

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSHALLİ İMMÜNSUPRESİF VE İMMÜNKOMPETAN
OLGULARDA MİKROSKOBİK, SEROLOJİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE *CRYPTOSPORIDIUM*
SPP. 'NİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmet YILMAZ

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

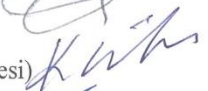
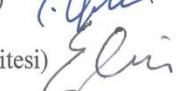
**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hakan USLU**

**ERZURUM
2015**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İSHALLİ İMMÜNSUPRESİF VE İMMÜNKOMPETAN
OLGULARDA MİKROSKOBİK, SEROLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. 'NİN
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet YILMAZ

Tez Savunma Tarihi	:04.06.2015
Tez Danışmanı	:Prof. Dr. Hakan USLU (Atatürk Üniversitesi) 
Juri Üyesi	:Prof. Dr. Osman AKTAŞ (Atatürk Üniversitesi) 
Juri Üyesi	:Doç. Dr. Kemalettin ÖZDEN (Atatürk Üniversitesi) 
Juri Üyesi	:Doç. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ (Dicle Üniversitesi) 
Juri Üyesi	:Doç. Dr. Ekrem KİREÇCİ (Sütçü İmam Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM-2015**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.	3
2.1.1. <i>Cryptosporidium</i> Cinsi Parazitlerin Genel Özellikleri	3
2.1.1.1. Tarihçesi	3
2.1.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.1.3. Morfolojisi	6
2.1.1.4. Yaşam Döngüsü	6
2.1.2. Epidemiyoloji	9
2.1.3. Patojenite	14
2.1.4. İmmunite	15
2.1.4.1. Hücresel İmmunite	15
2.1.4.2. Hümorale İmmunite	16
2.1.5. Klinik	17
2.1.6. Laboratuvar Tanı	17
2.1.6.1. Direkt Tanı Yöntemleri	18
2.1.6.2. Serolojik Yöntemler	21
2.1.6.3. Histopatolojik Tanı Yöntemleri	22
2.1.6.4. Kültür Yöntemleri	22
2.1.7. Tedavi	22

2.1.7.1. İmmün Sistemi Yeterli Kilerde Tedavi	23
2.1.7.2. İmmün Sistemi Baskılanmış Kilerde Tedavi	23
2.1.8. Korunma	23
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	25
3.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	25
3.3. Dışkı Örneklerinin Saklanması	26
3.4. Yöntemler	27
3.4.1. Parazitolojik İnceleme Yöntemi	27
3.4.2. Modifiye Asit-Fast Yöntemi	27
3.4.3. ELISA Yöntemi	28
3.4.4. DFA Yöntemi	31
3.4.5. Moleküler Yöntemin Uygulanması	34
3.5. İstatiksel Analizler	34
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	76
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	88
EK-2. ETİK KURUL KARARI	89

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışma dönemi boyunca destek ve tecrübelerini esirgemeyen, bilgi ve becerileri ile akademik hayatımın sağlam temeller üzerine yükselmesinde büyük katkısı olan danışman hocam Prof. Dr. Hakan USLU'ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet AYYILDIZ'a ve Anabilim Dalından değerli hocalarım Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ, Prof. Dr. Osman AKTAŞ, Prof. Dr. Halil YAZGI, Prof. Dr. Ayşe Esin AKTAŞ, Prof. Dr. Ülkü ALTOPARLAK ve Doç. Dr. Hamidullah UYANIK'a; tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Esin GÜVEN ve Doç. Dr. Hamza AVCIOĞLU'na, yine çalışmalarım esnasında sürekli yanımda olan Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Hakan AYDIN'a; mikroskopi çalışmalarım esnasında yardımlarından dolayı Öğretim Görevlisi Önder AKKAŞ'a; uzun bir dönem boyunca birlikte çalıştığım Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü asistan arkadaşlarıma ve tüm ana bilim dalı çalışanlarına; bu günlere gelmemde maddi ve manevi emeği olan annem ve babama, eğitim ve çalışmalarımı tamamlamamı, sabırla bekleyen eşim Vildan CANSU YILMAZ, çocuklarım Bahar ve Ahmet Salih'e; Tez çalışmasını **2013/237 BAP** proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet YILMAZ

ÖZET

İshalli İmmünsupresif ve İmmünkompetan Olgularda Mikroskopik, Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle *Cryptosporidium* spp. 'nin Araştırılması

