozanın büyük bir bölümünün parazitlerle kaplandığı, buna bağlı olarak malabsorbsiyon geliştiği, sıvı kaybının bir erişkinde günde 10 litreye, 14 aylık bir çocukta 5 litreye kadar yükselebildiği bildirilmiştir.

Bağışıklığı baskılanmış olan kişilerde hastalığın süresi ve şiddeti hastanın bağışıklığının normale dönme yeteneğine bağlı olabilmektedir. Burada söz konusu olan hastalar özellikle kanser ve transplantasyon nedeniyle bağışıklığı baskılayan ilaç kullananlar, özellikle çocuklarda beslenme bozukluğu olanlar, kızamık veya cytomegalovirus enfeksiyonu gibi viral enfeksiyonu bulunan kişilerdir.

Bağışıklığı baskılanmış hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları gastrointestinal sistemle sınırlı kalmayabilmekte, safra kesesi ve safra yollarını tutarak ateş, bulantı kusma, sağ üst kadranda ağrıya, pankreas kanallarını tutarak karın ağrısı, asit, amilaz yüksekliği ve pankreasta büyüklüğe, solunum sistemini tutarak laringotrakeit, sinüzit, nonspesifik belirtilere ve eklemleri tutarak ağrı yakınmalarına da neden olabilmektedir (22).



## 2. 8. Tanısı

Başlangıçta cryptosporidiosis tanısı bağırsak biyopsilerinde *Cryptosporidium parvum*'un gelişim evrelerinin gösterilmesiyle konulmuş ve parazitlerin intrasellüler-ekstrastoplazmik olarak yerleştiği açığa çıkmıştır. Fakat dışkı, balgam ve safra örneklerinde *Cryptosporidium parvum* ookistlerini saptamaya yönelik daha gelişmiş yöntemlerin ortaya çıkışıyla, invaziv, pahalı ve uzun sürede sonuç alınan biyopsi yöntemleri tanıda tercih sebebi olmaktan çıkmıştır (12, 14, 50, 94). Ayrıca teşhis amacıyla kullanılan ince bağırsak aspiratı, bronkoalveolar lavaj ve şüpheli dokuların biyopsisi gibi yöntemlerin duyarlılığı araştırmacılar arasında tartışma sebebi olmuştur (47, 93).

Enfekte konaktan etkenin tespitinde dışkı boyama, immun floresan antikor (IFA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), PCR ve flow sitometri gibi tekniklerden yararlanılabilse de rutin klinik laboratuvarlarında hastalığın tanısında dışkı taraması ve etkenin mikroskopta görülmesi esastır (47, 95).

### 2. 8. 1. Direkt Yöntemler

Cryptosporidiosisite teşhis için en uygun ve kolay tekniğin, günümüz itibariyle ve özellikle de klinik kullanım alanı dikkate alındığında dışkı taraması olduğu bildirilmiştir (96).

Hastalıkta ookist atılımı çoğunlukla intermittan bir özellik taşıdığından teşhis için farklı zamanlarda, çok sayıda dışkı almak gerekebilir (47). Ayrıca etken atılımının bol olduğu sulu dışkılarda ookistlerin çoğu mukus içinde saklı kalabilmekte şekilli ve az mukuslu dışkılarda ise etken atımı düzensiz veya yetersiz olmaktadır (52). Genel tanı kuralları açısından alınan materyalin taze olması gerekir (47).

Dışkının makroskobik bakışı hastalık için şüphe uyandırıcı olabilir ancak cryptosporidiosisise spesifik önemli bir görünüm söz konusu değildir. Dışkıda kan olması

hastalık için çok ender bir bulgu olup genellikle birlikte seyreden başka bir enteropatojen ile bağlantılıdır. İrin için de benzer şeyleri söyleyebilmek mümkündür (47). Ancak cryptosporidiosisli bireylerin dışkı taramasında %75 oranında lökositte rastlandığı da bildirilmiştir (97). Cryptosporidiosis ishallerinde mukusa sık olarak rastlanabilmekte ve incelemek üzere alınan örneğin mukuslu kısımlardan seçilmesinin daha uygun olabileceği ifade edilmektedir (98).

Alınan taze dışkılar laboratuarda direkt incelenebileceği gibi uygun koşullarda uzun süre de saklanabilir (48). Yapılan incelemelerde ookistlerin canlılığını koruyabilmeleri açısından en uygun ısı aralığının sulu ortamda 4-23 °C olduğu görülmüştür. Bu ısının yükselmesi durumunda artışa paralel olarak protozoonun canlılık oranı da düşmektedir (99).

Toplanan dışkılar taze olarak pH'sı 7,2 olan 0,15 M phosphate buffered saline (PBS) solüsyonu içinde (100), %2,5'lik potasyum dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ), %10'luk formalin, sodyum asetoasetik asit-formalin (SAF) veya merkürük klorit solüsyonları içerisinde muhafaza edilebilir (43). %2,5'lik  $K_2Cr_2O_7$  solüsyonu içerisinde +4 °C'de muhafaza edilen ookistlerin önemli bir kısmı 3 aydan uzun bir süre canlılıklarını korurken kimi etkenlerin 12 ay kadar da enfektivitelerini devam ettirebildikleri görülmüştür (48). Aynı zamanda bu tip ortamlarda tutulan ookistlerin 12 aydan fazla bir süre deoksiribo nükleik asit (DNA) ekstraksiyonu maksadı ile kullanılabilirliği de ifade edilmiştir (101). Ancak %2,5'lik  $K_2Cr_2O_7$  solüsyonunda saklanan ve daima canlılığını kaybetmeyen ookistlerin enfeksiyon riski taşımaları sebebiyle çalışmalar süresince dikkatli olunması gerekmektedir. Toplanan dışkıların %10 formol solüsyonunda ise +4 °C'de veya -30 °C'de uzun süre saklanabilmeleri mümkündür. Ancak standart %10 formol fiksasyonunun uzun süreli olması etkenin PCR yöntemiyle tanısını olumsuz yönde etkilemektedir. Ookist içeren dışkıların saklanmasında penicillin, streptomycin, fungizone, mycostatin gibi antimikrobiyal ajan içeren Hank's dengeli tuz solüsyonu gibi koruyucuların kullanımı önerilmektedir (48).

Enfekte konakların dışkıları ile çoğu kez teşhis için yeterli olabilecek miktarda ookist atılmakta olup genelde konsantrasyon tekniklerine gerek duyulmamaktadır. Bununla birlikte etkenin düşük yoğunlukta atıldığı asemptomatik konaklar, epidemiyolojik taramalar ve su ve bunun gibi çevresel kaynaklardan etken izolasyonu için ön bir etken yoğunlaştırma işlemine ihtiyaç duyulabilmektedir. İncelenen materyalde bulunan PCR antagonistlerinin

uzaklaştırılması çeşitli konsantrasyon teknikleri sayesinde az ya da çok mümkün olabilmektedir (47, 99). Örnekten etken konsantrasyon yapmak amacıyla geliştirilen yöntemler arasında; formaol-eter ve formol etil asetat sedimantasyon yöntemleri, Sheather'in yüzdürme yöntemi, Percoll-sukroz yöntemi, doymuş çinko sülfat ve doymuş sodyum klorür yüzdürme teknikleri, demir III sülfat flotasyonu, dializ ile purifikasyon, cam çubuk-sütun purifikasyonu ve immunomagnetik separasyon yöntemi sayılabilir. Formol-eter ve formol-etil asetat sedimantasyon teknikleri ile Sheather'in yüzdürme yöntemi en çok kullanılan konsantrasyon yöntemleri arasındadır. Çöktürme yöntemi yapılırken diğer parazitler için kullanılan santrifüj hızı, *Cryptosporidium*'un küçük yapılı ookistleri için yeterli olmayabileceğinden *Cryptosporidium* aranacağı zaman 1000-1500 ) rpm (revolutions per minute)'de 5 dakika santrifüj yapılması gerekmektedir (43, 47, 94, 99, 102, 103).

Toplanan dışkı örnekleri, serum fizyolojik ile karıştırılıp direkt taze preparat halinde x10, x40 objektiflerde incelenebilmektedir. Taze veya yüzdürme yöntemi ile zenginleştirilmiş dışkı örnekleri faz kontrast veya differensiyel interferens kontrast ile nativ olarak tarandığında ookistlerin tespiti mümkün olmaktadır. Tespit esnasında amaca ve tekniğe göre ısı, alkol veya diğer teknikler de kullanılabilir. Genel olarak parazitin ookistlerinin mikroskopik inceleme esnasında mayalarla benzerlik göstermesi sebebiyle, hazırlanan boyasız preparatlarda tanınım yapılması zorlaşmaktadır. Dolayısı ile tanı preparatlarının boyama yapılarak incelenmesi tanınım yapılmasını kolaylaştırıcı rol oynamaktadır. Diğer pek çok parazitin boyanmasında kullanılan hematoksilen, trikrom demir hematoksilen, polivinil alkol gibi boyama teknikleri *Cryptosporidium* tanısında kullanılmamaktadır. Kimi araştırmacılar iodin ile yapılan boyamanın basit, kolay olması açısından bir ön teşhis yöntemi olarak kullanılabileceğini belirtmiş olsalar da genel olarak lügol ile boyanan preparatlarda ookistlerin iyi bir şekilde tespit edilemeyeceği bildirilmektedir. Bundan dolayı tespit için ayırt edici bazı boya yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu yöntemler arasında Kinyoun asit-fast boyama yöntemi, modifiye asit-fast sıcak boyama yöntemi, floresan boyama (auramin-rhodamine (AR), acridine orange (AO), auramin-fenol floresans, auramin-karbol fuksin), giemsa ve safranin-metilen mavisi, nigrosin ve karbol fuksin boyama yöntemleri sayılabilir (43, 47, 48, 104-108).

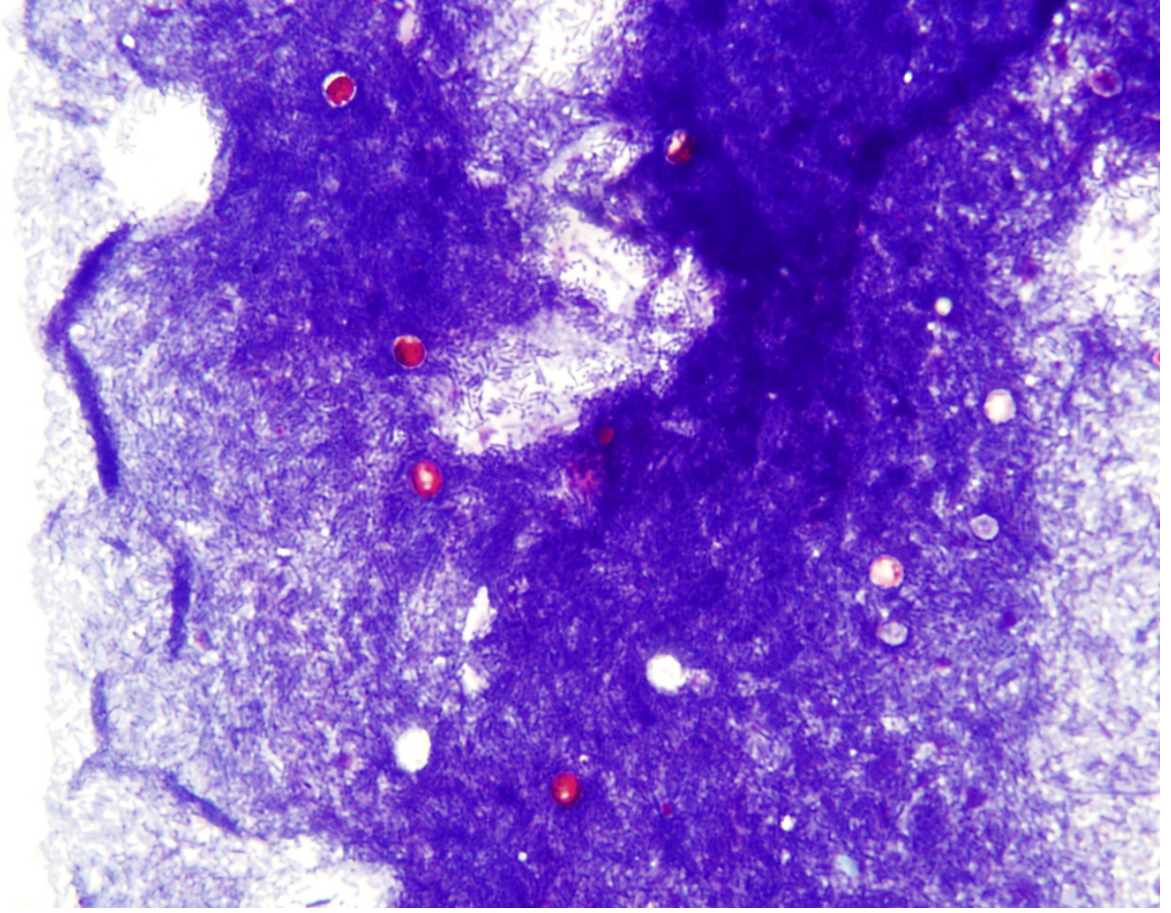
Ookistler, hacim yapıları ve morfolojik özellikleri açısından maya hücreleri, fungal sporlar ve yağ globülleri ile benzerlik gösterirler. Bu yapıları ookistlerden ayırmak amacıyla

günümüzde en sık kullanılan güvenilir, spesifik ve tanısal değeri en yüksek olan metod asit-fast boyama metodudur (94, 105, 106, 109). Bu boyama yöntemi hem taze dışkılarına hem de %2,5'lik  $K_2Cr_2O_7$  veya %10'luk formol eklenerek oda ısısında saklanan dışkılarına uygulanabilir özelliktedir. Dolayısı ile asit-fast boyalarının kullanımının kolay olması, saklanmış dışkıları boyaması, ucuz olması, kırmızı boyanan ookistleri mavi zemin üzerinde kolay bir şekilde göstermesi, ookistlerin iç yapısını ayrıntılı göstermesi ve kalıcı bir boya olması nedeniyle *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde bu boyama yönteminin kullanılması uygun bulunmuştur (103, 109). Bu teknikler her ne kadar sık kullanım düzeyine sahip olsalar da sensitivite ve spesifiteleri düşüktür (14). Asit-fast ile boyanan preparatlarda *Cryptosporidium* ve *Cyclospora* ookistlerini (8-10  $\mu$ m) birbirinden ayırmak gerekir. Bu noktada etkenlerin büyüklük ve şekil farklılıklarından yararlanılabilmektedir (47). Yine tespit işlemlerine bağlı olarak küçülen *Hymenolepis diminuta* da kırmızı renk aldığından dolayı ookistlerle karıştırılabilir (110).

Modifiye Ziehl Neelsen tekniği ile boyanmış preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yeşil zemin üzerinde kırmızı-pembe bir renkte görünür. Ookistin seçilemeyen iç kısmı, etkenin yüzeyine göre daha koyu boyanır. Mantar sporları, bakteriler, dışkı kalıntıları ve diğer asit-fast özellik taşımayan yapılar mavi renkte görülür. Ancak bazı bakteri sporları ve kimi diğer organizmalar ookistlerle karışabilmektedir. Ayrıca boyama işleminin özellikle karbol fuksin fazına bağlı olarak kimi etkenler yeteri kadar boya almamakta veya yapıları bozulabilmektedir. Cryptosporidiosisin tanısında modifiye Ziehl Neelsen tekniğinin uygun bir yöntem olduğu ve boyama sırasında iyi bir dekolizasyon işleminin şart olduğu vurgulanmıştır. Kinyoun asit-fast boyamada, ookistler kolay tanınabilecek şekilde koyu kırmızı-pembe bir renkte boyanırken maya ve diğer doku artıkları boya almazlar. Soğuk kinyoun boyamada da yine benzer bir tablo söz konusudur ve ookistleri mavi zemin üzerinde parlak kırmızı, heterojen boyanmış olarak görmek mümkündür (96, 111-115) (Şekil 3).

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

Karbol fuksin boyamada ookistler şiddetli ışık kırıcı özellikte, düzgün duvarlı ve tam oval bir yapıda gözlenirken zemin kırmızı renkte boyanır. Mikroskop altında x40 objektifte eğer mikrometre ile oynanır ise ookistlerin içerisinde kırmızı kalıntılar şeklinde sporozoitler fark edilebilir. Karbol fuksin dimetilsülfooksit ile kombine edilerek uygulandığında ayırt edilebilir bir zemin üzerinde kırmızıya boyanmış ookistler rahatlıkla fark edilebilmektedirler (57, 98, 116, 117).



**Şekil 3.** Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle boyanmış *Cryptosporidium* spp. ookistleri (x100)

Negatif boyama tekniklerinden olan Nigrosin boyamada ise zemin ve bakteriler yeşil renkte boyanırken ookistler ve mantar sporlarının boya almadıkları bilinmektedir. Dolayısı ile bu boyama yönteminde ookistlerle mantar sporlarının ayırt edilmeleri belli bir deneyim gerektirir. Aynı şekilde metilen mavisi-eozin ve karbol fuksin boyama tekniklerinde de, nigrosine benzer bir durum söz konusudur ve ortamdaki renk kontrastı hızlı bir taramanın yapılması için yetersiz kalmaktadır (57).

Giemsma boyamada uygulama oldukça kolay olup hazırlanan preparatlar uzun süre saklanabilmektedir. Ancak bu teknik ile boyanan preparatlarda renk kontrastı oldukça zayıftır. Dışkıda hemen daima rastlanabilen sporlardan ve kimi diğer mikroorganizmalardan ookistleri ayırmak zordur. Gram boyamada ise ookistler soluk gri renkte boyanırken çevresinde boyanmamış belirgin bir boşluk kalır, maya ve benzer diğer yapılar ise mor renkte boyanır (111, 113).

Floresan boyama teknikleri ile boyanan preparatların floresan mikroskopunda x100 objektif taramasında ookistler siyah zemin üzerinde sferik, yuvarlak-oval yapıda ve boyaya göre sarımsı elma yeşili veya turuncu renkte kolaylıkla fark edilebilirler. Ancak ookistlerin çoğunun yeteri kadar boya almaması ve yapısının bozulmuş olması gibi nedenlerle içyapının seçilememesi ve tekniğin kalite kontrolünün zorluğu yöntemin dezavantajlarından (105, 112).

AO boyama yöntemi de dışkıdaki ookistlerin tanısında kullanılabilen duyarlı yöntemler arasındadır. AO ile boyanıp pozitif bulunan örneklerin aynı preparat üzerinde asit-fast boyası yapılarak doğrulanabilmesi testin avantajlarından (94). AO boyası ile mantarlar kırmızı-turuncu boyanırken ookistler sarı-yeşil renkte boyanmaktadır (94).

AR boyama; hücre duvarındaki mikolik aside affinite gösteren bir boya olarak bilinmektedir. Boyamada zıt boya olarak potasyum permanganat kullanılır. Bazı protozoon parazitleri de kapsayan birçok aside dirençli mikroorganizma AR ile iyi boyanır. Bu yöntemde *Cryptosporidium* ookistleri kırmızı zemin üzerinde parlak sarı renkte görülür. Dolayısı ile usulüne uygun bir şekilde boyanan ve karakteristik rengini alan ookistlerin maya ve mantarlarla karıştırılması mümkün değildir (49, 94).

### **2. 8. 2. Serolojik Yöntemler**

Laboratuvarda mikroskopi ile *Cryptosporidium* spp. tanısı koymak oldukça tecrübe gerektiren bir işlemdir. Özellikle dışkıda az sayıda ookist olduğunda tanı koymak zordur. Örneklerin aside dirençli boyama ve/veya konsantrasyon yöntemleri sonrasında özel

mikroskoplarla incelenmesi gerekmektedir. Konsantrasyon yöntemi zaman alıcıdır ve yoğun iş gücüne gereksinim duyarken, boyama esnasında kullanılan maddelerin bazıları da oldukça toksik ve tehlikelidir (18, 118).