Giriş ve Amaç: Bu araştırmada, ishal şikayeti bulunan İmmünsupresif hastalardan ve ishal şikayeti bulunan farklı yaş grubunda yer alan immünkompetan hastalardan gönderilen dışkı örneklerinde, boyalı mikroskopi, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılarak *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığını göstermeyi, ayrıca tanıda kullanılan yöntemlerin birbiriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Ocak – Temmuz 2014 tarihleri arasında Erzurum Yakutiye Araştırma Hastanesinde farklı kliniklerden yaşları 0-94 arasında değişen, ishali olan 80 immünsupresif ve 92 immünkompetan hastaya ait toplam 172 dışkı örneği çalışma kapsamına alındı. Hasta grubu 0-14 yaş 49 kişi, 15 yaş ve üstü 123 kişiden; ayrıca içme suyu olarak 141 kişi şebeke suyu, 41 kişi de kuyu suyu kullanan hastalardan oluşmakta idi. *Cryptosporidium* spp. pozitifliği bulmak amacıyla hasta örneklerine Modifiye asit-fast boyama, ELISA, DFA teknikleri uygulandı. yöntemlerinden biriyle pozitif bulunan olgular ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda bu hastalara ait 172 fekal örneğin 10'unda ELISA yöntemi ile, 7'sinde DFA yöntemiyle, 6'sında Modifiye asit fast boyama yöntemiyle pozitiflik bulundu. Moleküler yöntemlerle bu pozitiflikler araştırılmış, 2 örnekte *Cryptosporidium* türlerine ait DNA'lar gösterilebilmiştir. İmmünsupresif hasta grubunda (%6.3) immünkompetan hasta grubunda (%5.4) pozitiflik bulundu. 0-14 yaş aralığında (%10.2), 15 yaş ve üzeri grupta ise (%4.1) oranında pozitiflik bulundu. Şebeke suyu veya hazır su kullananlarda (%4.3), kuyu suyu kullananlarda ise (%12.9) oranın da pozitiflik saptandı.

Sonuç: Araştırmamız, özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde, çocukluk çağındaki bireylerde ve içme suyu olarak kuyu suyu kullanan bireylerde ishal etkeni olarak *Cryptosporidium* ookisterinin de araştırılmasının yararlı olacağını göstermiştir. Ayrıca ELISA yönteminin yüksek duyarlılığa sahip olması ve çalışma kolaylığı açısından tanıda diğer yöntemlere tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*, DFA, ELISA, İmmünkompetan, İmmünsupresif, modifiye asit fast boyama, PCR.

ABSTRACT

Investigation of *Cryptosporidium* spp in Immunosuppressive and Immunocompetent Cases with Diarrhea by Microscopic, Serological and Molecular Methods

Aim: In this study, our aim was to compare the diagnostic methods with each other and show the presence of *Cryptosporidium* oocysts by using molecular, serological and microscopical methods in stool samples which were collected from immunosuppressive and immunocompetent patients with diarrhea.

Material and Method: Total 172 stool samples were collected from 80 immunosuppressive and 92 immunocompetent patients (between 0-94 years) with diarrhea who were referred to different clinics of Ataturk University, Yakutiye Research Hospital between January 2014 and July 2014. Patient group composed of 49 persons between 0-14 years and 123 persons between 15-94 years. On the other hand, 141 patients were using tap water while 41 of them were using well water. Modified acid-fast staining, ELISA and DFA techniques were applied to detect the *Cryptosporidium* spp. positivity. Polymerase chain reaction method was performed to the samples which were detected positive with one of the above methods.

Results: The positivity was detected in 10, 7 and 6 patients by ELISA, DFA technique and Modified acid-fast staining method respectively. *Cryptosporidium* DNA was detected in only 2 samples by molecular methods. The rates of positivity were 6.3% and 5.4% in immunosuppressive and immunocompetent patients respectively. The positivity was detected in 10.2% and 4.1% in 0-14 years and 15-94 years patients. On the other hand, 4.3% and 12.9% positivity rates were detected in tap water and well water users respectively.

Conclusion: Our study pointed out that the investigation of *Cryptosporidium* oocysts as diarrhea agents in especially immunosuppressive patients, individuals in childhood and well water users may be useful. Additionally, we think that ELISA methods may be replaced with other methods because of its' high sensitivity and the ease of application.