Antijen saptama yöntemlerinin hızlı sonuç verebildiği ve değerlendirmede deneyimli uzmana her zaman gereksinim duyulmadığı göz önünde bulundurulacak olursa bu yöntemler iş yükü yoğun laboratuvarlarda güvenle kullanılabilirler. *Cryptosporidium* spp.'nin dışkıda immunolojik olarak araştırılmasında kullanılan direkt immunfloresan antikor (DFA), indirekt immunfloresan antikor (IFAT), ELISA ve dipstick ticari kitleri bulunmaktadır. *Cryptosporidium* spp.'nin yüzey antijenlerini saptayan DFA, modifiye asit-fast boyama tekniğine göre daha yüksek hassasiyet (%99) ve özgüllüğe (%100) sahip olması nedeniyle en tercih edilen referans yöntemidir (18). Bu yöntemde şüpheli materyal lam üzerine yayılarak fiske edilir ve fluorescein isothiocyanate (FITC) işaretli monoklonal antikorlar kullanılır. Şüpheli antijenlerin bu işaretli özel antikorların oluşmasına neden olmuş olan antijenler olup olmadığı araştırılır. Floresan mikroskop ile ookistlerin varlığının araştırıldığı bu yöntem hem konsantre hem de konsantre edilmemiş dışkı örneklerine uygulanabilmektedir (18, 119). Bu testlerin kullanılışı kolaydır ve tecrübeli teknisyen gerektirmezler ve zaman kaybına yol açmazlar. Bireysel laboratuvarlarda da kullanılabilirler (18).

*Cryptosporidium* antijenlerini saptama amacıyla kullanılan ELISA kitleri taze, donmuş, formolde ya da sodyum acetate-acetic acid-formalin (SAF) ile fiske edilmiş dışkılarına da uygulanabilmesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak bu yöntem konsantre edilmiş ve polyvinyl alcohol (PVA)'de saklanmış dışkılarına uygulanamamaktadır.

ELISA tekniğinde dışkı örneği, örnek sulandırım sıvısı ile emülsifiye edilir. Sulandırılmış gaita örneği ve *Cryptosporidium* ookist antijenine spesifik monoklonal antikor içeren konjugat, mikroplytlerin *Cryptosporidium* ookist antijenine bağlanan poliklonal antikorlar yapılandırılmış kuyucuklarına aktarılır. Şayet hasta örneğinde ookist varsa inkübasyon sırasında kuyucuklardaki poliklonal antikorlara ve konjugatta bulunan ookist spesifik monoklonal antikorlara bağlanır. Oluşan spesifik olmayan bağlanmalar yıkama sırasında ortamdaki uzaklaştırılır. Substratın ilavesiyle ookist varlığında oluşan enzim-antikor-antijen kompleksine bağlı renk oluşumu tespit edilir (18). *Cryptosporidium* ELISA kitlerinin

sensitivite ve spesifitesi %93 ile %100 arasında değişmektedir ve uygulayan laboratuvarların yalancı pozitif sonuçlar konusunda hassas olması gerekmektedir (18, 19).

ELISA kitleri mikroskobiye (genellikle asit-fast boyaması) karşı üstündür ve DFA testi ile iyi korelasyon gösterirler. Çok spesifik olan ELISA tekniği, asit-fast boyamadan 20 kat daha fazla duyarlıdır. IFAT, boyama yöntemine göre pahalı olmasına karşın, çapraz reaksiyon göstermemesi ve dışkının konsantrasyonuna gerek duyulmaması nedeniyle tercih nedenidir (118).

Cryptosporidiosisde immunokromotografik tanı testlerinin duyarlılığı %67,6-%97,6 arasında değişmekle birlikte hızlı tanı sağlamaları nedeniyle kullanılmaktadır. Bu yöntemler kombine antijen taraması yapabilirler. İmmunokromotografik tanı kitleri, teknik gereksinimlerinin az, hızlı ve göreceli olarak ucuz olması yanı sıra kolay değerlendirilebilmesi nedeniyle özellikle örnek kapasitesi düşük bazı laboratuvarlarda ve salgın şüphesinde tercih edilmektedir. Su kaynaklı salgınlar için potansiyel risk oluşturdukları için *Giardia/Cryptosporidium* birlikte taranabildiği immunokromotografik yöntemler oldukça yaygındır (120).

Ookistleri saptamada bir serolojik yöntem olan floresan antikor yöntemi ile flow-sitometri kombinasyonunun duyarlılığı immunfloresan testlerinden daha yüksektir. Flow-sitometri 10000 organizma /ml belirleyebilir (92).

### **2. 8. 3. Moleküler Yöntemler**

Özellikle PCR ve PCR temeline dayalı moleküler teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler, yıllardır *Cryptosporidium* türlerinin saptanması ve farklılaştırılmasında kullanılmaktadır. Başlangıçta kullanılan PCR yöntemleri, tür tayini ve genotiplendirme yapamadıkları için yalnızca örnekte *Cryptosporidium* olup olmadığının saptanmasında kullanılabilmiştir. Bu teknikler yapısal ya da housekeeping genlerden ziyade *Cryptosporidium parvum* sığır izolatlarından elde edilen çoğunlukla polimorfik olmaya eğilimli ve tanımlanmamış genomik dizilerin kullanımı temeline dayanmaktadır. Bu nedenle



tanımlanmamış *Cryptosporidium parvum* genomik dizilerini hedefleyen PCR yöntemleri *Cryptosporidium parvum*'dan uzak olan *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis* ve *Cryptosporidium suis* gibi *Cryptosporidium* spp'nin DNA'sını etkili bir şekilde çoğaltamazlar. Tür düzeyinde *Cryptosporidium*'un saptanması ve farklılaştırılması amacıyla birkaç PCR-RFLP temeline dayalı genotiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerin çoğunun esası small subunit rRNA geninin kullanılmasına dayandırılmıştır (73).

PCR, *Cryptosporidium* türlerinin klinik ve subklinik olgularda ve çevresel kaynaklarda gösterilmesi amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PCR sayesinde numunede bulunan bir ookist bile saptanabilmekte iken bu sayı mikroskopta yapılan preparat taramalarında 1 gram (gr) materyalde 10000-500000 etkendir. Bu test sayesinde kullanılan diğer tekniklerin de duyarlılığını kontrol etmek mümkün olabilirken tek uygulamada, materyalde bulunan birden fazla tür taranabilmektedir. PCR, salgınlarda etkili olan parazit türünün tanımlanabilmesi açısından da iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Sıvı örneklerden ookist izolasyonu konusunda ELISA tekniğine göre  $10^3$ - $10^4$  kat daha duyarlı olan PCR, artık önemli bir tanı tekniği konumundadır. Özellikle etkenin hibridizasyon ürünlerini hedefleyen PCR teknikleri IFAT yöntemine göre de çok etkili bulunmaktadır. PCR, kötü koşullarda muhafaza edilmiş veya içerisinde çok az etken bulunan numunelerde tanı amacı ile kullanılabilir mevcut en uygun yöntem konumundadır (14, 47, 95, 108, 121-123).

PCR; oldukça hızlı, yüksek düzeyde duyarlı ve doğru sonuçlar çıkaran bir test olmasına karşın yöntemi sınırlayıcı pek çok faktör de söz konusudur. Örneğin, çıplak nükleik asit tespiti sırasında gözden kaçmış diğer mikroorganizmalardan ve laboratuvar kontaminasyonlarından kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bazı çevresel kontaminantlar, ölçüm sırasında kalitatif veya kantitatif değerlendirmeye dahil olabilmektedir. Genel olarak PCR zaman alıcı, pahalı ve deneyimli elemanlara gereksinim duyan bir yöntemdir. Dışkıdan etken teşhis etmek amacıyla PCR'ı rutin bir şekilde kullanabilmek için kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması ve örneklerden ookistlerin titizlikle izole edilmesi şarttır. Yine uygun bir ekstraksiyon yöntemi bularak işleme sokmak ve en ideal primerleri seçip kullanmak gerekmektedir. Rutinde yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyonu, dışkıda yer alan kompleks polisakkaritler, safra tuzları, bilirubin ve bazı diğer komponentler PCR için inhibe edici özellik taşımaktadırlar. Dışkıda bulunan inhibitörük faktörlerin eliminasyonu, zaman alıcı ve zahmetli bir prosedür ile mümkün

olabilmektedir. Yine su gibi çevresel materyallerde de fenolik bileşikler, humik asit ve ağır metaller gibi inhibitörlere rastlanabilmektedir. Ayrıca numunede bulunan bakteriyel komponentler, hedeflenmiş DNA parçaları ve kontaminantlar işlem sırasında spesifik amplifikasyonu bozabilmektedir. Gerek dışkıda gerekse suda bulunan inhibitörlerin asıl olumsuz etkisi, test sırasında gerçekleşen DNA-DNA polimeraz etkileşimini, çeşitli kimyasal veya fiziksel faktörler aracılığı ile bozmak tarzında gerçekleşmektedir. Epidemiyolojik taramalar için kullanılabilir en iyi yöntemlerden biri olan PCR, fazla zahmetli olmasından dolayı rutin tanı laboratuvarları için pek uygun bir yöntem değildir (14, 57, 99, 124).

Günümüzde, teşhiste kullanılmak üzere seçilebilecek hedef moleküller konusunda ayrıntılı bilgilere ulaşılmıştır. İzole edilen etkenin türünün, canlılığının ve enfektivitesinin tayini amacı ile geliştirilmiş değişik PCR teknikleri bulunmaktadır. Bunlara rRNA veya mRNA bazlı RT-PCR, PCR ile üretilen uzun bir genom parçasını uygun enzimlerle parçaladıktan sonra ayrılan kısımların jelde yürütülerek hangi gen bölgesinin daha uzun olduğunu ortaya koyan dolayısı ile de etkenin ayrıntılı genetik analizinin yapılabilmesini sağlayan PCR-RFLP, önce 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, üretilen hedef DNA miktarını dolayısı ile ortamdaki etken miktarını ortaya koyabilen, özel işaretli hibridizasyon problemleri kullanılarak yapılan Real-Time PCR, özel TaqMan problemlerinin kullanıldığı ve esas itibarıyla Real-Time PCR'a benzeyen TaqMan PCR, özellikle izolatların ayırımını yapmada kullanılan arbitrary primed PCR (AP-PCR) örnek olarak gösterilebilir (99, 101, 122, 123, 125, 126).

Cryptosporidiosis PCR ile teşhisi için HSP 70 mRNA geni, 18s SSU rRNA geni,  $\beta$  tubulin kodlayan mRNA geni, amyloglikosidaz enzimini kodlayan mRNA geni, methionin aminopeptidaz, T-kompleks protein 1 delta (TCP-1) içeren chaperonin kodlayan genler, *Cryptosporidium* ookist duvar proteini (COWP), trombospondin related adhesive proteins *Cryptosporidium* -1 (TRAP-C1), TRAP-C2 genleri sık kullanılan moleküllerdendir. Duyarlılık açısından en yaygın gen bölgelerinin, nested PCR tekniğinde kullanılan ve genomda tek kopyası bulunan dihidrofolat redüktaz enzimini kodlayan gen ile genomda 5 kopyası bulunan 18 S rDNA geni olduğu bildirilmiştir (122, 123, 127).

#### 2. 8. 4. Histopatolojik Yöntemler

Özellikle 1980 öncesinde *Cryptosporidium* için kullanılan tek tanı yöntemi, bağırsaklardan biyopsi alınarak mikrovillusların kenarında küçük ve yuvarlak ookistlerin gösterilmesi şeklindeydi. Bu yöntemde hemotoksilen ve eozin gibi boyalarla boyanarak çeşitli gelişim safhasındaki *Cryptosporidium*'ların teşhisi yapılabilsede yöntem identifikasyon için yeterli olmamıştır. Bunun yanında hem invaziv girişim gerektirmesi hem de alınan parça için hızlı fiksasyona gerek duyulması, pahalı olması ve yapılması için fazla zamana gereksinim duyulması gibi sebeplerle günümüzde pek kullanılmamaktadır (10, 94).

#### 2. 9. Hücre Kültürü

Canlılık tayini amacıyla değişik hücre kültürlerinden yoğun bir şekilde faydalanılmakta olup günümüzde 25'ten fazla kültür çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları Coca-2 (insan kolon karsinoma hücre kültürü), sığır fallopian tüpü epitelyumi hücre kültürü, Mardin Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre kültürü, HCT-8 (insan ilioçekal karsinoma hücre kültürü), insan mide adenokarsinom hücre kültürleridir.

Çalışmalarda kullanılacak en uygun kültürün HCT-8 olduğu bildirilmiştir. Ekimi takiben 24.-72. saatlerde kültür taranır ise etkenin değişik üreme formları fark edilebilmektedir. HCT-8'de, 2-3 gün ara ile yapılan pasajlar sayesinde kültürü 2 gün kadar uzatabilmek mümkündür. Bu uzun süre sayesinde ilgili dönemde yapılabilecek çalışmalar rahatlıkla yürütülebilmektedir. *Cryptosporidium muris* için, doğal enfeksiyon karakterine de uygun olarak, en ideal kültürün insan mide adenokarsinom hücre kültürü olduğu, bu kültürde *Cryptosporidium parvum*'u da üretebilmenin mümkün olduğu ifade edilmiştir.

Hücre kültürünün en büyük dezavantajı, henüz süregen olarak devam ettirilebilen bir kültürün ortaya konamamış olması ve doğal etken biyolojik siklusunda otoenfeksiyonu sağlayan ince duvarlı ookistlerin in vitro ortamda oluşmamasıdır ki bu durum, kültürde

sağlanabilecek yoğun bir enfeksiyon tablosunun oluşumunu da engellemektedir. Bu tip ookistlerin kültürde oluşabildiği ifade edilse de ilgili etkenlerin açıldığına dair bir kanıt ortaya konamamıştır. Yine hücre kültürlerinde üretilebilen etken düzeyinin, çoğu kez ekilenden daha az olduğu da ifade edilmiştir.

*Cryptosporidium* türlerinin hücre kültüründe üremesini etkileyen birçok faktörden bahsedilmiştir. Bunlardan başlıcaları ookistin genotipi ve söz konusu genotip ile ekimi yapılan hücrenin köken uygunluğu, ookistlerin kültür ortamında eksiste olma dereceleri ve yaşları (3 aydan daha genç ookistler daha uygundur), inokulumun miktarı (fazla sayıda ookist hücrelerin yaygın ölümüne neden olurken az sayıda ookist oran olarak daha fazla sayı ve çeşitte etken formunun gelişimini sağlar), ekim yapılan hücrelerin türü ve yaşı, besiyeri miktarı ve özellikleri, inkübasyon ortamının ısısı ve gaz içeriğidir (128).

Etkenin kültürdeki üremesini saptamak amacıyla değişik teknikler kullanılmaktadır. Örneğin enfeksiyonun 48. saatinde etken bulunan hücre kültürü FITC ile işaretlenmiş poliklonal sporozoit spesifik antikorları içeren serum ile muamele edildikten sonra etkene tutunmuş antikorlar floresan mikroskopunda taranabilmektedir (99).

Hücre kültürleri etkene karşı ilaç denemelerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak etkenin gerek eksistasyonu gerek üreme yetisi gerekse de ilaç duyarlılığı inokulum hazırlama tekniklerine, inkübasyonun süresine, şartlarına, etkenin orijinine ve benzer bir takım faktörlere bağımlılık gösterir. Çalışmalarda ilgili konuları daima göz önünde bulundurmak gerekir (95).

## **2. 10. Tedavisi**

Cryptosporidiosisin şiddeti, konağın immun durumu ile değişir. HIV/AIDS hastaları; antimotilite ilaçlar, sıvı ve elektrolitler, antiretroviral tedavi ve çoğunlukla antiparazitik ilaçlar ile dikkatli tedavi gerektiren şiddetli cryptosporidiosis geliştirebilir. Hastalık, çocuklarda kötüleşen nitrusyonel durumlarla ilişkili olabilmesine ve uzayabilmesine rağmen immunkompetan bireylerde genellikle kendiliğinden iyileşir. Destekleyici tedavi sodyum,

potasyum, bikarbonat ve glukoz içeren sıvı ve elektrolit replasmanı içermelidir. Bu replasman genellikle oral olarak başarılı olabilir. Nişasta bazlı oral rehidratasyon solüsyonları glukoz bazlı solüsyonlardan daha düşük osmolariteli kaloriler sağlar ve çoğu vakada tercih edilebilmelidir. Cryptosporidiosis nitrusyonel durumu kötüleştirir bunun sonucu gelişen malnutrisyon cryptosporidiosisi kötüleştirir (129, 130). Her ikisi (cryptosporidiosis ve malnutrisyon), intestinal malabsorbsiyon, artmış metabolik ihtiyaçlar ve intestinal mukoza hasarına bağlı bozulmuş besin alımı ve transportundan dolayı besin kullanımını azaltır. Malnutrisyon immun sistemi de bozar ve enfeksiyona çok duyarlı bireyler ortaya çıkarır. Diğer taraftan yeterli hidrasyon, ishalden dolayı azalmış veya kaybolmuş önemli elementlerin replasmanı mukozal fonksiyonu tamire yardım eder, immun cevabı artırır ve mukozal hasarı takiben intestinal mukozal bariyeri onarmaya yardım eder. Bu nedenle nutrisyonel destek ishal tedavisinin önemli bir parçasıdır. İnfantlar genellikle anne sütü ile beslenmeye devam etmelidir. Yetişkinlerde laktozsuz diyet semptomları iyileştirebilir, matür epitelyal hücreler boyunca villus uçlarında üretilen laktaz hastalık seyri sırasında kaybolabilir. Son bilgiler intestinal epitel hücreler için önemli bir enerji kaynağı olarak glutamini işaret etmektedir. Çünkü glutamin bağırsakta hızlı bir şekilde azalır, alanyl-glutamin gibi formülasyonlar glutaminin daha sağlıklı bir kaynağını temin eder. Çalışmalar sıvı absorpsiyonunun genellikle alanyl-glutamin formlarında glutamin desteği ile arttırılabildiğini gösterir (131).

Antimotilite ilaçları, immunkompromize konaklarda cryptosporidiosisin yönetiminde anahtar bir rol oynarlar. Sıvıların, elektrolitlerin ve ilaçların emiliminin azalmasına neden olabilen ishal boyunca antimotilite ajanları artmış bağırsak geçişine hitap edebilir. Loperamid ve difenoksilat ve atropin kombinasyonları hafif vakalarda semptomları iyileştirebilir. Daha potent opiyatlar loperamidin başarısız olduğu vakalarda etkili olabilir. AIDS hastalarında ishal tedavisinde oktreotid kullanılmıştır. Ancak bu ilaç daha az pahalı olan oral antidiareal ajanlardan daha etkili değildi. Tek bir çalışma enkafalinaz inhibitörü asetorfan'ın AIDS ilişkili ishalde somatostatinden daha etkili olduğunu gösterdi (132).

Bugüne kadar cryptosporidiosis sağılıtmında birçok ilaç kullanılmasına rağmen tam anlamıyla etkin bir anticryptosporidial ajan bulunamamıştır. Bunun nedeni olarak ise parazitin intrasellüler, ekstrastoplazmik yerleşim göstermesine bağlı, sağılıtmında kullanılan bu ilaçların parazite ulaşamadığı düşünülmektedir. Yine parazite ait uygun bir kültür ortamının olmamasından dolayı parazitin biyokimyasal ve metabolik özellikleri üzerinde fazla

çalışılmamış ve sonuçta cryptosporidiosis için hastalığın etkisini geçiren, ookistleri öldüren güvenilir bir ilaç bulunamamıştır.

Spiramisin, azitromisin, roksitromisin ve klaritromisin gibi makrolid grubu antibiyotikler cryptosporidiosis sağılıımında kullanılmaktadır. Geniş spektrumlu antibakteriyel etkiye sahip olan spiramisin 1980'li yıllarda cryptosporidiosis sağılıımında başlangıçta umut vermiş, ancak sonradan kontrollü çalışmalarda önemli bir etki saptanamamıştır.

Son zamanlarda cryptosporidiosisli bağışıklığı baskılanmış olgularda en çok kullanılan ilaçlardan biri azitromisindir. Uzun süreli düşük doz azitromisinin AIDS ve kronik cryptosporidiosisli olgularda önemli klinik ve parazitolojik düzelme sağladığı bildirilmiştir. Azitromisin tek başına kullanılmasının yanında bazı olgularda paromomisin ile birlikte kullanılmış ve bu kombinasyonun ookist atılımını önemli ölçüde, klinik belirtileri kısmen azalttığı görülmüştür (22). Azitromisin, erişkinlerde 1. gün 50 miligram (mg)/tek doz, takiben 9 gün 250 mg/tek doz verilir. Çocuklarda ise 1. gün 10 mg/kilogram (kg), sonraki 9 gün 1-5 mg/kg/gün verilebilir (133).

Parazitin tedavisinde kullanılan bir diğer ilaç, aminoglikozit grubu antibiyotik olan paromomisindir. Cryptosporidiosis'e yakalanmış 5 AIDS'li hastaya paromomisin verilmesi ile birlikte hastalardaki ishalin ve diğer belirtilerin azaldığı belirtilmiş ve 3-6 ay sonra hastalardaki belirtilerin tekrar nüksettiği bildirilmiştir. Paromomisinle ilgili yapılan diğer bir çalışmada 10 hastaya 14 gün boyunca 25/35 mg/kg dozda paromomisin verilmiş ve hastalarda dışkılamının azaldığı ancak ookist çıkarımının devam ettiği bildirilmiştir (75).

HIV'e sahip olmayan hastalarda cryptosporidiosis ve giardiasis tedavisinde FDA'ın onayladığı nitazoksanid bir nitrotiazolil-salikyamid derivativesidir. Özellikle metronidazole dirençli *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* suşları üzerine de etkili olduğu bildirilmiştir. Çocuklarda cryptosporidiosisde etkinliği kanıtlanmış tek antiparazitik ilaç nitazoksaniddir. Antiprotozoal aktivitesinin, anaerobik enerji metabolizması için esas olan piruvat ferrodoksin oksidoreduktaz enzimine bağımlı elektron transfer reaksiyonunda yaptığı karışıklıklara bağılı olduğu düşünülmektedir. 3 gün yemeklerle birlikte günde 2 kez verilir. Doz 500 mg (>12 yaş), 200 mg (4-11 yaş) veya 100 mg (1-3 yaş) olabilir (132, 134). Klinik denemeler nitazoksanidin parazit yükünü azalttığını ve klinik hastalık süresini kısaltabildiğini

göstermektedir. Bununla birlikte bu ilaç, immun sistemi ileri derecede baskılanmış olmayan hastalarda kısmen etkili olduğu görülse bile henüz immun sistem yetmezliği olan kimselerdeki *Cryptosporidium* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmak için onaylanmamıştır.

Endüstrileşmiş ülkelerde AIDS hastalarındaki cryptosporidiosis için en etkili tedavi ve profilaksi yüksek derecede aktif antiviral tedavi (HAART) uygulanmasıdır. Enfeksiyonun yok edilmesi ve önlenmesi indinavir, nelfinavir ve ritonavir gibi in vitro ve laboratuvar hayvanlarında anticryptosporidial aktivitesi gösterilmiş olan ve HAART'ta kullanılan bazı proteaz inhibitörleri (PIs) olmasına rağmen bu ilaçların antiparazitik aktivitelerinden ziyade direkt olarak tedavi edilen kimsenin CD4 hücrelerinin geri yerine konulması ile ilişkilidir (73). Bu nedenle HIV/AIDS hastalarında kombine antiretroviral tedavi başlatılmalı veya optimize edilmelidir. Mümkünse tedavi nitazoksanid ile sinerji yapabilen, anticryptosporidial aktiviteye sahip olabilen HIV PIs'leri gibi kuvvetli bir PIs içermelidir. Nitazoksanidin standart dozu HIV/AIDS hastalarında tipik olarak yeterli değildir, daha yüksek dozlar kullanılmalı ve tedavi süresi daha uzun olmalıdır. Yetişkin HIV hastaları çoğunlukla klinik semptomlar ortadan kalkıncaya, ookistler gaitadan elimine edilinceye ve CD4 T hücre sayısı 100 hücre/mm<sup>3</sup>'ten daha fazla miktarlara ulaşıncaya kadar günde 2 kez 500-1000 mg nitazoksanid ile tedavi edilmelidir. Paromomisin ve azitromisin kombinasyonu nitazoksanide alternatif olarak kullanılabilir ancak etkili antiretroviral tedavi ile de kombine edilmelidir (132).

Sağılımda çok etkili bir ilacın bulunmayışı ve konağın bağışıklık durumu ile enfeksiyonun gidişi arasında sıkı bir ilişki bulunması nedeniyle immunolojik sağıltım yöntemlerine yönelim olmuştur. Bazı olgularda bağışıklığı baskılayan ilaçların kesilmesi ile bir süre sonra enfeksiyonun tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. AIDS'li ve cryptosporidiosisli 7 olguya *Cryptosporidium parvum* ile bağışıklanmış buzağı lenf düğümü hücrelerinden hazırlanan özgül sığır lökosit ekstresi verilmiş, 6 olguda kilo artışı ve bağırsak peristaltizminde azalma saptanırken 5 olgunun dışkısında ookistler ortadan kalkmıştır. Cryptosporidiosisite pasif antikorlarla immunoterapinin, son yıllarda laboratuvar ve hayvanlar ile insanlarda erken evre klinik çalışmaları şeklinde aktif olarak uygulandığı bildirilmiştir (22).

## 2. 11. Korunma

*Cryptosporidium* ookistleri uzun süre dış ortamda canlılıklarını devam ettirirler ve dışarıda 4 °C'de 2-6 ay canlı kalabilirler. Çevre koşullarına ve dezenfeksiyona oldukça dayanıklı yapı gösterirler. Dolayısı ile ookistleri -20 °C'de 72 saat dondurma, 45-55 °C'de 20 dakika ısıtma işlemleri ookistin enfeksiyon yeteneğini azaltır veya yok eder. Parazit ookistlerine uygulanan dezenfeksiyon işlemi, dezenfektan maddenin çeşidi ile hazırlanan solüsyonun konsantrasyonu ve ookistlerle temas süresi önemlidir. Ookistlerin dezenfeksiyonunda en çok önerilen dezenfektan sodyum hipokloridin %2.5'lik solüsyonudur. Ayrıca %5'lik amonyum ve %10'luk formol solüsyonunda 4 °C'de 18 saat tutulduğunda ookistlerin enfeksiyon yeteneğinin kaybolduğu gözlenmiştir (75).

Fekal-oral yol ile bulaşan herhangi bir patojende olduğu gibi iyi uygulanan kişisel temizlik *Cryptosporidium* enfeksiyonunun oluşmasının önlenmesinde de anahtardır. İmmun sistemi baskılanmış kimselerde cryptosporidiosis oluşumunun engellenmesi için gerekli önlemler alınmalıdır. Tuvalete gidildikten, çocuk bezi değiştirildikten, evcil hayvanlar ve toprakla (bahçe işleri dahil) temas ettikten sonra eller yıkanmalıdır. Göl ve nehirlerden su içilmesinden, su ile yapılan eğlenceler sırasında su yutulmasından, pastörize olmayan süt, süt ürünleri, meyve sularının içilmesinden kaçınılmalıdır. Oral-anal temastan kaçınılan güvenli cinsel ilişki bir başka önlemdir. Cryptosporidiosis salgını sırasında veya suyun kaynatılması önerildiğinde bireyler paraziti öldürmek için suyu 1 dakika kaynatmalı ya da 1 µm çapından daha küçük parçacıkları tutabilen musluk suyu filtreleri kullanılmalıdır. İmmun sistemi baskılanmış kimseler, çiğ ve kabuklu deniz hayvanları yemekten kaçınmalı ve tropikal ülkeler gibi cryptosporidiosisin endemik olduğu yerlere seyahat ettikleri zaman pişirilmemiş sebze salatası ve kabuğu soyulmamış meyveleri yememelidirler (73).



### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu tez çalışması, 19.06.2009 onay tarihli ve 11 numaralı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayından sonra Ağustos 2009 ile Nisan 2010 tarihleri arasında Şanlıurfa ilinde yapıldı.

Çalışma grubu, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi (HÜTF)'nin çeşitli bölümleri (Çocuk Hematoloji Bilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı) ile Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi (ŞEAH)'nin çeşitli bölümlerinde (Diyaliz Ünitesi, Kemoterapi Ünitesi ve Onkoloji Servisi) takip ve tedavileri yapılan gastrointestinal şikayetli toplam 100 immünsüprese gönüllü hastadan oluşturuldu. Kontrol grubu ise HÜTF'nin ve Şanlıurfa Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi (ŞÇSH)'nin farklı bölümlerinden her iki hastanenin kendi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gaita tetkiki amacıyla gönderilen gastrointestinal şikayetli toplam 80 immunkompetan gönüllü hastadan oluşturuldu.

Gastrointestinal şikayetleri olan hastalar; karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal ve karında distansiyon yakınmalarından en az birine sahip hastalardı. Laksatif kullanımı olmaksızın günde üç defadan daha sık, şekilsiz dışkılayan hastalar ishalleri hasta olarak değerlendirildi.

Çalışmaya gönüllü olarak katılan tüm hastalar, Harran Üniversitesi Etik Kurulu'nun "Hasta Bilgilendirilmiş Olur Formu" nu doldurup imzalaması ile çalışmaya dahil edildiler. Çalışma Şanlıurfa Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü'nün resmi onay, izin ve bilgisi dahilinde gerçekleştirildi.

Çalışmaya dahil edilen her hastaya adı, soyadı, yaşı, cinsiyeti, mesleği, ikamet ettiği yeri, kullanmış olduğu suyun işlenmiş olup olmadığı, hayvanlarla teması, kalabalık bir ortamda yaşayıp yaşamadığı, son günlerde seyahat öyküsünün olup olmadığı gibi hastanın sosyo-demografik özelliklerini yansıtan sorular soruldu. Yine hastanın yakınmalarını yansıtan ateş, karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal, karında şişkinlik gibi belirtilerin olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca bu yakınma ve belirtilerin ne zaman başladığı, bu dönemde parazitlere karşı ilaç kullanıp kullanmadığı, hastanın immun sistemini zayıflatan bir hastalığının veya uygulamanın olup olmadığı, böyle bir durum varsa bu hastalığın ve uygulamanın ne zamandır devam ettiği ve bu nedenle hangi ilaçları kullandığını belirleyen sorular soruldu. Gerek sosyo-demografik özellikleri gerekse hastanın yakınmaları ve hastalık durumunu sorgulayan sorular “Hasta Takip Formu” adı altında bir form halinde düzenlendi.

Gastrointestinal şikayeti olan, gerek çalışma grubuna gerekse kontrol grubuna dahil edilen hastalardan gaita elde etmek için hastalara temiz ve ağız kapalı gaita kapları verilmek suretiyle dışkı numuneleri toplandı. Elde edilen dışkı örnekleri, gaita kıvamı açısından, gaitada kan ve mukus olup olmadığı yönünden ve gaitada sestod halkaları ve nematod erişkinleri olup olmadığı bakımından makroskobik olarak incelendi. Toplanan her bir dışkı örneğinin bir kısmı hem direkt taze bakı hem de çoklaştırma işlemi amacıyla %10 formolde muhafaza edildi. 1-1.5 gr taze dışkı 10 ml %10'luk formol içinde ezildi. Eğer dışkı örneği sulu veya çok yumuşak ise mateyalden 5-6 ml kullanıldı. % 10 formolde muhafaza edilen gaita numunelerine aynı gün içinde formol-etil asetat çoklaştırma yöntemi uygulandı. Toplanan dışkı örneklerinin bir kısmı ise daha sonra bu örneklerde ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium parvum* koproantijenleri araştırılmak amacıyla ependorf tüplerine alınarak hiçbir koruyucu madde eklenmeden -20 °C'de saklandı. Çöktürme yöntemi ile konsantre olan tüm gaita örneklerinin direkt mikroskobik incelemesi yapıldı. Bu inceleme ile tespit edilen tüm bağırsak parazitleri kaydedildi. Ayrıca çöktürme yöntemi uygulanan tüm gaita örnekleri Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile boyanarak *Cryptosporidium* ookistleri yönünden ışık mikroskobunda incelendi. Boyama ile *Cryptosporidium* ookisti tespit edilen ve/veya ELISA ile *Cryptosporidium* antijeni saptanan örneklerin DFA yöntemi ile de taranması amacıyla konsantre gaita numunesinin geri kalan kısmı %10 formol içinde oda ısısında saklandı.

### **3. 1. Formol- Etil Asetat Çöktürme Yöntemi (103)**

#### **3. 1. 1. Kullanılan Maddeler**

- %10 Formol
- Etil asetat
- Falcon tüpü (15 ml'lik)
- Pastör pipeti (Tek kullanımlık)
- Gaita kabı (Tek kullanımlık)
- Tahta çubuk (Tek kullanımlık)
- Plastik süzgeç (Tek kullanımlık)
- Lam
- Santrifüj cihazı
- Vorteks karıştırıcı

#### **3. 1. 2. Yapılışı**

1. 10 ml %10'luk formol çözeltisi içinde en az 30 dakika muhafaza edilen dışkı örneği tahta bir çubuk yardımı ile homojen bir sıvı oluşuncaya kadar karıştırıldı.

2. Süspansiyon plastik süzgeç ile süzüldü, buradan da 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne (falcon tüpü) aktarıldı.

3. Süspansiyona 2 ml etil asetat eklendi. Tüpün ağzı kapatılarak 30 saniye kuvvetlice çalkalandı.

4. Tüp içindeki süspansiyon 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

5. Tüp santrifüj cihazından çıkarıldığında, içindeki karışımın 4 tabakaya ayrıldığı görüldü. Bunlar;

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

6. Dışkı artığı tabakası bir çubuk yardımıyla gevşetildikten sonra tüp hızlıca eğilerek çökelti haricindeki diğer bölümler (üstteki 3 tabaka) döküldü. Bundan sonra kenarlarda kalan sıvının az bir miktarı tekrar çökelti üzerine aktı.

7. Tüpün kenarlarında kalan sıvının çökelti içine akan kısmı çökelti ile karıştırıldı. Çökelti hala pıhtı ise birkaç damla fizyolojik serum eklenerek vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

8. Çökeltiden pastör pipeti yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı ve preparat oda ısısında kurumaya bırakıldı.

### **3. 2. Kinyoun Asit-Fast Boyama Yöntemi (103)**

#### **3. 2. 1. Kullanılan Maddeler**

- Bazik fuksin
- %95 Etil alkol
- Fenol kristalleri
- Konsantre sülfürik asit

- Metilen mavisi
- Potasyum hidroksit (KOH)
- Saf metanol
- Distile su
- Şaleler
- Benmari (su banyosu)
- Kurutma kağıdı

### **3. 2. 2. Hazırlanan Solüsyonlar**

- Kinyoun karbol fuksin boyası

4 gr bazik fuksin, 20 ml %95 etil alkol içinde eritildi. Fenol kristalleri 56 °C'lik su banyosunda eritildi. 8 ml erimiş fenol ile fuksin-alkol solüsyonu 100 ml distile suya ilave edilip 2 gün bekletildi. Solüsyon süzülüp kullanılıncaya kadar saklandı.

- %1'lik Aköz sülfürik asit (dekolarizasyon solüsyonu)

1 ml sülfürik asit dikkatli ve yavaş bir şekilde 99 ml distile suya eklendi. Solüsyon gereksinim duyana dek saklandı.

- Loeffler'in alkali metilen mavisi (karşıt boya)

0.3 gr metilen mavisi 30 ml etil alkol içinde eritildi. 100 ml %0.01 KOH solüsyonu eklendi. Solüsyon gereksinim duyulana dek saklandı.

### 3. 2. 3. Yapılışı

1. Gaitaların konsantrasyon sonrası elde edilen sedimentinden her hasta için ayrı bir numara vererek hazırladığımız yayma preparatlar havada kurutuldu.

2. Yaymalar saf metanol içinde 1 dakika tutularak fiske edildi ve kurumaya bırakıldı.

3. Lamlar Kinyoun karbol fuksin içeren şalede 5 dakika tutularak boyandı.

4. Kinyoun karbol fuksin içeren şaleden çıkarılan lamlar %50 etil alkole batırılıp çalkalandı ve hemen ardından musluk suyunda yıkandı.

5. Daha sonra lamlar dekolorizasyon işlemi için %1'lik sülfürik asit içeren şalede 2 dakika bekletildi ve ardından musluk suyu ile yıkandı.

6. Lamlar Loeffler'in alkali metilen mavisini içeren şalede 1 dakika bekletildikten sonra su ile yıkanıp kurumaya bırakıldı.

### 3. 2. 4. Değerlendirme

Boyanan lamlar ışık mikroskobunda x100 büyütmede immersiyon yağı ile lamel kullanılmadan incelendi. Mavi zemin üzerinde parlak pembe- kırmızı renkte heterojen boyanan ve çoğunun içinde siyah, muntazam olmayan granüller bulunan, 4-6 µm çaplı yuvarlak yapılar *Cryptosporidium* ookistleri olarak değerlendirildi. Mantarlar asit-fast boyanmadıkları için mavi-yeşil boyandı.

### 3. 3. ELISA Yöntemi ile Antijen Arama

Hastalardan toplanıp bir kısmı ependorf tüplerine konularak –20 °C’de saklanan gaita numunelerinde ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium parvum* antijenleri arandı. Çalışmada RIDASCREEN<sup>R</sup> *Cryptosporidium* (C 1201), (r-biopharm) kiti kullanıldı ve çalışma, üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

#### 3. 3. 1. Kit İçinde Bulunan Reaktifler

1. Her birinde 8 kuyucuk bulunan 12 adet bölünebilen mikrokuyucuk sitribine sahip toplam 96 kuyucuklu pleyt. Pleytteki her bir kuyucuğun yüzeyi *Cryptosporidium parvum*’a karşı oluşturulmuş fare kökenli monoklonal antikorlarla kaplanmıştır.

2. Örnek dilüsyon solüsyonu (100 ml, %0.1 Kathon içeren kullanıma hazır solüsyon)

3. Wash buffer (100 ml, 10 kat konsantre, pH 7.2, %0.1 Thimerosal içerir)

4. Pozitif kontrol (1.8 ml, gaitadan elde edilen inaktive *Cryptosporidium* antijeni, %0.01 Thimerosal içerir, kullanıma hazır)

5. Konjugat (10 ml, peroxidase ile konjuge edilmiş *Cryptosporidium* antijenine karşı oluşturulmuş antikor, %0.1 Kathon içerir, kullanıma hazır)

6. Substrat- kromojen solüsyonu (10 ml, Üre peroxide-tetrametilbenzidine (TMB), kullanıma hazır)

7. Stop solüsyonu (6 ml, 1 N sülfürik asit, kullanıma hazır)

### 3. 3. 2 İlave Gerekli Reaktifler ve Gerekli Malzemeler

- Distile veya deiyonize su
- Test tüpleri (ependorf tüpleri)
- Pastör pipeti (Tek kullanımlık)
- Vortex karıştırıcı
- 50-100 µl (mikrolitre) ve 1 ml hacimli mikropipetler
- Mikropipetlere uygun pipet ucu
- Mezür (1000 ml)
- Çok kanallı pipetler (300 µl) veya mikrotitrasyon pipetleri için yıkama ünitesi
- Mikrokuyucuk pleytleri için fotometre
- Filtre kağıdı
- %0.5 hipoklorid solüsyonu içeren atık kabı

### 3. 3. 3. Yıkama Solüsyonu ve Örneklerin Hazırlanması

Kullanılmadan önce tüm reaktifler ve mikrokuyucuklu pleyt ile çalışma zamanına kadar ependorf tüplerinde -20°C’de saklanan gaita örnekleri oda ısısına (20-25 °C) getirildi. 1 kısım konsantre wash buffer ile 9 kısım deiyonize su karıştırılarak yıkama solüsyonu hazırlandı. Her hasta için numaralandırılmış ependorf tüpüne 1 ml örnek dilüsyon solüsyonu konuldu. Sıvı olan test edilecek gaita numunelerinden pastör pipeti ile yaklaşık 100 µl alındı ve bu gaita, içinde örnek dilüsyon solüsyonu bulunan ependorf tüplerinde süspanse edildi. Katı olan gaitalar ise bir tahta çubuk yardımıyla eşit miktarlarda (yaklaşık 50-100 mg) alınıp bunlar da içinde örnek dilüsyon solüsyonu bulunan ependorf tüplerinde süspanse edildi. Vorteks karıştırıcıda gaita süspanسیونları homojenize edildi. Homojenize olan bu gaita süspanسیونlarının süpernatantı direkt olarak testte kullanıldı.



### **3. 3. 4. Testin Çalışılması**

1. Pleytteki birinci kuyucuğa (negatif kontrol kuyucuğu) örnek dilüsyon solüsyonundan 100 µl, ikinci kuyucuğa (pozitif kontrol kuyucuğu) pozitif kontrol sıvısından 2 damla (100 µl) ve hastalara ayrılan test kuyucuklarının her birine, hazırlanan gaita örneklerinin süpernatantından 100 µl yerleştirildi.

2. Pleytteki tüm kuyucuklara 2 damla enzim bağlı antikor (konjugat) eklenip yavaşça sallanarak karıştırıldı ve oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.

3. Kuyucuklarda inkübe edilmiş içerik hipoklorid içeren bir atık kabına boşaltıldı. Ardından pleytteki kuyucuklar her seferinde 300 µl yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı.

4. Her kuyucuğa 2 damla substrat-kromojen solüsyonu eklenerek 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta ikinci kez inkübe edildi.