Keywords: *Cryptosporidium*, DFA, ELISA, immunosuppressive, immunocompetent, modified acid-fast staining, PCR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	:Baz çifti
DFA	:Direkt fluorosan antijen deneyi
DNA	:Deoksiribonükleik asit
ELISA	:Enzim bağlı immünosorbent deneyi
HIV	:İnsan immun yetmezlik virüsü
IgA	:İmmunglobulin A
IgG	:İmmunglobulin G
IgM	:İmmunglobulin M
IFAT	:İndirekt immünflorasan antikor deneyi
MAF	:Modifiye asit-fast boyama
mg	:Miligram
µL	:Mikrolitre
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:Ribonükleik asit
RFLP	:Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
sad-ELISA	:Sandoviç Antijen Belirleme Enzim bağlı immünosorbent deneyi
SSU rRNA	:rRNA'nın küçük alt ünitesi
TAE	:Tris astet etilen diamin tetra asetik asit
UV	:Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	<i>Cryptosporidium</i> 'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri.....9
Şekil 2.3.	<i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin bulaşım kaynakları.....12
Şekil 3.1.	Çalışmada kullandığımız ELISA kiti ve ELISA plate okuyucu.....29
Şekil 3.2.	Çalışmada kullanılan DFA kiti ve IFA florasan mikroskobu.....34
Şekil 4.1.	MAF boyamada cryptosporidium ookistlerinin görünümü (X100).....43
Şekil 4.2.	Çalışmamızdaki ELISA plağında kör, negatif kontrol (NK)1, NK 2, pozitif kontrol (PK)1, PK 2; pozitif ve negatif kuyuların görünümü (81hasta sonucu).....44
Şekil 4.3.	Çalışmamızdaki ELISA plağında kör, negatif kontrol (NK)1, NK 2, pozitif kontrol (PK)1, PK 2; pozitif ve negatif kuyuların görünümü (91 hasta sonucu).....45
Şekil 4.4.	DFA ile <i>Cryptosporidium</i> saptanan örneklerden biri (X40).....49
Şekil 4.5.	DFA yöntemi ile <i>Giardia</i> saptanan örneklerden biri (X40).....49
Şekil 4.6.	Çalışmada kullanılan UV görüntüleme cihazı.....50
Şekil 4.7.	PCR çalışmalarında kullanılan jel elektroforez tankı ve thermal cycler..50
Şekil 4.8.	<i>Cryptosporidium</i> spp. saptanan olguların agaroz jelde yürütülmesi sonucu UV ışık altındaki PCR görüntüsü. M: Marker (100bp ladder) 1,2: <i>Cryptosporidium</i> pozitif hasta sonucu, 3: <i>Cryptosporidium</i> negatif kontrol 4: pozitif kontrol (826 bp).....52

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1.	<i>Cryptosporidium</i> cinsine ait sınıflandırma.....4
Tablo 2.2.	Moleküler bilgiler ışığında tanımlanan türler ve yerleştiği başlıca konaklar.....5
Tablo 3.1.	<i>Cryptosporidium</i> spp.'nin PCR'ında kullanılan primerler.....37
Tablo 4.1.	Çalışmada yaş gruplarının cinsiyete göre dağılımı.....41
Tablo 4.2.	Çalışmaya alınan hastaların kliniklere göre dağılımı ve oranları.....42
Tablo 4.3.	MAF boyama yöntemi ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> spp. ookist pozitifliğinin hasta gruplarına göre dağılımı.....42
Tablo 4.4.	MAF boyama yöntemi ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> spp. ookist pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı.....42
Tablo 4.5.	MAF boyama yöntemi ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> spp. ookist pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı43
Tablo 4.6.	Dışkı örneklerinde mikroskopik muayene sonucu bulunan parazitler.....44
Tablo 4.7.	ELISA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> antijen pozitifliğinin hasta gruplarına göre dağılımı.....45
Tablo 4.8.	ELISA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı.....46
Tablo 4.9.	Hastaların kullandıkları su kaynağına göre ELISA ile <i>Cryptosporidium</i> bulunma sayı ve oranları.....46
Tablo 4.10.	ELISA yöntemi ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> spp. ookist antijen pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı47
Tablo 4.11.	ELISA yöntemi ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> spp. ookist antijen pozitifliğinin yerleşim yerine göre dağılımı.....47
Tablo 4.12.	DFA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> antijen pozitifliğinin hasta gruplarına göre dağılımı.....48
Tablo 4.13.	DFA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı.....48