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

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

### **3. 4. Pozitif Örneklerin DFA Yöntemi İle Test Edilmesi**

Çoklaştırma işleminden sonra %10 formolde oda ısısında saklanan dışkı numunelerinden, Kinyoun asit-fast boyama ve ELISA yöntemlerinin en az biri ile

*Cryptosporidium* spp. yönünden pozitif saptananlar, DFA yöntemiyle de çalışıldılar. Çalışmada *CRYPTO/GIARDIA CEL* (CeLLabs) kiti kullanıldı ve çalışma üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

### 3. 4. 1. Testin Çalışılması ve Değerlendirilmesi

Yaklaşık 6-8 mm çaplı kuyucukları bulunana mikroskop lamının 4 kuyucuğuna boyama ve/veya ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. pozitif 4 hastanın çoklaştırma işleminden sonra %10 formolde oda ısısında saklanmış dışkı numunelerinin 50 µl'si yerleştirildi. Bu lamlar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnek lamı asetonda tespit edildi. Sonra lamdaki her bir kuyucuğa 25 µl *Crypto/Giardia* Cel reaktifi (*Giardia* kist ve/veya *Cryptosporidium* ookistlerine spesifik FITC işaretli fare monoklonal antikoru) eklendi. Lam 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından PBS'de 1 dakika yıkandı ve lamdaki artık nem uzaklaştırıldı. 1 damla mounting sıvısından lamdaki kuyucuklara eklendi ve lamelle lam üzeri kapandı. Lam floresan mikroskopta x40 ve x100 büyütmede incelendi. Yeşil veya kırmızımsı kahverengi boyanan zemine karşı *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistleri tipik morfolojileri ile floresan parlak elma yeşili bir görüntü verdi.

### 3. 5. İstatistiksel Analizler

Elde ettiğimiz veriler, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 11.5 paket programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analizlerde ki-kare testi kullanıldı. P değeri sınır düzeyinin (0.05) altında ise değişkenler arasında tesadüfe bağlı olmayan gerçek bir farkın olduğu kabul edildi.

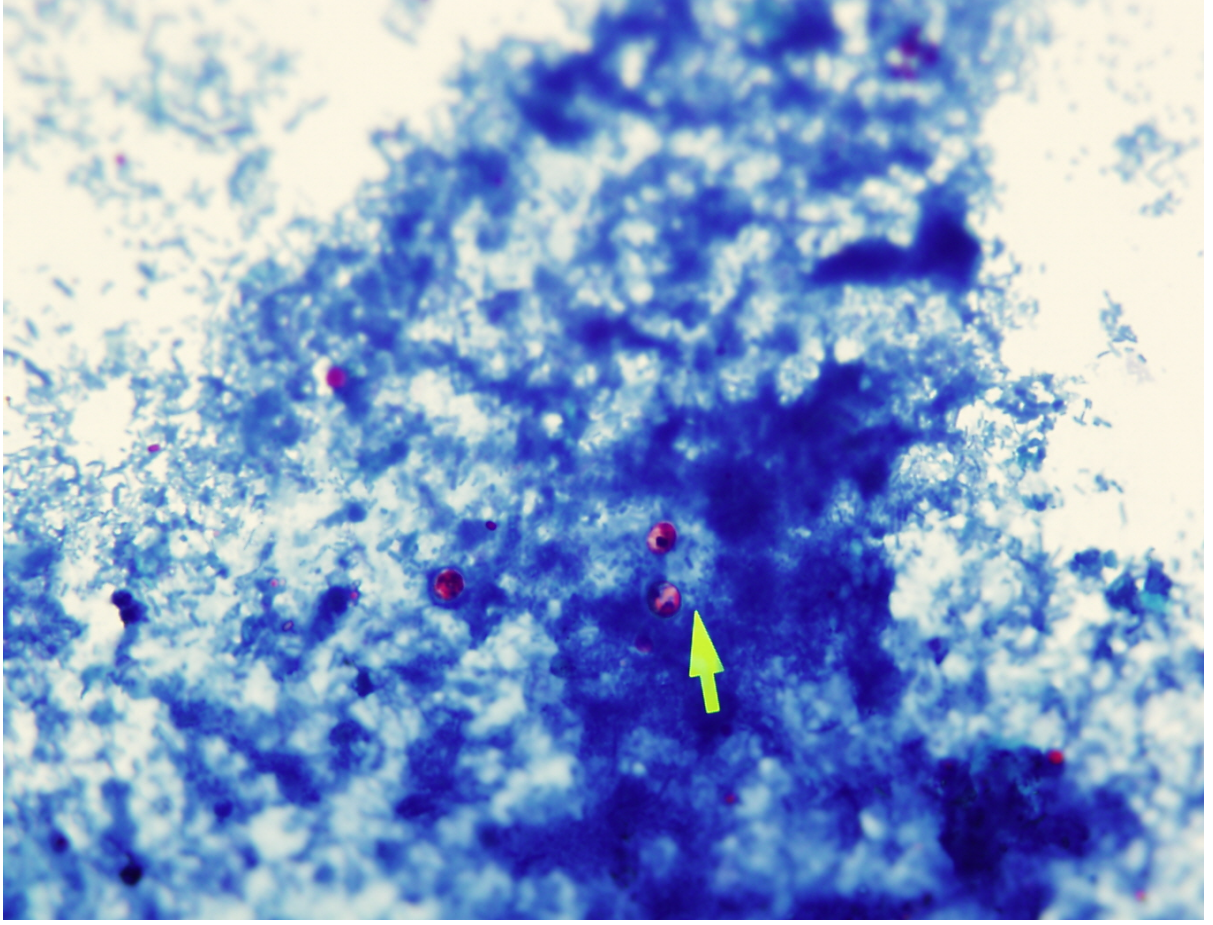
#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda immunsuprese olan ve gastrointestinal şikayetleri bulunan yaşları 2 ile 79 arasında değişen toplam 100 (52'si erkek, 48'i kadın) hastanın gaita numuneleri incelendi. Yaş ortalamaları  $36.9 \pm 23.7$  olarak saptandı. Kontrol grubu hastalar ise immun sistemi sağlam olan ve gastrointestinal şikayetleri bulunan, yaşları 1 ile 84 arasında değişen toplam 80 (36'sı erkek, 44'ü kadın) hastadan oluşturuldu. Yaş ortalamaları ise  $21.7 \pm 23.4$  olarak saptandı. İmmunsuprese gruba ait toplam 100 dışkı örneğinin 3 (%3)'ünde Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptandı. Bu üç hastadan ikisinin gaitasında direkt taze bakı yöntemiyle *Cryptosporidium* spp. ile birlikte *Giardia intestinalis* kistlerine de rastlandı.

Kinyoun asit-fast boyama yöntemi kullanarak hazırlamış olduğumuz preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri x100 büyütmede immersiyon yağı kullanılarak incelendi. Sferik yapıdaki ookistlerin mavi zemin üzerinde açık pembeden kırmızıya çalan renkte boyandığı görüldü. Yine bu ookistlerin birçoğunun içinde birden fazla sayıda, siyah, muntazam olmayan sporozoit yapılar fark edildi (Fotoğraf 1).

ELISA yöntemi ile immunsuprese 100 hastanın 4 (%4)'ünde *Cryptosporidium parvum* koproantijeni saptandı. *Cryptosporidium* spp. açısından Kinyoun asit-fast boyama ile pozitif tespit edilen 3 hasta, ELISA ile de pozitif sonuç verdi. İmmun sistemi sağlam olup gastrointestinal şikayeti olan kontrol grubundaki 80 hastada ise her iki yöntemle de *Cryptosporidium* parazetine saptanmadı (Tablo 3).

ELISA yönteminin Kinyoun asit-fast boyama yöntemine göre duyarlılığının ve özgüllüğünün sırasıyla; %100 ve %99 olduğu tespit edildi. Testin pozitif prediktif değeri %75, negatif prediktif değeri ise %100 olarak bulundu.



**Fotoğraf 1.** Non Hodgkin Lenfoma hastasının (2 nolu hasta) gaita numunesinde Kinyoun-asit fast boyama ile *Cryptosporidium* spp ookistleri (x100).

**Tablo 3.** Kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile ELISA yönteminin karşılaştırılması.

Yöntem	İmmüsuprese hastalar			İmmükompetan hastalar		
	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam
Kinyoun asit-fast	3 (%3)	97 (%97)	100	0	80 (%100)	80
ELISA	4 (%4)	96 (%96)	100	0	80 (%100)	80

*Cryptosporidium parvum* koproantijenleri yönünden ELISA yöntemiyle dışkı numuneleri araştırılan immüsuprese ve immükompetan hastaların ELISA pleytindeki görünümleri Fotoğraf 2 ve Fotoğraf 3’de görülmektedir.

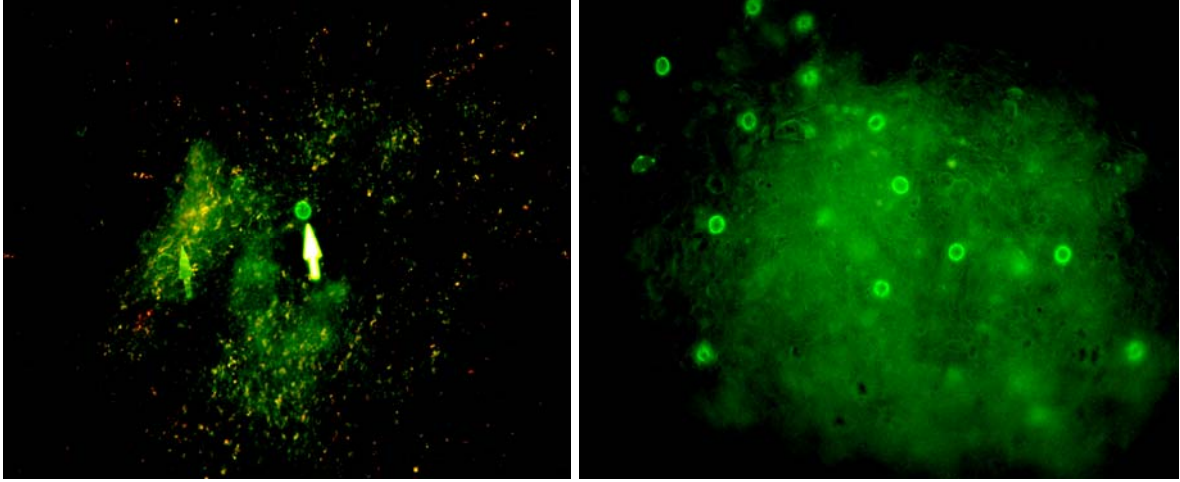


**Fotoğraf 2.** İlk 94 hastanın ELISA sonuçları.



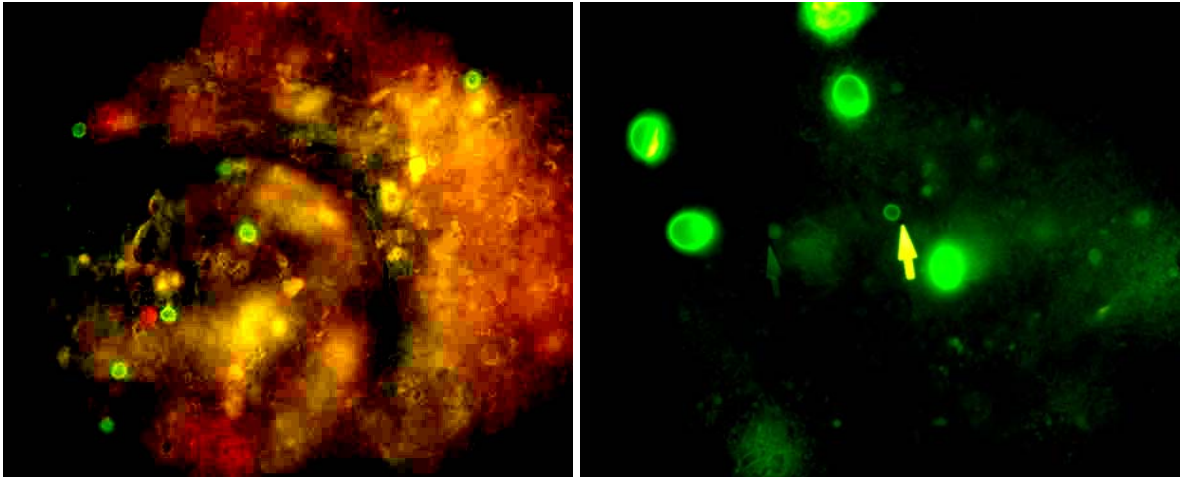
**Fotoğraf 3.** Son 86 hastanın ELISA sonuçları

Gaita numunelerinde Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookistleri saptanan ve/veya ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium parvum* koproantijenleri tespit edilen toplam 4 immunsuprese hastanın dışkı numunelerinde DFA yöntemi ile de *Cryptosporidium* ookistlerine rastlandı (Fotoğraf 4).



1 nolu hasta (x100)

2 nolu hasta (x100)

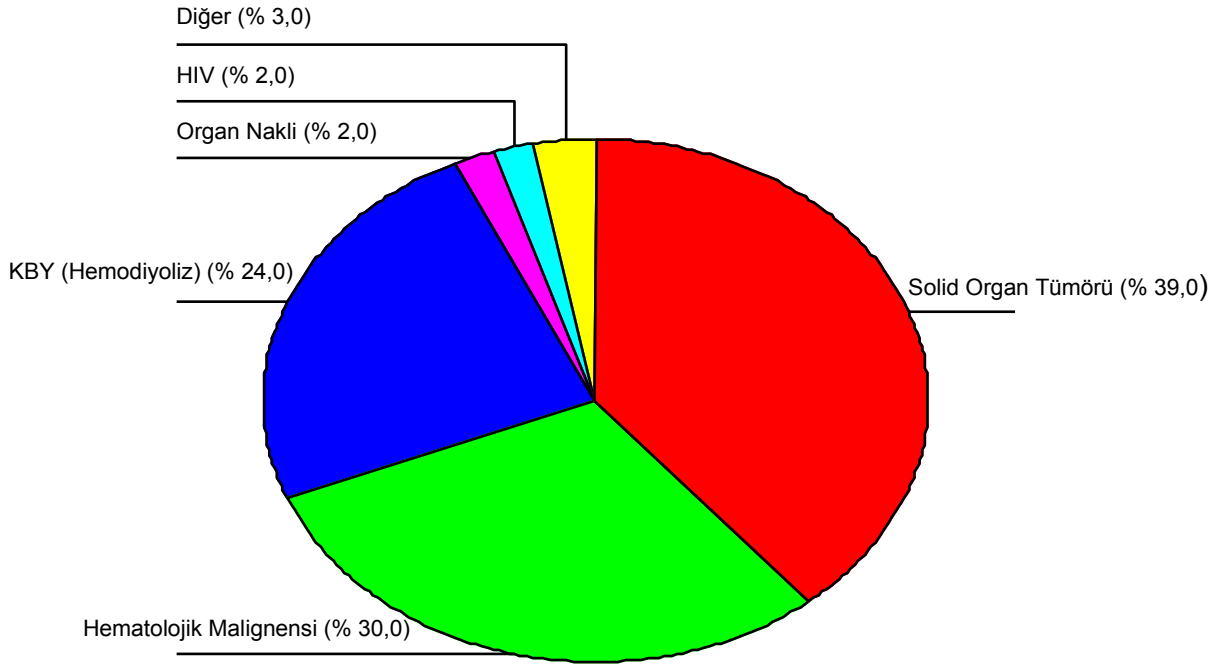


3 nolu hasta (x100)

4 nolu hasta (x100)

**Fotoğraf 4.** Cryptosporidiosisli 4 vakada DFA yöntemi ile floresan mikroskopta gözlenen *Cryptosporidium parvum* ookistleri. (4 nolu vakada *Giardia intestinalis* kistleri de görülmektedir).

İmmun yetmezliği olan hastaların %39'u solid organ tümörlü hastalardan oluşurken %30'u ise hematolojik malignensili hastalardan oluştu. Bu grupta yer alan hastalarda immün yetmezliğe yol açan diğer bozukluklar ve hangi oranda buldukları Şekil 4'de görülmektedir. Gerek immunsuprese hastalarda gerekse immün sistemi sağlam hastalarda en yaygın görülen gastrointestinal yakınma karın ağrısı idi (Tablo 4).



**Şekil 4.** İmmüsuprese grupta immün yetmezliğe neden olan durumlar. Şekildeki “diğ er” ile belirtilen bozukluklar; crohn hastalığı nedeniyle azotioprin tedavisi alan 1 hasta, idiyopatik trombositopenik purpura nedeniyle kortikosteroid tedavisi alan 1 hasta ve doğuştan kalıtsal metabolik hastalığı ve IgG3 eksikliği olan 1 hastadan oluşmaktadır.

**Tablo 4.** Her iki grubun hastalarında tespit edilen şikayetler.

Hastalardaki Şikayetler	İmmüsuprese Hastalar		İmmümkompetan Hastalar	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Karın ağrısı	85	(%85)	61	(%76.25)
Bulantı-kusma	56	(%56)	49	(%61.25)
Distansiyon	47	(%47)	18	(%22.50)
İshal	36	(%36)	31	(%38.75)
Ateş	20	(%20)	22	(%27.50)

Çalışmada, hem immüsuprese grupta hem de immümkompetan grupta test edilen parazitlerin tümü, *Cryptosporidium* spp. ve *Entamoeba histolytica* hariç direkt taze bakı ile saptandı. *Entamoeba histolytica* ise trikrom boyama ile birlikte bu protozoona spesifik ELISA yöntemiyle tespit edildi (Tablo 5).

**Tablo 5.** İmmüsuprese hastalar ile immükompetan hastaların gaita örneklerinde saptanan parazitlerin karşılaştırılması.

Saptanan Parazit	İmmüsuprese hastalarda saptanan parazitler. n = 100	İmmükompetan hastalarda saptanan parazitler. n= 80
<i>Giardia intestinalis</i>	14 (%14)	8 (%10)
<i>Blastocystis hominis</i>	7 (%7)	2 (%2.50)
<i>Chilomastix mesnili</i>	5 (%5)	1 (%1.25)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2 (%2)	--
<i>Entamoeba histolytica</i>	1 (%1)	2 (%2.50)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 (%1)	1 (%1.25)
<i>Hymenolepis nana</i>	2 (%2)	4 (%5.)
<i>Taenia spp.</i>	1 (%1)	1 (%1.25)
<i>Trichuris trichiura</i>	--	2 (%2.50)
<i>Cryptosporidium parvum</i> + <i>Giardia intestinalis</i>	2 (%2)	--
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Hymenolepis nana</i>	--	2 (%2.50)

Çalışmada tespit edilen 4 cryptosporidiosisli hasta Şanlıurfa yöresinin farklı yerleşim yerlerinde yaşıyorlardı ve herbirinin immüsupresyona neden olan farklı patolojileri vardı (Tablo 6).



**Tablo 6.** Cryptosporidiosisli 4 hastanın sosyo-demografik özellikleri ve *Cryptosporidium* açısından dışkı numunelerine uygulanan testlerin sonuçları.

	1. Hasta	2. Hasta	3. Hasta	4. Hasta
Yaş (yıl)	6	47	2	48
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Kadın	Kadın
İkamet ettiği yer	Uluköy-Şanlıurfa	Yumurталık köyü-Suruç	Şanlıurfa-Merkez	Viranşehir-Merkez
Kullandığı su	İşlenmiş	İşlenmemiş (Kuyu suyu)	İşlenmiş	İşlenmiş
Hayvan teması	Var (Sığır)	Yok	Yok	Yok
Aile nüfusu	Kalabalık	Tenहा	Tenहा	Tenहा
Seyahat öyküsü	Yok	Yok	Yok	Yok
İmmüsupresyon nedeni	Akut Myeloid Lösemi (AML)	Non Hodgkin Lenfoma (NHL)	Kalıtısal Metabolik Hastalık (KMH) + IgG3 eksikliği	Kolon Müsinöz Adenokarsinomu
Direkt taze baki sonucu görülen parazitler	Yok	<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Giardia intestinalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Giardia intestinalis</i>
Kinyoun asit fast boyama sonucu <i>Cryptosporidium</i> ookistleri	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
ELISA ile <i>Cryptosporidium parvum</i> koproantijeni	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
DFA yöntemi sonucu	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif

Şanlıurfa ve çevresi (36° 40' ve 38° 02' kuzey enlemi, 37° 50' ve 40° 12' doğu boylamaları arasında, ortalama yükseklik 518 m) yaklaşık 1500000 nüfusu ile Türkiye'nin

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yer alır. Şanlıurfa kontinental iklim özelliği gösterir. Yazları çok kurak ve sıcak, kışları bol yağışlı nispeten ılıman geçmektedir. Gece ile gündüz ve yaz ile kış ortalama sıcaklıkları arasında büyük farklar vardır. Çalışma süresi boyunca Şanlıurfa yöresinde Şanlıurfa Bölgesi Meteoroloji Müdürlüğü tarafından tespit edilen meteorolojik veriler Tablo 7’de gösterilmektedir. Cryptosporidiosisli 4 hastanın gaita numunelerinde saptanan *Cryptosporidium* türlerinin tespit edildiği tarihler ise Tablo 8’de görülmektedir.

**Tablo 7.** Çalışma süresi boyunca tespit edilen aylık meteorolojik parametreler.

Aylar	Aylık ortalama sıcaklık (°C)	Ortalama nisbi nem (%)	Yağış toplamı (kg/m <sup>2</sup> )	Yağışlı gün sayısı
Ağustos 2009	30.6	29.8	--	--
Eylül 2009	25.1	38.9	6.9	2
Ekim 2009	22.0	40.1	76.6	7
Kasım 2009	12.2	62.6	35.5	10
Aralık 2009	10.1	73.4	121.2	14
Ocak 2010	8.4	68.8	95.7	15
Şubat 2010	9.1	67.4	23.5	10
Mart 2010	13.8	55.7	42.7	6
Nisan 2010	17.4	46.7	26.2	7

**Tablo 8.** *Cryptosporidium parvum*’ların tespit edildiği tarihler.

Hasta No	<i>Cryptosporidium parvum</i> ’ların tespit edildiği tarih
1.	Nisan 2010
2.	Aralık 2009
3.	Nisan 2010
4.	Kasım 2009

1, 2 ve 4 nolu hastalar nötrojenik ve lenfopenik iken 3 nolu hastanın lenfosit ve nötrofil sayıları normaldi. Sonradan IgM, IgA ile total IgG ve IgG subtipleri incelenen 3. hastanın IgG3 düzeyleri normal değerlerin altında saptandı. Cryptosporidiosisli 1 nolu hastanın, Kinyoun asit-fast boyama sonucu negatif olduğundan ve ELISA sonucu sonradan çalışıldığından dolayı hastanın tedavisi semptomatik yapıldı. 2. nolu hastanın tedavisi

klaritromisin ile, 3 nolu hastanın tedavisi azitromisin ile yapılırken 4 nolu hasta, gaita numunesinde *Cryptosporidium* oookistleri tespit edildiği gün öldü (Tablo 9).

**Tablo 9.** Cryptosporidiosisli hastalarda gözlenen klinik belirtiler, bazı biyokimyasal test sonuçları ve hastalık seyri.

	1. Hasta	2. Hasta	3. Hasta	4. Hasta
Semptomlar	Karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal, ateş, iştahsızlık	Karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal, ateş, iştahsızlık	Karın ağrısı, ishal, ateş, iştahsızlık.	Karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal, iştahsızlık kilo kaybı
Dışkılama sayısı ve ishal paterni	8/gün, sulu	15/gün, şiddetli ve sulu	8/gün, sulu	10/gün, sulu
Takip ve tedavi edildiği kurum	HÜTF-Çocuk hematoloji servisi	ŞEAH-Göğüs hastalıkları servisi	ŞÇSH-Pediyatrik nöroloji servisi	ŞEAH-Onkoloji servisi
Lökosit sayısı (/mm <sup>3</sup> )	164	900	9000	590
Lenfosit (/mm <sup>3</sup> )	94	125	5800	430
Nötrofil (/mm <sup>3</sup> )	56	685	3100	130
Na (mmol/L)	136	99	131	131
K (mmol/L)	3.2	3.2	3.5	3.7
Cl (mmol/L)	103	76	99	100
Hastalara ishal nedeniyle tedavi yaklaşımı ve hastalığın seyri	İshalin ilk günü sıvı elektrolit replasmanı, 8. gün klinik düzelme.	Sıvı elektrolit replasmanı, Ciprofloksasin + Klaritromisin flakon, yaklaşık 2 ay sonra ölüm.	Oral rehidratasyon solüsyonu, Azitromisin 10 gün oral, 5. gün klinik, 10.gün parazitolojik düzelme.	Sıvı-elektrolit replasmanı, potent opiyat kullanımı, hastaneye yatıştan 1 gün sonra ölüm.

## 5. TARTIŞMA

Cryptosporidiosis prevalansının az gelişmiş ülkelerde, immun sistemi baskılanmış hastalarda, ishallerde, malnütrisyonlu ve gastroenteritli çocuklarda, huzurevi ve çocuk yuvası gibi toplu ve kalabalık yaşanan yerlerde, hayvanlarla yakın teması olanlarda, sıcak ve nemli mevsimlerde yüksek olduğu bildirilmektedir (135, 136).

Cryptosporidiosis özellikle HIV ile enfekte olan bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde AIDS kliniği gelişmiş bireylerin %60'ında ishal bildirilirken gelişmekte olan ülkelerde bu oran %95'lere ulaşmaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ishal etkeni olarak birçok patojen saptanabilirken yapılan çalışmalarda ABD'de bu olguların %16'sında, gelişmekte olan dünya ülkelerinde ise yaklaşık %50'sinde ishalden *Cryptosporidium* türlerinin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (15-17). Bununla birlikte yüksek derecede aktif antiretroviral tedavi (HAART)'de PIs'nin kullanıma girmesi ile AIDS hastalarında cryptosporidiosis insidansı batı ülkelerinde büyük ölçüde düşmüştür (137).

Primer immun yetmezliği olan hastalar arasında *Cryptosporidium* enfeksiyonuna olan duyarlılık; CD40L eksikliğinin olduğu XHIM'i ve CD40 yetmezliğinin görüldüğü HIGM3'ü olan ve yine primer CD40 lenfopenisi, ağır kombine immun yetmezlik sendromu ve IFN- $\gamma$  eksikliği olan çocuklarda gözlenmektedir (4-6). Akut lösemi gibi sekonder immun yetmezlik durumlarında da enfeksiyon riskinde artma olduğu belirlenmiştir (7).

1982 yılına kadar daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış grubun enfeksiyonu olarak bilinen cryptosporidiosis özellikle laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle bağışıklık sistemi sağlam toplumlarda da salgınlara yol açtığı saptanmıştır (22).

Ülkemizde cryptosporidiosis ile ilgili ilk çalışma 1987 yılında Özcan ve arkadaşları tarafından Adana'da yapılmış ve ishallerde çocuklarda %8.2, ishallerde olmayan çocuklarda %4.10 olarak saptanmıştır. Sonraki yıllarda gerek bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda artış, gerekse yeni laboratuvar tanı yöntemlerinin uygulanmaya başlanması ile bu enfeksiyona

yönelik çalışmalarda artış olduğu görülmüştür. Ülkemizde değişik hasta gruplarında *Cryptosporidium* oookistleri araştırılmış ve farklı sonuçlar bildirilmiştir (22).

Över'in İstanbul'da ishalleri 480 yetişkin ve çocuğu kapsayan çalışmasında *Cryptosporidium* prevalansı %2.50 olarak saptanmasına rağmen bu oranın 3 yaşın altındaki çocuklarda %9.50'e yükseldiği ve yetişkin populusyona göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (115). Mülazımoğlu ve arkadaşlarının İstanbul'da 5 yaşın altındaki ishalleri 73 çocuğa ait gaita numunelerinde yaptığı çalışmada sadece 1 çocuğa ait gaita numunesinde (%1.36) *Cryptosporidium* oookisti saptanmıştır (138).

Üner ve arkadaşlarının İzmir'de yaptıkları çalışmada 0-6 yaş grubundaki 427 tane çocuktan ancak bir tanesinde (%0.16) *Cryptosporidium* oookistlerine rastlanmıştır (139). İzmir'de Turgay ve arkadaşları Ekim 2003-Ekim 2004 tarihleri arasında hem cyclosporiasisin insidansının incelenmesi hem de mevsimsel faktörler ve hasta faktörleri ile cyclosporiasis arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla gastrointestinal semptomları olan 4660 hasta ve atopik dermatit, ürtiker veya kaşıntı gibi alerjik semptomları bulunan 326 hastanın dışkı numuneleri Kinyoun modifiye asit-fast boyası ile incelenmiş, bu boyama yöntemiyle 4986 hastanın 23 (%0.46)'ünde *Cyclospora cayatenensis* oookistlerine rastlanırken 27 (%0.54)'ünde ise *Cryptosporidium* spp oookistlerine rastlanmıştır (140). Yine Türk ve arkadaşlarının İzmir'de yaptığı çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarına gelen 4322 dışkı örneğinde bağırsak parazitleri araştırılmış *Cryptosporidium* spp. sıklığı %0.42 olarak bulunmuştur (141).

Yazar ve arkadaşları bir çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran 34883 hastanın dışkı numunelerine önce nativ-lüğüol ve flotasyon / sedimentasyon yöntemlerini uygulamışlar ve x20 ve x40 büyütmede incelemişlerdir. Bu sırada *Cryptosporidium* oookistleri yönünden şüpheli görülen dışkı numunelerini de asit-fast boyama yöntemi ile boyamışlar ve yalnız 1 hastada (%0.003) *Cryptosporidium* spp. saptamışlardır (142). Yine Sivas'ta ishalleri olgularda yapılan iki ayrı çalışmada %19.8 ve %11.8 oranında *Cryptosporidium* oookistlerine rastlanmıştır (22)

Doğancı ve arkadaşlarının Ankara'da yaptığı çalışmada rastgele seçilen 50 çocukta çeşitli yöntemlerle (direkt mikroskopi, modifiye asit-fast boyama, Kinyoun asit-fast boyama ve korbol-fuksin boyama) *Cryptosporidium* spp. araştırılmış 2 (%4) gaita numunesinde pozitif sonuç elde edilmiştir (143). Şener ve arkadaşlarının bir çalışmasında, 1980-1996 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarı'na gelen 32582 dışkı örneğinin araştırılması sonucu 45 (%0.13) gaita numunesinde *Cryptosporidium* spp.

ookistlerine rastlanmıştır. Malatya’da ishallerde yapılan benzer bir çalışmada 500 dışkı örneği Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile incelenmiş ve incelenen örneklerin %1.6’sında *Cryptosporidium* türlerine rastlanmıştır. Yine Antalya’da Ögünç ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada ishallerde çocuklarda %0.97, Doğan ve arkadaşlarının Eskişehir’de gerçekleştirdiği çalışmada ishallerde çocuklarda %3.6 sıklıkta *Cryptosporidium* spp. ookistleri tespit edilmiştir (22).

Dünyadaki diğer bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bangladeş’de yapılan bir çalışmada gastrointestinal şikayetli 578 hastanın %4.3’ünde *Cryptosporidium* spp. saptanmış, bu parazitin meydana getirdiği enfeksiyon oranında yılın sıcak ve nemli ayı olan Mart ayında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (144). Kosta Rika’da ishallerde 278 hastanın 12 (%4.3)’ünde Giemsa boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* enfeksiyonu görülmüş, yılın sıcak, yağmurlu ve nemli aylarında olgu sayısının giderek artış gösterdiği bildirilmiştir (145). Fransa’da ishal nedeniyle hastaneye başvuran 190 çocuğun %2.1’inde, ABD’de ishal yakınması olan 1703 hastanın %2.8’inde Yeni Zelanda’da ishallerde olan 36 çocuğun %22’sinde, Avustralya’da ishal nedeniyle hastaneye yatırılan 884 çocuğun %4.1’inde parazite ait ookistlerin olduğu tespit edilmiştir. Yine Kanada’da 621 ishallerde hastanın %1.2’sinde, İspanya’da gastrointestinal şikayeti olan 339 hastanın %0.9’unda, Brezilya’da semptomatik 117 hastanın %8’inde *Cryptosporidium* ookistlerinin saptandığı bildirilmiştir (75).

Yukarıda gerek ülkemizdeki çeşitli illerde gerekse dünyadaki farklı ülkelerde *Cryptosporidium* spp.’nin görülme sıklığını gösteren çalışmalarda farklı sonuçlara; çalışılan populasyon sayılarının değişkenliği, çalışma yapılan bölgenin coğrafik konumu ve seçilen çalışma grubundaki farklılıklar neden olabilir. Aynı zamanda örnekleri çalışan personelin deneyimi de sonuçların farklı olmasında önemli bir etkidir. Zira mikroskopik çalışmalar eğitilmiş personele ihtiyaç gösteren ve kişisel deneyim gerektiren çalışmalardır.

Tümer ve arkadaşlarının yürüttüğü Şanlıurfa yöresinde *Cryptosporidium* spp.’ye yönelik ilk kez yapılan retrospektif bir çalışmada, Ağustos 2006- Ağustos 2009 tarihleri arasında HÜTF Parazitoloji Laboratuvarı’na dışkının parazitolojik incelenmesi için gönderilen toplam 16050 gaita numunesinin 18 (%0.46)’inde Kinyoun asit -fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin görüldüğü bildirilmiştir (146).

Çalışmamızda gastrointestinal şikayeti olan 80 immün sistemi sağlam kontrol hastasının dışkı numunelerinde Kinyoun asit-fast boyama ve ELISA yöntemlerinin her

ikisiyle de *Cryptosporidium* spp. tespit edilemedi. Bu grupta çalışılan hasta sayısının düşük olması, şehir merkezinde yaşayan hasta sayısının (%81) fazla olması, hayvanlarla temas eden hasta sayısının (%16) az olması, şehre işlenmiş içme suyu sağlayan su arıtma tesislerinde konvansiyonel arıtma işlemlerinin uygulandığı suyu ve şişe suyu kullanan hasta sayısının (%88) fazla olması ve en önemlisi ishalleri hasta sayısının (%38) düşük olması bizim parazite rastlayamama nedenimizi açıklayabilir. Ayrıca hastalardan toplanan gaita örneklerinin çoğunluğunun (%62) Şanlıurfa yöresinin en soğuk olduğu Ocak-Mart ayları arasında toplanmış olması, yine bu grupta 0-2 yaş arasında bulunan toplam 19 hasta çocuğun 15 (%78)'inin anne sütü ile besleniyor olması da parazitin saptanamamış olma sebepleri arasında gösterilebilir.

Çalışmada, immunsuprese olan grupta dışkı numunesinde *Cryptosporidium parvum* antijeni tespit edilen 1 nolu hasta, 6 yaşındaydı ve yaklaşık 1 aydır AML tanısı almıştı. Kanser tanısı aldıktan sonra köylerinde kullanılan kuyu suyu yerine şişe suyu kullanmaya başlayan hasta, içme dışındaki su ile ilgili tüm faaliyetlerini yine köydeki su ile yapıyordu. Hasta, en son kemoterapi tedavi kürünü 8 Nisan 2010 tarihinde aldı ve taburcu edildi. Ancak 11 Nisan'da alt ve üst ekstremitelerinde ekimoz, göz içinde kanama ve gastrointestinal yakınmalarının olması nedeniyle HÜTF Çocuk Hematoloji Servisine yatırıldı. Şanlıurfa'ya bağlı merkez köyde oturan ve kalabalık bir nüfusa sahip ailenin mensubu olan, oturduğu evin bahçesinde sığırların yaşadığı hastanın gaita numunesi *Salmonella*, *Shigella*, Rotavirus, Adenovirus ve bağırsak parazitleri açısından incelendi. Hastada bu incelemeler sonucu herhangi bir patojen saptanamadı. Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile de *Cryptosporidium* spp. ookistlerine rastlanmaması üzerine hastanın ishallerine yönelik semptomatik tedavi başlandı. Yaklaşık 2 hafta sonra hastanın -20° C'de saklanmış dışkı numunesine uygulanan ELISA yöntemiyle hastanın dışkı numunesinde *Cryptosporidium parvum*'a ait antijenler tespit edildi.

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) da bulunan NHL'lı 2 nolu hastanın muhtemelen aşırı dehidratasyondan dolayı Na ve Cl seviyeleri çok düşüktü. Hasta köyde yaşıyordu ve kuyu suyu kullanıyordu. Hastanın dışkı numunesinin direkt taze bakışında *Giardia intestinalis* kistlerine rastlandı. Hem Kinyoun asit-fast boyama hem de ELISA yöntemleri ile *Cryptosporidium* enfeksiyonu saptanan hastaya kısa süre önce KOA alevlenmesi nedeniyle intravenöz klaritromisin ve siprofloksasin başlanmıştı. Hasta yaklaşık 2 ay sonra öldü.

Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve prognozunu araştıran farklı çalışmalar olmuştur. Sreedharan ve arkadaşları Hindistan'da kanserli ve ishali 560 hastanın 7 (%1.3)'sinde *Cryptosporidium* spp ookistleri bulmuş, bu 7 hastanın 5'inin hematolojik malignensili hastalar olduğu bildirilmiştir (147). Nahrevanian ve arkadaşları İnan'da immunsuprese 214 hastanın gaita numunelerinde, asit-fast boyama, auromin floresan boyama ve direkt floresan antikor yöntemleri ile *Cryptosporidium* spp araştırmışlar ve 43 hematolojik malignensili hastadan sadece 1 (%2.3)'inde (AML hastası) bu parazite rastlandığını bildirmişlerdir. İnfekte olmuş bu AML hastasında ishal 18 gün boyunca devam etmiş ve kombine immunsupresif tedavinin kesilmesinden sonra durmuştur (148).

Avustralya'da Burgner ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, ishali ve hematolojik sistem malignitesi olan 63 hastanın gaita numunelerinde Modifiye Zeihl-Neelsen boyama ile *Cryptosporidium* ookistleri incelenmiş, 63 hastanın 15 (%23.8)'inde *Cryptosporidium* ookistleri grlmştir (149).

Lewis ve arkadaşları ALL'li bir çocukta immunsupresif tedavi boyunca cryptosporidiosisin rekürrensini tanımladılar. Enfeksiyon, enfekte bir kedi yavrusuyla kontakdan sonra meydana gelmiş ve enfeksiyon umulduğundan daha az şiddetli bir seyir izlemiştir. Hasta, enfeksiyondan immunsupresif tedavinin bırakılmasından sonra kurtulmuştur (150). Stine ve arkadaşları ALL'li bir çocukta kendiliğinden düzelen cryptosporidiosisin neden olduğu şiddetli ishali tanımladılar(151). Yine Foot ve arkadaşları Bristol'de lenfomalı (1 hasta) ve lösemili (5 hasta) 6 cryptosporidiosis'e sahip ocuk vakalarını tanımladılar. Bu hastalardan 2'si persistan enfeksiyonun kanıtı olarak öldüler. Diğer 4 hastada kemoterapi rejimlerinin değiştirilmesinin, patojenin başarılı bir şekilde eradikasyonu ile ilişkili olduğunu belirttiler (152).

Sönmez Tamer ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada lösemi ve lenfoma hastası olan ve ishali bulunan 89 çocuktan 11 (%12.3)'inin cryptosporidiosis tanısı aldığı bildirilmiştir (153). Bununla birlikte Adana'da Taşova ve arkadaşlarının yürüttüğü, hematolojik malignensili hastalarda *Blastocystis hominis*'in sıklığının ve klinik öneminin araştırıldığı çalışmada aynı zamanda hastaların dışkı numunelerine *Cryptosporidium* spp açısından modifiye Ziehl -Neelsen ve Shather's flotation metotları da uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilen ve kemoterapi alan hematolojik malignensili 206 erişkin hasta, tedavilerinin ntrogenik sürecinde karın ağrısı, ishal, şişkinlik ve gaz gibi gastrointestinal şikayetleri olan hastalardı. Kontrol grubunu ise gastrointestinal şikayetleri olan ve hematolojik malignitesi olmayan 200



hasta oluşturdu. Çalışmada her iki grupta da *Cryptosporidium* oookistleri tespit edilemedi (154).

Bizim çalışmamızda ise 30 hematolojik kanserli hastanın 2 (%6.6)'sinde *Cryptosporidium parvum*'a rastlandı. 1 nolu hastada cryptosporidiosis kliniği hasta nütropenik dönemde olmasına rağmen intravenöz sıvı-elektrolit replasmanı ile 8. gün düzeldi. 2 nolu hastada ise hastalık kronikti ve hayatı tehdit eden ishalle ilişkili idi.