Tablo 4.14.	PCR ile farklı hasta gruplarında <i>Cryptosporidium</i> araştırılması.....	51
Tablo 4.15.	PCR ile farklı yaş gruplarında <i>Cryptosporidium</i> araştırılması.....	51
Tablo 4.16.	ELISA sonuçları ile DFA sonuçlarının karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.17.	MAF boyama yöntemi ile elde edilen sonuçların DFA sonuçları ile karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.18.	PCR sonuçları ile DFA sonuçlarının karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.19.	DFA yöntemi sonuçları ile ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.20.	<i>Cryptosporidium</i> saptanan hastalara ait demografik özellikler klinik ve laboratuvar bulguları.....	54
Tablo 5.1.	Türkiye'de farklı yörelerden saptanan cryptosporidiosis prevalansı	65
Tablo 5.2.	Farklı ülkelerde cryptosporidiosis prevalansı ile ilgili yapılan bazı çalışmalar.....	66

1. GİRİŞ

İnsanlarda hastalık etkeni olarak birçok etken tanımlanmış ve bunların birçoğu bilim adamlarınca yıllarca incelenmiş ve hastalık patogenezi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Hastalıklar içinde özellikle bakteri kökenler üzerinde hem tedavi hem de tanı metotları alanında büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Klinik anlamda her ne kadar üst solunum yolları etken ve klinik tabloları iyi bilinse de son zamanlarda insanlarda ölüm nedeni olabilecek enfeksiyon hastalıkları arasında eskiden hiç önemsenmeyen ishal olguları incelenmeye başlanmıştır. Özellikle çocuk yaş gruplarında gözlenen bu ölümler bir ülkenin gelişmişlik ölçütlerinin arasına girmiş ve bu konuda çok ileri düzey laboratuvarlar kurulmuş ve hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmalar esnasında özellikle çağımız bazı hastalıklarının artması, kanser hastalarının çoğalması insanlarda artık her yaşta gözlenen immun sistem problemlerini ortaya çıkarmıştır. Bu hasta grupları başta olmak üzere insanlarda tedavileri dirençli ve tanı metotlarında gözden kaçabilen birçok etkenler gözlemlenmeye başlamıştır. Bu etkenlerden biri de daha önceleri veterinerlik hekimliği camiasında oldukça iyi tanınan ve özellikle yeni doğan buzağılarda ölümcül ishallerle ciddi ekonomik kayıplara neden olan ancak artık insanlarda da ölümcül tablolara yol açabilen *Cryptosporidium* spp. olarak bilinen bir cins parazittir. *Cryptosporidium* insanları ve hayvanları en sık enfekte edebilen enterik protozoan parazitlerden biridir.¹ *Cryptosporidium* türleri dünyada oldukça yaygındır ve yalnız insanda değil, çok sayıda hayvan türünde de enfeksiyon yapabilmektedir. Dolayısıyla insana bulaş birçok farklı yoldan olabilmektedir.²³

Cryptosporidium spp. türlerinin oluşturduğu enfeksiyonların şiddeti ve süresi, konağın immun sistemine ve yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Enfeksiyonların bazıları kendi kendini sınırlayan ve akut tipte iken, bazıları ise kronik

tiptedir. İmmüsupresif konaklarda hastalık daha şiddetli seyreder ve ölümler sonuçlanabilir.⁴⁻⁶

Farklı yaş gruplarında ishal şikayeti bulunan İmmüsupresif ve immünkompetan hastalardan hastanemiz laboratuvarına gaitada parazit aranması amacı ile gönderilen dışkı örneklerinde, boyalı mikroskopi, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılarak *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin varlığının saptanması ve parazit tanısı için kullanılan bu yöntemlerin birbiriyle üstünlüklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Amerika Birleşik Devletleri'nin Milwaukee kentinde 1993 yılında, yaklaşık 403.000 kişiyi etkileyen salgın sonrası araştırmacıların dikkati bu protozoon üzerine çekilmiş ve son 20 yıldır dünyada *Cryptosporidium* türlerinin morfolojisi, biyolojisi, bulaşması ve moleküler genetik yapıları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır.^{1, 7}