*Cryptosporidium* oookistlerini araştırmak amacıyla mikroskopta direkt arama yöntemlerinin duyarlılığı düşük olabildiği gibi, mikroskobi yapan kişinin tecrübesine göre değişebilen ve uzun zaman gerektiren yöntemlerdir. Çoklaştırılmış dışkı örnekleri kullanılarak hazırlanan dışkı sürüntülerinin boyandıktan sonra mikroskopta *Cryptosporidium* oookistlerinin saptanması sık kullanılan bir uygulamadır. Modifiye asit-fast boyama, Kinyoun asit-fast boyama ve Ziehl-Neelsen asit-fast boyama yöntemleri, *Cryptosporidium* oookistlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan boyama yöntemleridir. Çalışmada kullandığımız Kinyoun asit-fast boyama yöntemi; düşük maliyet, kullanım kolaylığı, özel mikroskoba gerek duymaması ve aynı anda örnekte *Isospora* ve *Cyclospora* gibi diğer patojenlerin olup olmadığının da saptanmasına imkan verdiği için gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Cryptosporidiosis dışkı örneklerinden immunolojik testlerle *Cryptosporidium* antijenlerinin saptanması ile de teşhis edilebilir. Antijen saptamaya dayalı ELISA'lar 1990'dan bu yana *Cryptosporidium* tanısında kullanılmaktadır. Boyama yöntemleri ile ELISA yönteminin cryptosporidiosis tanısında birbirlerine olan üstünlüklerini tespit etmek için birçok çalışma yapılmıştır.

Silva ve arkadaşlarının Brezilya'da 52 HIV/AIDS hastasında safranin, metilen mavisi ve modifiye trichrome boyama ve ELISA yöntemleri kullanarak gaitada *Cryptosporidium* spp. aradıkları çalışmada, kontrol grubu olarak da 38 sağlıklı kişi seçilmiştir. Boyama yöntemi ile 52 hastanın 3 (%5.8)'ü pozitif tespit edilirken ELISA ile 52 hastanın 4 (%7.7)'ü pozitif tespit edilmiştir. 3 hasta hem boyama hem de ELISA yöntemiyle pozitif bulunurken kontrol grubundaki kişilerin hiçbirinde parazit tespit edilmemiştir (107).

Jayalakshmi ve arkadaşlarının ishelli ve HIV seropozitif hastalardan toplanan toplam 89 gaita örneğine *Cryptosporidium* spp.'ye yönelik modifiye asit-fast boyama ve ELISA yöntemlerini uygulamışlar, 89 gaita örneğinin 11 (%12.4)'i mikroskobi ile pozitifken ELISA ile yalnızca 10 (%11.2)'u pozitif tespit edilmiştir. ELISA ile pozitif sonuç veren 10 gaita

örneği mikroskopi ile de pozitif sonuç vermiştir. ELISA ile pozitif saptanamayan 1 gaita örneğinin, 0.01 ml'sinde 5 ookistten daha az ookist ihtiva etmiş olabileceği ve ELISA'nın bu durumda tespit etmede başarısız kalmasının muhtemel olacağını bildirmişlerdir (155).

El Shazly ve arkadaşları Mısır'da yaptıkları bir çalışmada ishalleri 1050 çocuğun dışkı numunesinin 90 (%8.5)'inde modifiye asit-fast boyama ile ookist saptarken ELISA yöntemi ile ise 100 (%9.5)'ünde *Cryptosporidium* antijeni tespit edildi (156).

Direkel ve arkadaşları Malatya'da 92 dışkı örneğinde ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium parvum* koproantijenlerini ve modifiye Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle ookistleri araştırmış ve 5 dışkı örneğinde hem ELISA hem de boyama yöntemiyle pozitif sonuç elde etmişlerdir (157).

Yılmaz ve arkadaşları Van'da yaptıkları çalışmalarında yaşları 0-15 arasında olan ishalleri 2000 çocuktan dışkı örnekleri almışlar ve bunları modifiye asit-fast boyama ve ELISA yöntemiyle incelemişler, ELISA ile 2000 çocuğun 97 (%4.9)'sinde *Cryptosporidium* antijeni saptanırken boyama ile sadece 39 (%1.9)'unda *Cryptosporidium* ookistleri görmüşlerdir (158).

Sönmez Tamer ve arkadaşları, lösemi ve lenfoma tanısı almış ve ishalleri olan 89 çocukta cryptosporidiosis prevalansını Kinyoun asit-fast boyama ve ELISA yöntemleri ile araştırmışlar; ELISA ile 89 hastanın 11 (%12.3)'i, boyama ile 7 (%7.8)'si cryptosporidiosis tanısı almıştır. Boyama ile pozitif olan 7 hastanın tamamının ELISA yöntemi ile de pozitif olduğu belirtilmiştir (153).

Bizim alışmamızda ise immunsuprese olan ve gastrointestinal şikayetleri bulunan 100 hastanın dışkı örnekleri *Cryptosporidium* spp. açısından Kinyoun asit-fast boyama ve *Cryptosporidium parvum* koproantijenleri açısından ELISA yöntemleri ile incelendi. 4 dışkı numunesi ELISA ile pozitifken bu dört dışkı numunesinden 3'ü boyama ile de pozitif. *Cryptosporidium parvum* antijenleri yönünden ELISA yöntemiyle pozitif saptanan 4 numune DFA yöntemi ile de pozitif sonuç verdi. 1 nolu hastanın boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden negatif olmasını dışkı numunesinde yetersiz sayıda ookist bulunmasına, aralıklı olarak atılan veya değişken olarak boyanabilen küçük boyutlu ookistlerin varlığına bağlamaktayız. Yine asit-fast boyalar ile preparattaki tüm ookistlerin boyanmaması da 1 nolu hastaya boyama ile cryptosporidiosis tanısı koyamamış olmamızın bir başka sebebi olabilir. Diğer taraftan ELISA'nın 1 nolu hastada cryptosporidiosis tanımlayan

sonucu, bu ELISA yönteminin parazitin ekstrasellüler yaşam siklusunun bir bölümündeki serbest antijenleri bulmaya dair yeterliliğini ifade ettiği düşüncesindeyiz. Enfekte olmuş bir kişide parazitin farklı yaşam siklusu evrelerinde farklı antijenler olabileceğinden dışkıda sağlam organizmaların varlığına dayanmayan bu ELISA yöntemi, örnek toplama sırasında ookistleri aktif olarak atılmayan kişilerin tanımlanmasında önemli olabilir.

*Cryptosporidium* spp. enfekte insan ve hayvan dışkısından çevreye yayılmakta, insandan insana ya da hayvandan insana bulaşabilmekte, bu siklus içinde direkt ya da indirekt yollarla gıda maddeleri veya yeraltı suları bu mikroorganizma ile kontamine olabilmektedir.

Bulaşma yollarının anlaşılmasında en önemli zorluk *Cryptosporidium* türlerini birbirinden ayırt etmeyi sağlayacak morfolojik farklılıkların bulunmayışıdır. Başka bir problem de taksonomideki belirsizliklerdir. Bu durum insanlarda hastalık yapan türlerin tam olarak sayısının saptanamamasına neden olmakta ve salgın veya sporadik bir olgudan sorumlu türü ayırt edebilecek özelliklerdeki farklılıkların tespit edilmesini zorlaştırmaktadır.

Çoğu Avrupa ülkesinde kontamine içme sularının dağıtımını yasalarla engellenmiş olmakla beraber parazitin varlığına yönelik düzenli araştırmalar, İngiltere dışında yapılamamaktadır. Su ile ilişkili salgınlarda *Cryptosporidium hominis* ve *Cryptosporidium parvum* tip II, hem içme sularında hem de mineralli su kaynaklarında PCR yöntemi (nested PCR) ile saptanmıştır (61).

Almanya'da kum ile filtre edilmiş kullanım sularının %90'ında ve 9 yüzey suyunun 7'sinde *Cryptosporidium* saptanmıştır (159). Güney Almanya, İsviçre ve Avusturya'da yapılmış tek bir çalışmada içme sularının üçte birinde *Cryptosporidium* saptanmıştır. İskoçya salgınında filtrelenmiş ve klorlanmış suyun dağıtımında rekontaminasyon olduğu saptanmıştır. Bir basınç deposunun yıllarca önce mühürlendiği, fakat açık unutulmuş bir boru olduğu saptanmıştır. Bu borunun yakın çevresinde bulunan toprakta, *Cryptosporidium* ookistleri içeren sığır gübresi saptanmış, bu suyu kullananlardan 27 kişide ookist saptanmış, bunlardan 21'i destek tedavisi almıştır (160).

ABD'de bilinen en önemli su kaynaklı salgının 1993'de Milwaukee'de yaşandığı bildirilmektedir. Bu şehirde yaşayan AIDS'li kişilerin yarısının bu parazit ile enfekte olduğu ve 68'inin 6 ay içinde yaşamlarını yitirdiği ifade edilmektedir. Milwaukee salgını, 403000 kişinin etkilendiği ABD'de kaydedilen en büyük salgındır. Milwaukee bölgesinde 1993 Nisan ayında sağlık otoriteleri tarafından gastrointestinal şikayetlerde ani bir artış saptanmış, ancak bölgedeki laboratuvarlar tarafından belirli bir enterik patojen sıklığında artış bildirilmemiştir.

Bölgenin içme suyunun, her ikisi de Michigan gölünden beslenen 2 adet su deposundan sağlandığı belirlenmiş, güneydeki depoda *Cryptosporidium* ookistleri tespit edilmiştir (161, 162).

Yurt dışından bildirilen su kaynaklı *Cryptosporidium* salgınlarının yanı sıra, ülkemizde de benzer salgınların var olabileceği ancak bu konuda daha fazla bildirim ihtiyacı duyulduğu düşünülmektedir. Mevcut bilgilere göre Türkiye’de bildirilen ilk su kaynaklı cryptosporidiosis salgınının bildirildiği, Şahin ve arkadaşlarının İzmir’in Buca ilçesine bağlı bir köyde yaşayan ve ishali olan 191 köylüye ait dışkı örneklerinin Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle değerlendirildiği çalışmada; 191 hastanın 15 (%7.9)’inde *Cryptosporidium* spp. , biri *Cryptosporidium* spp. ile birlikte olmak üzere 9 *Cyclospora cayatenensis* tespit edilmiştir. Yoğun yağış ile birlikte ortaya çıkan bu salgında, olası şüpheli kaynağın köye su sağlayan kontamine şebeke suyu deposu olduğu düşünülmüştür (163).

Ülkemizde sulara yapılan ilk parazitolojik çalışma ise 1997-1999 yılları arasında İstanbul’da Kağıthane, Büyükçekmece, Ömerli ve Elmalı barajlarında yapılmıştır. Bu barajlardan temin edilen 40 ham su örneği *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia intestinalis* yönünden incelenmiş ve örneklerin hiçbirinde *Giardia* kisti ve *Cryptosporidium* ookistinin tespit edilmediği bildirilmiştir (164).

Çeber ve arkadaşları Mersin il merkezi ve çevresinde içme (44 örnek), kuyu (2 örnek), atık (19 örnek) ve deniz (35 örnek) sularından alınan toplam 100 örneği *Cryptosporidium* ookisti açısından Kinyoun asit-fast boyama ve auramin-O ile boyamışlar; içme sularında 5, kuyu sularında 1, deniz suyu örneklerinde 1, atık sulara ise 4 örnekte *Cryptosporidium* ookisti saptamışlardır (165).

Çalışmamızda evlerinin bahçesinde sığır beslenen 1 nolu hastada *Cryptosporidium parvum*’un muhtemel bulaşının hayvan kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Parazit ya direkt hayvan dışkısına temas ile alınmış veya dolaylı olarak hayvan dışkısıyla kontamine olmuş besinler ya da kullanım suyu ile alınmış olabilir. Köyde kuyu suyu kullanan 2 nolu hastada ise muhtemel bulaşın su kaynaklı bir bulaş olduğu kanısındayız.

Kalıtsal metabolik hastalığı olan 3 nolu hasta 2 yaşında idi. Hasta 3 hafta önce ŞÇSH’de pnömoni ve solunum yetmezliği nedeniyle yaklaşık 10 gün tedavi görmüştü. Taburcu olduktan sonra gastrointestinal şikayetleri olan hastanın incelenen dışkı numunesinin ELISA ve Kinyoun asit-fast boyama sonucuna göre hastaya cryptosporidiosis teşhisi konuldu. Hastanın kusmasının olmaması, oral beslenebilmesi ve hastanın yakınlarının isteğiyle de hasta

ayaktan tedavi aldı. Birlikte yaşadığı ailesi ve akrabalarından alınan dışkı numunelerinin hiçbirinde *Cryptosporidium* spp'ye rastlanmadı. Hastanın yapılan Ig testleri sonucunda IgG3 seviyelerinde yetmezlik tespit edildi.

Koturoğlu ve arkadaşlarının İzmir'de 118 akut ishelli çocukta modifiye asit-fast boyama yöntemi kullanarak yaptığı çalışmada *Cryptosporidium* spp. oranı %13.5 olarak bulunmuştur. *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiş hastaların birinde hipogamaglobulinemi, birinde de IgG3 eksikliği saptanmıştır (166).

*Cryptosporidium parvum*'a karşı antikorlar enfekte konağın kolostrum ve kanında saptanabilmiştir. Ookist atılımındaki azalmanın 23-27 kDa ve 15-17 kDa'luk antijenlere karşı oluşan antikorlarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Toyoguchi ve arkadaşları 27 kDa'luk antijenin serum IgG, 15 kDa'luk antijenin ise tükürükteki IgA antikorlarıyla güçlü reaksiyon verdiğini saptamışlardır (167).

Primer immün yetmezlikli hastalarda bakteriyel ve fırsatçı enfeksiyonlar yaşamın ilk yıllarında başlar. Özellikle XHİM'i ve HİGM3'ü olan hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları ağır safra yolu hastalıklarına veya karaciğer kanserine yol açabilir. XHİM'in olası ve kuvvetle olası tanı kriterleri içerisinde *Cryptosporidium* ile ilişkili ishal de yer almaktadır. Yine MHC klas II eksikliğinin görüldüğü hastalarda *Cryptosporidium*'a bağlı uzamış ishal görülür (168).

Kusnierz ve arkadaşları, Warsaw'da seçilmiş primer immün yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun uzun dönem inceleme sonuçlarını sunmuş ve enfekte olan çocuklarda cryptosporidiosisin kompleks durumunu belirlemişlerdir. 1980-2006 yılları arasında primer immün yetmezlikli 987 hastadan 5 XHİM ve 1 CD4 lenfopenili hasta incelenmiştir. Hem modifiye Ziehl-Neelsen boyama tekniği ve DFA hem de PCR ile gaita ve/veya safra örnekleri incelenen 6 hastanın 4'ünde *Cryptosporidium* türleri tespit edilmiştir. Çalışmadaki bu 4 enfekte vaka arasında PCR ile üç farklı parazit türü; *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium hominis* ve *Cryptosporidium parvum*'un identifiye edildiği, bu çalışmada 2 çocukta görülen enfeksiyonun sklerozan kolanjitin klinik gidişatıyla korele olduğu, 6 hastanın 2'sinde ölümün gerçekleştiği, diğer 4 çocuğun primer sorunun çözümü için uygun bir vericiden hematopoetik kök hücre transplantasyonunun gerçekleştirilmesini bekliyor oldukları bildirilmiştir (169).

Çalışmada KMH'si olan 3 nolu hastanın düşük IgG3 düzeylerinin tespit edilmesi durumu, bizde *Cryptosporidium* spp. saptanan olgularda immün sistem analizinin yapılması ile immün bozuklukların saptanabileceği düşüncesini uyandırdı.

*Cryptosporidium* spp'nin bulaşmasında yiyeceğin rolü pek açık değildir. *Cryptosporidium* ookistleri birkaç gıda maddesinden izole edilmiştir. Bunlar esas olarak sebze, meyve ve kabuklu deniz ürünleridir. Endüstrileşmiş ülkelerde yiyeceğin direkt olarak hayvanlar veya yiyecek hazırlayan kimselerden kaynaklanan dışkı materyali ile kirletilmesi nedeniyle, birkaç yiyecek kaynaklı cryptosporidiosis salgını görülmüştür. İnsan enfeksiyonları genellikle kirletilmiş taze ürün ve pastörize edilmemiş elma suyu veya süt tüketilmesine bağlı bulunmuştur. Az sayıdaki olgu kontrol çalışmaları tarafından, hastalığın endemik olduğu bölgelerde *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının kazanılmasında kirletilmiş yiyeceğin bir risk faktörü olarak potansiyel rolü incelenmiştir. Brezilya'daki çocuklarda yapılan bir çalışmada, *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile yiyecek temizliği ya da diyet tipi arasında herhangi bir ilişki gösterilemezken ABD'de *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının %10 kadarının yiyecek kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (73).

Stockholm'de 19 Eylül 2008'de Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol ve Önleme Merkezi 5 Eylül'de bir otel restaurantında düğün yemeğinde bulunan müşteriler arasında bir gastroenterit salgını ile ilgili uyarıda bulunmuştur. Insulander ve arkadaşları ise salgının kaynağını belirleyebilmek için bir retrospektif kohort çalışması başlatmıştır. 5 Eylül'de Stockholm'de restauranttaki evlilik merasiminde bulunan 15 müşteri ve 6 çalışanda 9 ile 14 Eylül tarihleri arasında gastrointestinal semptomlar gelişmiş, müşterilerin 12'sinde çalışanların ise 4'ünde *Cryptosporidium* ookistleri tespit edilmiştir. Çalışmada salgının muhtemel kaynağının bearnaise sosunda bulunan taze maydanos olduğu belirtilmiştir. Maydanosun plastik torbalarda İtalya'dan ithal edildiği ve kullanılmadan önce suda yıkanmadığı bildirilmiştir. Yine maydanos bearnaise sosu ısıtıldıktan sonra eklenmiştir. Bu vakalara ait dışkı numunelerine *Cryptosporidium* açısından PCR-RFLP ile tür tayini yapılmış ve bu vakaların tümünün *Cryptosporidium parvum* olduğu ortaya çıkmıştır (170).

Pönka ve arkadaşları Kasım 2008'de meydana gelen, Finlandiya'da ilk kez *Cryptosporidium parvum*'un neden olduğu besin kaynaklı salgını bildirmişlerdir. Salgının aynı kantinde yemek yiyen bayındırlık işleri bölümü personeli arasında meydana geldiği ve 72 kişinin gastrointestinal semptomlarının olduğu, hastalardan alınan dışkı numunelerinde *Cryptosporidium parvum*'a rastlandığı belirtilmiştir. 18 Kasım'da Besin Kontrol Ünitesi

tarafından gerçekleştirilen retrospektif kohort çalışmasının analizi hastalar ile servis edilen yiyeceklerin herhangi biri arasında önemli bir ilişki göstermezken 19 Aralık'ta gerçekleştirilen farklı bir vaka-kontrol çalışması salata karışımının tüketimine dair olasılık oranını 22.5 olarak bulmuş ve salgının kaynağının karışık bir salata olduğunu bildirmiştir (171).

Bizim çalışmada 4 nolu hasta yaklaşık 3 haftadır gastrointestinal şikayetlere sahiptir. Hastada karın ağrısı, bulantı-kusma, ishal, iştahsızlık ve son bir ayda önemli derecede kilo kaybı mevcuttu. Bu dönem içerisinde hastanın kemoterapi tedavisine devam edildi. Hastanın kolon kanserine bağlı karın içi metastazlarının olması nedeniyle klinisyen tarafından karın ağrısına yönelik potent opiyatlar kullanıldı. Bu arada hastanın ishal şikayetlerinde kısmen düzelme oldu. Bu sırada gastrointestinal şikayetleri açısından hastadan dışkı numunesi alındı. Aynı zamanda 3. hat kemoterapi olan hastanın kemoterapi sonrası genel durumu kötüleşti ve hasta öldü. Hastanın yapılan dışkı incelemesinde *Cryptosporidium* spp oookistlerine ve *Giardia intestinalis* kistlerine rastlandı. Hasta, içme suyu olarak şişe suyu kullanıyordu ve hayvanlarla temas ve il dışı seyahat öyküsü de yoktu. Bu bilgiler ışığında 4 nolu hastaya ait *Cryptosporidium parvum*'un muhtemel bulaş kaynağı kesin bir şekilde söylenemez. Gerek 4 nolu hastanın gerekse diğer 3 cryptosporidiosisli hastanın bulaş kaynağının tespitinin ayrıntılı ve daha ileri çalışmalara gereksinimi olduğu düşüncesindeyiz. Ayrıca hayatı tehdit eden hastalıkla ilişkili olması nedeniyle klinisyenlerin gastrointestinal şikayetleri bulunan her immunsuprese hastadan dışkı numunesi istemeleri ve laboratuvarında özellikle *Cryptosporidium* spp'ye yönelik uygulanan rutin testlerin istemini yapmaları gerektiği kanısındayız.