2.1. *Cryptosporidium* spp. :

Cryptosporidium türleri, insanları da içine alan çok geniş bir omurgalı grubunun sindirim ve solunum sistemi epitelinin mikrovillüslerine intraselüler, ekstrastoplazmik olarak yerleşim gösteren, zoonotik öneme sahip protozoonlardır.^{7, 8}

2.1.1. *Cryptosporidium* Cinsi Parazitlerin Genel Özellikleri

2.1.1.1. Tarihçesi:

Cryptosporidium ilk olarak 1895 yılında J.J. Clarke tarafından fark edilerek'' fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri'' biçiminde tarif edilmiştir.⁹ 1907 yılında laboratuvar faresinin mide epitelini enfekte eden bu paraziti, E.E. Tyzer tanımlamış, önceden bilinen koksidian parazitlerin aksine ookistlerin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistlerinin bulunmasıyla *Cryptosporidium* (=gizli sporokistler) olarak isimlendirmiştir.⁹⁻¹² Tyzer 1910 yılında *Cryptosporidium muris*'i (*C. muris*), 1912 yılında ise *C. muris*'den daha küçük olan *Cryptosporidium parvum*'u (*C. parvum*) yeni bir tür olarak bildirmiştir.^{7, 9, 13, 14} Slavin 1955'te hindilerde şiddetli ishal ve ölüme neden olan *Cryptosporidium meleagridis*'i (*C. meleagridis*) tanımlamıştır.^{7, 15} Günümüze kadar tanımlanan türler moleküler veriler kullanılarak gözden geçirilmiş ve 26 farklı *Cryptosporidium* türünün varlığı kabul edilmiştir.¹⁶

Cryptosporidium ile ilgili ilk insan enfeksiyonu 1976 yılında, gastroenteritli 3 yaşında bir kızda ve daha sonra da immun sistemi baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide görülmüş olup bu olgu bir çiftlikte yaşayan hayvanlarda saptanan enfeksiyonla aynı zaman ortaya çıkmıştır. Bu sebeple Kriptosporidyoz'un bir zoonoz olabileceği düşünülmüştür. 1981-1982 yıllarında ise AIDS'li hastalarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonları saptanmış ve şiddetli enterite neden olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerde görülen, uzun süreli, bol sulu dışkı, zayıflama gibi belirtiler enfeksiyonun fırsatçı patojen olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki yıllarda yayımlanan araştırmalarda hayvan bakıcılarında, turistlerde ve bağışık sistemi sağlam kişilerde de salgınlara neden olduğu bildirilmiştir.^{10, 11, 17, 18}

2.1.1.2. Sınıflandırma

Tablo 2.1. *Cryptosporidium* cinsine ait sınıflandırma^{19, 20}

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

Tablo 2.2. Moleküler bilgiler ışığında tanımlanan türler ve yerleştiği başlıca konaklar ¹⁶

Tür	Araştırmacı - Tarih	Başlıca Konak
<i>C. muris</i>	Tyzzer (1907, 1910)	Kemirgen
<i>C. wrairi</i>	Wetterling ve ark. (1971)	Kobay
<i>C. felis</i>	İseki (1979)	Kedi
<i>C. serpentis</i>	Levine (1980)	Yılan ve Kertenkele
<i>C. meleagridis</i>	Slavin (1955)	Kuşlar ve İnsan
<i>C. parvum</i>	İlk Tanımlama: Tyzzer (1912) Yeniden tanımlama: Upton ve Current (1985)	Geviş getirenler
<i>C. baileyi</i>	Current ve ark. (1986)	Kuşlar
<i>C. varanii</i>	Pavlašek ve ark. (1995)	Kertenkele
<i>C. andersoni</i>	Lindsay ve ark. (2000)	Sığır
<i>C. canis</i>	Fayer ve ark. (2001)	Köpek
<i>C. molnari</i>	Alvarez- Pellitero ve Sitja-Bobadilla (2002)	Balık
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan ve ark. (2002)	İnsan
<i>C. galli</i>	İlk Tanımlama: Pavlašek (1999) Yeniden tanımlama: Ryan ve ark. (2003)	Kuşlar
<i>C. suis</i>	Ryan ve ark. (2004)	Domuz
<i>C. bovis</i>	Fayer ve ark. (2005)	Sığır
<i>C. fayeri</i>	Ryan ve ark. (2008)	Keseliler
<i>C. fragile</i>	Jirku ve ark. (2008)	Karakurbağası
<i>C. macropodum</i>	Power ve Ryan (2008)	Keseliler
<i>C. ryanae</i>	Fayer ve ark. (2008)	Sığır
<i>C. xiaoi</i>	Fayer ve ark. (2010)	Koyun ve Keçi
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer ve ark. (2010)	Primat, Kemirgen, Geviş getirenler
<i>C. cuniculus</i>	İlk Tanımlama: İnmac ve Takeuchi(1979) Yeniden tanımlama: Robinson ve ark. (2010)	Tavşan
<i>C. tyzzeri</i>	Ren ve ark. (2012)	Kemirgen
<i>C. viatorum</i>	Elwin ve ark. (2012)	İnsan
<i>C. scrofarum</i>	Kvac ve ark. (2013)	Domuz
<i>C. erinacei</i>	Kvac ve ark. (2014)	Kirpi ve At