*Cryptosporidium* spp. sıklığının en fazla olduğu hasta grubu olan HIV/AIDS hastalarında yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. sıklığının %3-39.8 arasında değiştiği görülmektedir. Aralığın bu kadar geniş olması ülkeler arasındaki HIV/AIDS görülme oranları farklılığına, su kaynaklarının kontaminasyon derecelerine ve sosyo-ekonomik düzeylerinin farklılığına bağlı olduğu gibi kullanılan yöntemle de ilgili olabilir.

Tayland'da 156 akut ishalleri HIV ile enfekte hastada yapılan çalışmada %12.8 oranında *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir (172).

Malezya'da Lim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 66 HIV ile enfekte hastanın gaita örneğinde %3 oranında *Cryptosporidium* spp.'ye rastlanmıştır (173).

Adjei ve arkadaşlarının Gana’da 21 HIV/AIDS hastası ve 27 HIV seronegatif kişiyi dahil ettikleri çalışmalarında da HIV/AIDS hastalarında %28.6 oranında *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir (174).

Tuli ve arkadaşları tarafından Hindistan’da ishalleri 336 HIV pozitif hastanın ve ishalleri 200 HIV seronegatif hastanın gaita numuneleri enterik protozoonlar yönünden incelenmiş, 200 HIV seronegatif kontrol hastası HIV pozitif hastaların aile bireylerinden seçilmiştir. Gaita numuneleri modifiye asit-fast, modifiye safranin ve calcoflour white boyama teknikleri ile boyanmış, HIV pozitif hastalarda en sık *Cryptosporidium* spp. (%39.8) ardından da *Microsporidia* spp (%26.7)’ye rastlanmıştır. HIV pozitif hastaların %17.5’inde ise *Cryptosporidium* spp. , *Cyclospora* spp. ve *Mikrosporidia* spp. miks enfeksiyonları görülmüştür. CD4 seviyeleri ishallerin sürekliliği ile ters orantılı iken kronik ishalleri hastaların akut ishalleri hastalardan daha düşük CD4 miktarlarına sahip olduğu da belirtilmiştir. Maksimum parazitik izolasyonun CD4 sayısı 200 hücre/ $\mu$ l’nin altında olan hasta grubunda görüldüğü, *Cryptosporidium* spp’nin kronik ishalleri neden olan en sık görülen protozoon olduğu ve izolasyon oranlarının CD4 hücre sayısında yükselme ile düştüğü tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada HAART’nin klinik olarak olumlu cevabının görüldüğü 134 hastanın immunitésinin normale döndüğü ve antiprotozoal ilaçların etkinliğinin HAART ile arttığı da bildirilmiştir (175).

Bizim çalışmamızda immünyüpresye grupta gastrointestinal şikayetli 2 HIV pozitif hasta vardı. Bu iki hasta karı-koca idi. İki hastanın dışkı örneklerinde direkt taze bakı ile hiçbir parazite rastlanmazken Kinyoun asit-fast boyama ve *Cryptosporidium parvum*’a yönelik ELISA yöntemiyle de *Cryptosporidium* tespit edilememiştir. 38 yaşındaki erkek hastaya yaklaşık 7 ay önce efavirenz, tenofovir ve emtrisitabin antiretroviral kombinasyon tedavisi ile *Pneumocystis jirovecii* profilaksisi için kotrimoksazol, *Mycobacterium avium* kompleks profilaksisi için ise klaritromisin tedavisi başlanmıştı. Hastanın CD4 sayısı 47 hücre/ $\text{mm}^3$  idi.

25 yaşında olan bayan hastada AIDS kliniği yoktu ve CD4 sayısı 925 hücre/ $\text{mm}^3$  idi ve ayrıca herhangi bir tedavi de almıyordu.

HIV pozitif erkek hastanın CD4 sayısı 200 hücre/ $\text{mm}^3$ ’den daha az olmasına rağmen gastrointestinal şikayetlerinin olduğu dönemde gaitasında herhangi bir protozoona rastlanamamasını asıl olarak hastanın antiretroviral tedavi alıyor olmasına ve kotrimoksazol ve klaritromisin ile fırsatçı enfeksiyonlara karşı profilaksi tedavisi başlanmış olmasına



bağlayabiliriz, zira kotrimoksazol *Cyclospora cayatenensis*, *Isospora belli*, *Blastocystis hominis* ve *Microsporidia* spp. gibi protozoon parazitlere karşı etkili bir ajandır. Klaritromisin'in ise Holmberg ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HIV ile enfekte immunsuprese kişilerde cryptosporidiosis'in gelişimine karşı yüksek koruyuculuğa sahip olduğu bildirilmiştir (176).

Noureldin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 100 immun sistemi baskılanmış (53 nefrotik sendromlu, 14 protein-kalori malnütrisyonlu, 8 marasmuslu, 34 lenfomalı hasta) ve ev kontrolü bulunan çocukta T hücre alt kümeleri, CD4 ve CD8'e karşı oluşan monoklonal antikolar işaretlenerek sayılmıştır. Nefrotik sendromlu ve lenfomalı hastalarda Th oranında anlamlı bir azalma, süpresör-T hücrelerde de anlamlı oranda artış gözlemlendiği ifade edilmiştir. *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* ve *Blastocystis hominis*'in bu hasta gruplarında kontrollerden daha sık görüldüğü de bildirilmiştir (177).

Çalışmamızda immunsuprese hastaların *Cryptosporidium* enfeksiyonuna yakalanma oranı ile immunkompetan hastaların *Cryptosporidium* enfeksiyonuna yakalanma oranı arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0.05$ ). Bu durumda immunsupresyonun cryptosporidiosis'e yakalanma açısından immunsuprese grupta immunkompetan gruba göre bir risk oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte immunsupresif hastalarda cryptosporidiosis'in hayatı tehdit eden kronik ishallere neden olduğu gerçeği de göz ardı edilemez. Buradan yola çıkarak konak faktörleri ve immunitenin *Cryptosporidium* enfeksiyonunun prognozunu belirlediği gerçeği çalışmamızda da görülmüştür.

Bu çalışmada dışkı örneklerine *Microsporidium* türlerine yönelik modifiye trikrom boyama veya calcoflour white ile uvitex 2B gibi çeşitli kemofloresan boyama tekniklerinin uygulanmamış olması bu protozoonun çalışma gruplarındaki gözlenen sıklığını belirleyemememize neden olmuştur. Buna rağmen Noureldin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi bizim çalışmada da immunsuprese grupta kontrol grubuna göre protozoonlara anlamlı derecede sık rastlandığı görülmüştür ( $p < 0.05$ ).

Çalışmamızda *Cyclospora cayatenensis* ve *Isospora belli* protozoonlarını saptayamamış olmamızı; ülkemizde antidiareal ajanların serbest bir şekilde reçetesiz olarak alınabiliyor olmasına ve gastrointestinal şikayetleri olan çoğu hastanın ampirik antidiareal ilaç kullanmasına bağlayabiliriz. Ayrıca çalışmamızın önemli bir kısmının geç sonbahar, kış ve erken ilkbahar aylarında yapıldığı göz önünde bulundurulursa dışkı ile atılan immatur *Cyclospora cayatenensis* ookistlerinin sporulasyonu veya matürasyonu için gerekli sıcaklığın

olmaması da çalışmada bu parazite rastlayamamış olmamızın en önemli nedeni olarak görülebilir. Yine de Şanlıurfa yöresinin bu parazit için endemik bölge olup olmadığı kararı daha spesifik, ayrıntılı ve ileri çalışmalara gereksinim duyacağı kanısındayız.

Çoğu parazitler standart incelemeler ile tanınırken birçok intestinal parazitlerden farklı olarak *Cryptosporidium* spp. teşhisi özel testler gerektirir. İshalli hastalardan *Cryptosporidium* için nadir test yapılması immunkompetan hastalar arasında bu enfeksiyonun insidansı ve şiddeti hakkında yanlış kanıdan kaynaklanıyor olabilir. İngiltere’de akut infeksiyöz ishalleri hastalara ait büyük ve çok merkezli laboratuvar temelli çalışma *Cryptosporidium* enfeksiyonunun hemen hemen *Salmonella* enfeksiyonu kadar yaygın olduğunu ve neredeyse *Shigella* enfeksiyonundan 3 kat daha sık görüldüğünü ortaya çıkarmıştır (178). İmmunkompetan kişilerde enfeksiyonun kendini sınırladığı ve etkili tedavisinin olmadığı durumunu göz önüne alan klinisyenler testin değerini sorgulasalar da; test hastaların eğitimine olanak verecek, bir salgının tanınmasını kolaylaştıracak ve enfeksiyonun yayılmasını önlemede tedbirlerin oluşturmasına yol açacaktır. Türkiye’de önceki pozitif vakaların seyrek bildirimleri; laboratuvarlarda deneyimli mikroskopist yokluğu ve gerekli tarama metotlarının uygulama eksikliğine ilaveten klinisyenlerin ihmaline bağlanmıştır. Kontaminasyonun kesin kaynağının belirlenmesi için daha fazla incelemelere ilaveten çalışma, bu patojenin tipik semptomları, teşhise yönelik metodları ve tıbbi tedavisinden haberdar olmak için klinisyenlere yönelik eğitim sağlama gereksinimini de vurgulamıştır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda Şanlıurfa yöresinde gastrointestinal şikayeti olan immunsuprese hastalarda cryptosporidiosis sıklığını %4 olarak bulduk. Şanlıurfa yöresinin iklim şartları ve il merkezine dağılımı yapılan işlenmiş suyun kalitesinin belli bir düzeyde devamlılığının olması *Cryptosporidium* spp.'nin bu yörede daha sık görülmesine menfi yönde etki ediyor olabilir. Bununla birlikte farklı hasta grupları ve DFA ve PCR gibi farklı tanı metodları ile ileri çalışmalar Şanlıurfa yöresinde *Cryptosporidium* spp.'nin görülme sıklığı ve bulaş kaynakları konusunda bize daha ayrıntılı bilgiler sunacaktır.

Klinisyen ve laboratuvar çalışanlarının sulu ishali olan kişilerde *Cryptosporidium* için rutin gaita testleri yapmayı dikkate almaları özellikle gastrointestinal şikayeti olan immunsuprese hastalarda cryptosporidiosis göz ardı etmemeleri gerektiği kanısındayız.

Yaptığımız bu çalışmada, gastrointestinal şikayeti olan her immunsuprese hastanın ve uzun süren sulu ishali olan her hastanın gaita numunelerinin *Cryptosporidium* spp. açısından asit-fast boyama yöntemiyle incelenmesinin ve boyama yöntemiyle ookist saptanamayan dışkı numunelerinde ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium* antijeni aranmasının cryptosporidiosis tanısında duyarlılığı arttıracığı sonucuna varılmıştır.

*Cryptosporidium* spp.'nin hayatı tehdit eden ishalle ilişkili olması nedeniyle cryptosporidiosis açısından risk gruplarını oluşturan çocuklar, yaşlılar ve immunsuprese kişiler ve özellikle de HIV ile enfekte hastalar tarafından suların kaynatılmış veya şişelenmiş halde kullanılması, sebzelerin iyice yıkandıktan sonra pişirilerek tüketilmesi, taze meyve suyu yerine pastörize edilmiş olanların tercih edilmesi, yine bu kişilerin enfekte kişilerle, çiftlik veya ev hayvanları ile temasının engellenmesi, uzun süreli ishal, karın ağrısı, bulantı-kusma, kilo kaybı gibi durumlarda hemen kliniklere başvurulması gibi önlemlerin alınması gerekmektedir.

Cryptosporidiosis epidemiyolojisinde su kaynaklı bulaşmanın önemli olduğu görüşünden yola çıkarak Şanlıurfa yöresine işlenmiş su dağıtımını yapan su arıtma tesislerinde

işlenmiş suyun sürekli monitörize edilmesi gerekliliğine inanmaktayız. İşlenmiş suyun kalitesinin belli bir düzeyde devamı için tesis düzeni ve su işleme prosedürlerinin iyileştirilmesi gerektiği kanaatindeyiz (örneğin, işlenmiş suyun bulanıklık hedefi 0.1 Nefelometrik Turbidity Unit'den küçük veya eşit olmalı). Su ve sağlık yetkilileri su kaynaklarında bulunan *Cryptosporidium*'un klinik önemini incelemek için kapsamlı bir strateji geliştirmelidirler. İlçe ve köylerde yaşayanlar dahil tüm halk için içme suyu güvenliğini garantiye almak ve bu patojenin neden olduğu gelecekteki su kaynaklı salgınları önlemek için yöremizde içme suyu temini ve düzeninin gerekli olacağı, bunun da yoğun çabalar ve tıp cemiyeti ile su ve sağlık yetkilileri arasındaki işbirliği vasıtasıyla gerçekleşeceği kanaatindeyiz.

## 6. KAYNAKLAR

1. Huang DB, Chappell C, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 15: 253-9.
2. Sinski E, Szklarczyk J, Oralewska B. , et al. *Cryptosporidium* sp. infection in children with symptoms of gastro-enteritis. *Acta Parasitol Polon* 1988 ;33: 295-301.
3. Neill MA, Rice SK, Ahmad NV. , et al. Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhoea in elderly hospitalised patients. *Clin. Infect Dis* 1996 ;22:168-70.
4. Kocoshis SA, Cibull ML, Davis TE. , et al. Intestinal and pulmonary cryptosporidiosis in an infant with severe combined immune deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3: 149-57.
5. Levy J, Espanol-Boren T, Tomas C. Clinical spectrum of X linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* 1997; 131: 47-54.
6. Davies EG, Hadzic N, Jones AM. Cholangiopathy in children with combined immunodeficiencies (abstract). *Mol Immunol* 1998; 33:731.
7. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 145-54.
8. O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 1995; 25: 139-95.
9. Jokipii L, Jokipii AMM. Timing symptoms endocystexcretion in human cryptosporidiosis. *N Engl J Med.* 1986; 315:1643-1647.
10. Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 1986; 50: 458-483.
11. Plorde JJ. Cryptosporidiosis. In: *Medical Microbiology. An introduction to infectious diseases.* Sherris JC (ed). Elsevier. New York. 1990; 717-720.
12. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 325-358.
13. Cello JP. Human immunodeficiency virus associated biliary tract disease. *Semin Liver Dis.* 1992; 12: 213-8.

14. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev 1999;12: 554-63.
15. Malebranche R, Arnoux E, Guerin JM, Pierre GD, Laroche AC, Pean Guichard C, Elie R, Morrisset PH, Spira T, Mandeville R, et al. Acquired immunodeficiency syndrome with severe gastrointestinal manifestations in Haiti. Lancet, 1983 Oct 15; 2 (8355): 873-8.
16. Colebunders R, Lusakumuni K, Nelson AM, Gigase P, Lebughe I, von Marck E, Kapita B, Francis H, Salaun JJ, Quinn TC, Piot P. Persistent diarrhea in Zairian AIDS patients: an endoscopic and histological study. Gut. 1988 Dec; 29 (12): 1687-91.
17. Lopez AP, Gorbach SL. Diarrhea in AIDS. Infect Dis Clin North Am. 1988 Sep; 2 (3): 105-18.
18. Centers for Disease Control and Prevention, 2004. Diagnostic Procedures for Stool Specimens: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Diagnostic\\_Procedures.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Diagnostic_Procedures.htm), erişim tarihi; 17.02.2010
19. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol, 2000; 38: 3337-3340.
20. Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*, 1997; p. 1-41. In R. Fayer (ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Pres, Boca Raton, Fla.
21. Chen XM. and Larusso NF. Cryptosporidiosis and pathogenesis of AIDS-cholangiopathy. Semin. Liver Dis. 2002; 22: 277-290.
22. Özcel MA, Özbek Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. No:22, İzmir, 2007; 363-376.
23. Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı, İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, 1995; 595-600.
24. <http://biology.kenyon.edu.tr> Erişim Tarihi: 17.04.2010.
25. Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğlu E. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No: 21, İzmir, 2007; 93-97.
26. Markel EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. Sixth Edition. W. B. Saunders Company, London, 1986; 72-75.

27. Döşkaya M, Dayangaç N, Kuman HA. *Cryptosporidium parvum*. T. Parasitol. Derg, 2003; 27(1): 64-70.
28. Berger SA. Human Parasitic Diseases Sourcebook. Jones and Bartlett Publishers, 2006; 116-121.
29. Çetinkaya F. *Cryptosporidium parvum*'un Bulaşmasında Su ve Gıdaların Rolü. Uludağ Üniversitesi Vet. Fak. Der. 2004; 23 (1-2-3): 103-109.
30. Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji, Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları, 2002; 170-172.
31. Mehlhorn H, Piekarsk G. "Grundriß der Parasitenkunde", Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 6. Auflage, 2002; 516.
32. Nina JMS, McDonald V, Dyson DA, Catchpole J, Uni S, Iseki M, Chiodoni PL, McAdam KPWJ. Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. Infect Immun. 1992; 60: 1509-1513.
33. Xiao L, Fayer R, Ryon U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev. 2004; 17 (1): 72-97.
34. Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, Zhang X, Fayer R, Lal AA. "Host adaptation and host-parasite coevolution i *Cryptosporidium*: Implications for taxonomy and public health" , Int. J. Parasitol. 2002; 32: 1773-1785.
35. Thompson RC, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijawi NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Adv Parasitol, 2005; 59: 77-158.
36. Leav BA, Mackam, Ward HD. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. Clin Infect Dis, 2003; 36 (7): 902-8.
37. Morgan-Ryon UM, Fall A, Ward L, Hijawi N, Sulaiman I, Fayer F, Thompson RCA, Olson M, Lala L, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. J Eukaryotic Microbiol. 2002; 49: 433-440.
38. 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 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. J Clin Microbiol. 2000; 38: 3984-90.
39. Langer RC, Riggs MW. *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. Infect Immun, 1999; 67: 5282-5291.

40. Elliot DA, Coleman DJ, Lane MA, May RC, Machesky LM, Clark DP. *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actinopolymerization. *Infect Immun.* 2001; 69(9): 5940-42.
41. Wards H, Cevallos AM. *Cryptosporidium*: Molecular basis of host-parasites interaction. In: *Advances in Parasitology, opportunistic protozoa in humans.* Baker J. R. , Muller R. , Rollinson D. (eds). Academic Pres-US. 1998; 151-185.
42. Saygı G. *Temel Tıbbi Parazitoloji*, Es-Form Ofset Ltd. Şti, Kasım, 2002; 94-96.
43. Starling CR, Arrowood MJ. "Cryptosporidia", In: *Parasitic protozoa*, vol.6. Academic Pres. 1993; 65: 159-224.
44. Ungar BLP. *Infectious Diseases and Their Etiologic Agents*, volume 2, section H, in *Principle and Practise of Infectious Diseases* Editors, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Fourth Edition, Churchill livingstone, New York, 1995.
45. Robin HJ, Petry F. *Cryptosporidium parvum*: Structural compenents of the oocyst wall, *J. Parasitol* 1999; 85(5): 839-849.
46. Ok ÜZ, Üner A, Korkmaz M. "Cryptosporidiosis. In: İmmun yetmezlikte önemi artan hastalıklar", *Türkiye Parazitoloji Derg.* 12, Ege Üniv. Basımevi, Bornova, İzmir, 1995; 23-42.
47. Sears CL, Kirckpatrick BD. In: *Cryptosporidiosis and Isosporiosis*", *Principles and Practise of Clinical Parasitology*, John Wiley, Sons Ltd. Pres. , 2001; 139-164.
48. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. "Cryptosporidiosis of man and animals", CRC Pres, USA, 1990; 199.
49. Yetkin MA. İmmun yetmezlikli hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması, Gazi Üniv. Tıp Fak. Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 1998.
50. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi Cilt 2*, Nobel Tıp Kitapevi, 2002; 1919-1920.
51. Özer E. Evcil hayvanlarda cryptosporidiosis, Ankara Üniv. Veteriner Fak. Der. 1990; 38(1): 20-31.
52. Erdoğan DD. "İnsanlarda cryptosporidiosis tanısında dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri", Ege Üniv. Tıp Fak. Sağ. Bil. Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İzmir, 2003.



53. Mark AC, Maria TK, Byron LB. The ultrastructure of gametogenesis of *Cryptosporidium baileyi* in the respiratory of broiler chickens, J. Parasitol 1999; 85(4): 609-615.
54. Current WL, Bick PH. Immunology of *Cryptosporidium* spp. , Pathol Immunopathol Res. 1989; 8: 141-160.
55. Köktürk O. Parazit Hastalıkları Grup Başk. , Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, Toraks Derg. , 2002, Cilt 3, Ek 5.
56. Terzi G. Gıda Kaynaklı Protozoon Enfeksiyonlarının İnsan Sağlığı Açısından Önemi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Samsun, YYÜ Vet. Fak. Derg. 2005; 16 (2): 47-55.
57. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. “Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification”. Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1305-1322.
58. [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Html/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body\\_cryptosporidiosis\\_life\\_cycle\\_Irg.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Html/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body_cryptosporidiosis_life_cycle_Irg.htm). Erişim tarihi: 20.04.2010.
59. White AC. Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, other species). In: Principles and practice of infectious diseases. Mandell G. L. , Douglas R. G. Jr. , Bennett J. E. (eds). Churchill Livingstone Inc New York: 2005; 3215-28.
60. Guerrant R. Cryptosporidiosis; An emerging, highlyinfectious threat. Emerg Infect Dis, 1997; 3: 51-57.
61. Griffiths JK. Human Cryptosporidiosis. Epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. Adv Parasitol, 1998; 40: 37-85.
62. Current WL, Reese NC, Ernst JV, Bailey WS, Heyman MB, Weinstein MD. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons studies of an outbreak and experimental transmission, N. Engl J. Med. 1983; 308: 1252-1257.
63. Reese NC, Current WL, Ernst JV, Bailey WS. Cryptosporidiosis of man and calf; a case report and result of experimental infections in mice and rats, Am. J. Trop. Med. Hyg 1982; 31: 226-229.
64. Tzipori S, Angus KW, Campbeli I, Gray EW. Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolated from a human patient with diarrhea, Gut 1982; 23: 71-74.
65. Alpert G, Bell LM, Kirkpatrick CE, Budnick LD, Campos JM, Friedman HM, Plotkin SA. Outbreak of cryptosporidiosis in day care center, Pediatrics 1986; 77: 152-157.

66. Public Health Laboratory Service Study Group. Cryptosporidiosis in England and Wales; prevalence and clinical and epidemiological features, Br. Med J. 1990; 300: 774-777.
67. Sarıkaya R. *Cryptosporidium* Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme, Gazi Üniv. Kırşehir Eğitim Fak. 2004, Yayını, cilt 5, sayı 2.
68. Martino P, Gentile G, Caprioli A, Baldassori L, Doneli C, Arcese W, Fenu S, Micozzi A, Venditti M, Mandelli F. Hospital-acquired cryptosporidiosis in a bone marrow transplantation unit, J. Infect. Dis. 1998; 158: 647-648.
69. Starling CR, Seegar K, Sinclair NA. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea, J. Infect. Dis. 1986; 153: 380-381.
70. Taylor DN, Houston R, Shlim DR, Bhaibulaya M, Ungar BL, Echeverria P. Etiology of diarrhea among. Travelers and foreign residents in Nepal, JAMA 1988; 260: 1245-1248.
71. Özkul İA, Alçıgır G, Kutsal O. "Bursal cryptosporidiosis in chickens associated with marak's disease" Doğa-Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences, Tubitak, 1991; 16: 1-9.
72. Farthing MJG, Cevallos AM, Kelly P. Intestinal Protozoa. In: Manson's Tropical Diseases. Cook G. C. (ed) 20 th. W. B. Saunders Company, 1996; 1255-1298.
73. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Klinik Mikrobiyoloji, Manual of Clinical Microbiology, 2007; 9 (2): 2122-2128, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. , Ankara, Editörler; Başustaoglu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M.
74. Özcel MA. İmmun yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 12, Ege Üniv. Basımevi, Bornova, İzmir 1995.
75. Hazer Y. Afyonkarahisar Bölgesindeki Risk Gruplarında *Cryptosporidium* parvum araştırılması, Afyonkarahisar Kocatepe Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi 2007.
76. Kosek M, Alcantara C, Lima AAM. , Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an update. Lancet 2001; 1: 262-269.
77. Robinson P, Okhuysen PC, Chappel CL, Weinstock JV, Lewis DE, Actor JK, White AC Jr. Substance P expression correlates with severity of diarrhea in cryptosporidiosis. J Infect Dis. 2003; 188(2): 290-296.

78. Sonea IM, Palmer MV, Akili D, Harp JA. Treatment with neurokinin-1 receptor antagonist reduces severity of inflammatory bowel disease induced by *Cryptosporidium parvum*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002; 9: 333-340.
79. Chen XM, Keithly JS, Paya JV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. N Engl J Med 2002; 346(2): 1723-30.
80. Heusler VT, Kuenzil P, Rottenberg S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. Int. J. Parasitol. , 2001; 31:1166-1176.
81. McDonald V. Host cell mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. Parasite Immunol 2002; 22: 597-604.
82. Lean IS, Lamonde LS, Laurent F, McDonald V. Role of tumor necrosis factor alpha in development of immunity against *Cryptosporidium parvum* infection. Infect Immun 2006; 74 (7): 4379-82.
83. White AC, Robinson P, Okhuysen PC. Human studies provide insight into the pathogenesis, immunology and treatment of cryptosporidiosis. Clin Infect Dis 2003; 37: 989.
84. Singh I, Theodos C, Li W, Tzipori S. Kinetics of *Cryptosporidium parvum*-specific cytokine responses in healing and nonhealing murine models of *Cryptosporidium parvum* infection. Parasitol Res 2005; 97: 309-17.
85. Ehigiator HN, McNair N, Mead JR. *Cryptosporidium parvum*: The contribution of Th1 inducing pathways to the resolution of infection in mice. Exp Parasitol 2007; 115: 107-113.
86. Dann SM, Wang HC, Gambarin KJ, Actor JK. Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan *Cryptosporidium*. J Infect Dis 2005; 192: 1294-302.
87. McDonald V, Pollok RCG, Dhaliwal W, Naik S. A potential role for interleukin-18 in inhibition of the development of *Cryptosporidium parvum*. Clin Exp Immunol 2006; 145: 555-62.
88. Frost FJ, Tollestrup K, Craun GP, Fairley CK. Protective immunity associated with a strong serological response to a *Cryptosporidium*-specific antigen group, in HIV-infected individuals. J Infect Dis 2005; 192: 618-21.

89. Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients-a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97 (4): 443-57.
90. Sandhu SK, Priest JW, Lammie PJ, Hubbard A. The natural history of antibody responses to *Cryptosporidium* parasites in men at high risk of HIV infection. J. Infect Dis 2006; 194 (10): 1428-37.
91. Wang HC, Dann SM, Okhuysen PC, Lewis DE. High levels of CXCL10 are produced by intestinal epithelial cells in AIDS patients with active cryptosporidiosis but not after reconstitution of immunity. Infect Immun, 2007; 75(1): 481-7.
92. Merson MH, Piot P. "Acquired Immunodeficiency Syndrome". Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. (eds). "Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases" kitabından. New York, Livingstone; 6. baskı. 2005: 1465-1720.
93. Fahey TMD. "Cryptosporidiosis", Infectious Disease Update, 2003; 10 (2), 75-80.
94. Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis, J. Clin. Pathol. 1991; 44: 445-451.
95. Gasser RB, O'Donoque O. "Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*", Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1379-1413.
96. Emre Z, Alabay M, Düzgün A, Çerçi H. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal specimens. T. J. Vet. And Animal Sci. , 1997; 21: 293-296.
97. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect. 2002; 4: 1047-1058.
98. Erman N, Beyazıt A, Öz İ. İzmir yöresinde kuzu ve oğlaklarda cryptosporidiosis yaygınlığı. Bornova Vet. Kontr. Ve Araşt. Enst. Derg. 2000; 25 (39): 33-38.
99. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res. 2004; 38: 818-862.
100. Valdez LM, Dang H, Okhuysen PC, Chappell CL. Flow cytometric detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool samples. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (8): 2013-2017.
101. 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.

102. Suresh P, Rehg JE, “Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces”, J. Clin. Microbiol. 1996; 34 (1): 38-40.
103. Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı inceleme yöntemleri, Bölüm 1, Parazit Hastalıklarında Tanı, Editörler: Özcel MA, Altıntaş N, 1. Baskı, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, 1997.
104. Akşehirli ŞG. “Kayseri’de 0-5 yaş grubu ishallerde *Cryptosporidium*’un araştırılması”, Dok. Tezi, Erciyes Üniv. Sağlık Bil. Enstitüsü, Kayseri, 1995.
105. MacPherson DW, McQueen R. “Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods”, J. Clin. Microbiol. 1993; 31 (2): 198-202.
106. Reisner BS, Spring J. “Evaluation of a combined acid-fast-trichrome stain for detection of *Microsporidia* and *Cryptosporidium parvum*”, Arch. Pathol. Lab. Med. 2000; 124: 777-779.
107. Silva CV, Ferreira MS, Gonöalves-Pires MRF, Costa-Ruiz JM. “Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay”, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003; 98 (8); 1097-1099.
108. Leng X, Mosier DA, Oberst RD. “Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces”. App. and Env. Microbiol. 1996; 62 (2): 643-647.
109. Kehl KSC, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species, J. Clin. Microbiol. 1995; 33 (2): 416-418.
110. Crandall I. Sequential haematoxylin/acid-fast stain for routine O&P including *Cryptosporidium* & *Cyclospora*. MSH/TML Shared Microbiol. Serv. Policy & Proc. Manual. 2000; p. 147.
111. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. ASM Pres, Washington DC, Third edition, 1997; 59-63.
112. Mtombo MMA, Nash AS, Bleweet DA, Wright S. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. Vet. Parasitol. 1992; 45: 49-57.

113. Doğan N, Akgün Y. İshalli olgularda *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. T. Parazitol. Derg. 1998; 22 (3): 243-246.
114. Dirim D, Turgay N, Alkan MZ. Bir cryptosporidiosis olgusunun kinyoun asit-fast boyası ve polimeraz zincir reaksiyonu ile takibi. T. Parazitol. Derg. 2003; 27 (4): 237-239.
115. Över U. İshalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*'un rolü ve sağlıklı popülasyonda seroprevalansı. Marmara Üniv. Sağlık Bil. Enst. Doktora Tezi, İstanbul, 1996.
116. Weber R, Bryan RT, Juranek DD. "Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocyst in faecal specimens", J. Clin. Microbiol. 1992; 30 (11): 2869-2873.
117. Özlem MB, Eren H, Kaya O. "Aydın yöresi buzağlarında *Cryptosporidium*'ların varlığının araştırılması (1)", Bornova Vet. Kontr. Ve Araşt. Enst. Md. Derg. 1997; 22 (36): 15-22.
118. Rosenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. J Clin Microbiol, 1993; 31: 1468-1471.
119. Özcel MA, Üner A, Ertuğ S. Immunfloresans Yöntemi. (Ed: Özcel M. A. , Altıntaş N.). Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, S. 1997; 215-239.
120. Uyar Y, Taylan Özkan A. Antigen Detection Methods in Diagnosis of Amebiasis, Giardiasis and Cryptosporidiosis. T Parazitol Derg. 2009; 33 (2): 140-150.
121. Morgon UM, Thompson RCA. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? Parasitol. Today. 1998; 14: 496.
122. Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct. Trop. Med. And Health. , 2004; 32 (1): 5-14.
123. 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.

124. Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters with a Small-Subunit rRNA based diagnostic and genotyping tool. *App. Env. Microbiol.* 2000; 66 (12): 5492-5498.
125. Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34 (7): 1769-1772.
126. Awad-El-Kariem FM, Robinson HA, Petry F, McDonald V, Evans D, Casmore D. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitol. Res.* 1998; 84: 297-301.
127. Pedroza Diaz S, Amar C, Nichols CL, McLaughlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Inf. Dis.* 2001; 7 (1): 49-56.
128. Kar S. *Cryptosporidium parvum*'un Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Üremenin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi. Ankara Üniv. , Sağlık Bilimleri Enst. , Parazitoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2007.
129. Coutinho BP, Oria RB, Vieira CM et al. *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J. Parasitol.* 2008; 94 (6): 1225-1232.
130. Guerrant RL, Oria RB, Moore SR, Oria MO, Lima AA. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr. Rev.* 2008; 66 (9): 487-505.
131. Lima NL, Soares AM, Mota RM, Monteiro HS, Guerrant RL, Lima AA. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral Formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2007; 44 (3): 365-374.
132. Patenburg B, Cabada MM, White AC Jr. Treatment of Cryptosporidiosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2009; 7 (4): 385-391.
133. Doğanay M, Altıntaş N, (editörler). Zoonozlar, Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009.
134. Yıldız Zeyrek F. Barsak, Kan ve Doku Parazitleri Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *ANKEM Derg* 2009; (Ek 2): 221-227.
135. Baqai R, Anwar S, Kazmi S. Detection of *Cryptosporidium* in immunosuppressed patients. *J Ayub Med Coll.* 2005; 17 (3): 38-40.

136. El-Mahallowy HA, El-Din NH, Salah F, El Arousy M, El-Naga SA. Epidemiologic profile of symptomatic gastroenteritis in pediatric oncology patients receiving chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 42 (4): 338-342.
137. Hommer V, Eichholz J, Petry F. Effect of antiretroviral proteaz inhibitors alone and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob chemother*. 2003 Sep; 52 (3): 359-64.
138. Mülazımoğlu L, Vahaboğlu H, Grgn , Yıldıırım İ, Semerci İ, Taşer B. Beş yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 1993; 2: 113-115.
139. ner A, Daldal N, zbel Y, Tappeh KH. Çocuklarda *Cryptosporidium* aranması. *T. Parazitol Derg*. 1991;15 (4): 42-48.
140. Turgay N, Yolasığmaz A, Erdoğan DD, Yıldız Zeyrek F, Uner A. Incidence of cyclosporiasis in patients with gastrointestinal symptoms in western Turkey. *Med Sci Monit*. 2007; 13 (1): CR 34-9.
141. Türk M, Şener GA, Orhon M, Candz K, Yurtsever SG, Türker M. Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarın'da Ocak 2001-Haziran 2003 yılları arasında saptanan barsak parazitlerinin dağılıımı. 2004; 28 (2): 100-102.
142. Yazar S, Yaman O, Gzkenç N, Şahin İ. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Başvuran Hastalarda Barsak Parazitlerinin Dağılıımı. *T. Parazitol. Derg*. 2005; 29 (4): 261-263.
143. Doğancı T, Araz E, Ensari A, Tanyüksel M, Doğancı L. Detection of *Cryptosporidium parvum* infection in childhood using various techniques. *Med Sci Monit*. 2002; 8 (12): MT 223-226.
144. Shadid NS, Rahaman ASHM, Mata LJ, Sanyal SC. Cryptosporidiosis in Bangladesh. *British Med. J*. 1985; 290: 114-115.
145. Mata L, Balanos H, Pezarro D, Viyes M. Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1984; 33: 24-29.
146. Tmer S, Şahin İŞ, Yksel MF, Ceylan E, Vurupalmaz Y, Yıldız Zeyrek F. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na Başvuran Hastalarda *Cryptosporidium* spp. Grlme Sıklığı. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi Program ve zet Kitabı. 2009; s. 245.
147. Sreedharan A, Jayshree RS and Sridhar H. Cryptosporidiosis among cancer patients: an observations. *J. Diarrhoeal Dis. Res*. 1994; 14: 211-213.



148. Nahrevanian H, Assmar M. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in the Islamic Republic of Iran. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41: 74-77.
149. Burgner D, Pikos N, Eagles G. Epidemiology of *Cryptosporidium parvum* in symptomatic paediatric oncology patients. *J Paediatr Child Health.* 1993; 35: 300-302.
150. Lewis IJ, Hart CA and Baxby D. Diarrhoea due to *Cryptosporidium* in acute lymphoblastic leukemia. *Arch. Dis. Child.* 1985; 60: 60-62.
151. Stine KC, Haris JS, Lindsey NJ and Cho CT. Spontaneous remission of cryptosporidiosis in a child with acute lymphocytic leukemia. *Clin Pediatr.* 1985; 24: 722-724.
152. Foot AB, Oakhill A and Mott MG. Cryptosporidiosis and acute leukemia. *Arch. Dis. Child.* 1990; 65: 236-237.
153. Sönmez Tamer G, Balıkcı E, Erbay A. Lösemi ve Lenfoma Tanısı Alan Çocuklarda Cryptosporidiosis Prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2008; 32 (3): 192-197.
154. Taşova Y, Şahin B, Kotlaş S, Paydaş S. Clinical Significance and Frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish Patients with Hematological Malignancy. *Acto Med Okayama.* 2000; 54 (3): 133-136.
155. Jayalokshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008 Jan-Mar; 51 (1): 137-138.
156. El Shazly AM, Soltan DM, El-Sheikha HM, Sadek GS, Morsy AT. Correlation of ELISA Copro Antigen and Oocysts Count to the Severity of *Cryptosporidium parvum* in Children. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007; 37 (1): 107-120.
157. Direkel Ş, Özerol İH, Durmaz R. İshalli Hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Ehrlich Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemleriyle Araştırılması. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg.* 2008; 1 (1): 20-25.
158. Yılmaz H, Tas CZ, Çiçek M. Investigation of cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Med J.* 2008; 29 (4): 526-529.
159. Karanis P, Schoonen D, Seitz HM. *Giardia* and *Cryptosporidium* in backwash water from rapid sand filters used for drinking water production. *Zentralbl Bakteriologie* 1996; 284: 107-114.

160. Usluca S, Aksoy Ü. Su Kaynaklı Bir Parazit: *Cryptosporidium*. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2006; 20 (1): 65-74.
161. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med. 1994; 331: 161-167.
162. Eisenber JNS, Lei X, Hubbard AH. The Role of Disease Transmission and Conferred Immunity in Outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, Wisconsin. Am J Epidemiol. 2005; 161: 62-67.
163. Şahin S, Aksoy Ü, Akisu Ç, Usluca S, Yalçın G, Kuralay F. 3. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi Program ve Özet Kitabı. 2006; s. 38.
164. Köksal F. Kaynak sularını *Giardia* ve *Cryptosporidium* yönünden incelenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2002; 32 (3-4): 275-277.
165. Çeber K, Aslan G, Otağ F, Delialioğlu N, Öztürk C, Babür C, Emekdaş G. Mersin İlinde İçme Suyu, Kullanma Suyu, Atık Su ve Deniz Sularında *Cryptosporidium* spp. Ookistlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2005; 29 (4): 224-228.
166. Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut ishallerde çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. T Klin Pediatri. 2004; 13: 16-19.
167. Toyoguchi A, Omata Y, Koyama T, Kamiyoshi T. Antibody reactivity to *Cryptosporidium parvum* in saliva of calves after experimental infection. J Vet Med Sci. 2000; 62 (11): 1231-1234.
168. [http:// esid.org/workingparty.clinical](http://esid.org/workingparty.clinical). Erişim tarihi: 06.06.2010
169. Kusnierz BW, Bajer A, Caccio S, Pliszka EH, Bernatowska E, Socha P, van Dongen J, Bednarska M, Paziowska A, Sinski E. *Cryptosporidium* Infection in Patients With Primary Immunodeficiencies. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007; 45 (4): 458-464.
170. Insulander M, de Jong B, Svenungsson B. A foodborne outbreak of cryptosporidiosis among guests and staff at a hotel restaurant in Stockholm County, Sweden. Euro Surveill. 2008; 13 (51): pii: 19071.
171. Pönkä A, Kotilainen H, Rimhanen-Finne R, Hokkanen P, Hanninen ML, Karna A, Meri T, Kuusi M. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki. Euro Surveill. 2009; 14 (28): pii: 19269.

172. Saksirisampant W, Eampokalap B, Rattanasirithang M, Likanonsakul S, Wiwanitkit V, Nasingkarn A, Denmasae N. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai*. 2002; 85 (1): 424-428.
173. 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.
174. Adjei A, Lartey M, Adiku TK, Rodrigues O, Renner L, Sifah E, Mensah JD, Akanmori B, Otchere J, Bentum BK, Bosompem KM. *Cryptosporidium* oocysts in Ghanaian AIDS patients with diarrhoea. *Est Afr Med J*. 2003; 80 (7): 369-372.
175. Tuli L, Gulati AK, Sundar S, Mohapatra TM. Correlation between CD4 counts of HIV patients and enteric protozoan in different seasons-an experience of a tertiary care hospital in Varanasi (India). *BMC Gastroenterol*. 2008; 8: 36.
176. Holmberg SD, Moorman AC, Von Bargen JC, Palella FJ, Loveless MO, Ward DJ, Navin TR. Possible effectiveness of clarithromycin and rifabutin for cryptosporidiosis chemoprophylaxis in HIV disease. HIV Outpatient Study (HOPS) Investigators. *JAMA*. 1998; 279 (5): 384-386.
177. Noureldin MS, Shaltout AA, El Hamshary EM, Ali ME. Opportunistic intestinal protozoal infections in immunocompromised children. *J Egypt Soc Parasitol*. 1999; 29 (3): 951-961.
178. Public Health Laboratory Service Study Group. Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical epidemiological features. *BMJ*. 1990; 300: 774-777.