Moleküler çalışmaların son zamanlarda hız kazanması, *Cryptosporidium*'un taksonomisi ve türlerin ayırımında yararlı olmuştur.^{7, 21} Özellikle PCR-RFLP ve sekans analizi gibi yöntemlerle tür ayırımı yapılabilmektedir.^{22, 23} Spesifik gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ile parazitin biyolojik özellikleri ve bulaş yolu hakkında daha fazla bilgi edinilmiştir.^{24, 25} Bu moleküler yöntemlerden elde edilen veriler kullanılarak *Cryptosporidium* türleri yeniden değerlendirilmiş ve şu an için 26 farklı türün olduğu

anlaşılmıştır.¹⁶ Bu türlerden 6'sı insan cryptosporidiosis olgularının en yaygın etkenleridir. Bu türler sırasıyla; *C.hominis*, *C.parvum* bunları *C. meleagridis* izler, bazen de *C. cuniculus*, *C. felis* ve *C. canis* görülür.

2.1.1.3. Morfolojisi

Cryptosporidium spp'nin gelişimi mide ve bağırsak epitelyum hücrelerinin fırça kenarları içinde olur. Hücredeki yerleşim yeri nedeniyle diğer hücre içi parazitlerden ayrılır. Diğer parazitler hücrenin sitoplazması içine yerleşirken, *Cryptosporidium* türleri hücrenin ekstrasitoplazmik alanına yerleşir ve birbirini izleyen eşeyli ve eşeysiz üremeye çoğalır. Yaşam döngüsünü tek bir konakta tamamlar. Parazitin yerleştiği ve konak hücre orjinli bölgeye parazitofor vakuol denir.^{20, 26} Dışkı ile dışarı atılan ookistler 2-6 µm çapında, kalın duvarlı yapıda olup, içlerinde dört sporozoit bulunmaktadır. Diğer koksidian parazitlerden farklı olarak ookistlerin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistleri yoktur.^{15, 27}

2.1.1.4. Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium türleri, aseksüel ve seksüel döllenme şekillerinin değişimi ile karakterize yaşam döngüsünü tek bir konakta tamamlar.^{10, 28} Konak dışında geçirdiği tek evre ookist evresidir.^{13, 15} Enfekte olmuş konakta başlıca altı gelişim evresi bulunmaktadır.

2.1.1.4.1. Ekskistasyon Dönemi

Ookistlerin enfekte olmuş konaktan atılması, sindirim yoluyla konak hücre tarafından alınması ve normal şartlar altında ince bağırsakta açılması “ ekskistasyon” olarak da adlandırılır. Kist açılımının nedenleri arasında pankreatik enzimler, çeşitli proteolitik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik

indirgeyici etmenler sayılabilir. Ağız yoluyla alınan ookistler uygun konakların sindirim yolunda açılır ve sporozoitler serbest hale geçer.^{20, 29}

2.1.1.4.2. Meregoni Dönemi

Konağın sindirim yolunda serbest kalan sporozoitler konağın epitelyum hücreleri (enterosit) içine girmektedirler. Bu hücrelerin mikrovillüs bölgesinde parazitofor vakuoller içinde trofozoitlere (tek nükleuslu merontlara) dönüşmekte ve daha sonra eşeysiz olarak (merogoni) çoğalarak Tip 1 merontları oluşturmaktadırlar. Tip 1 merontlar 6-8 çekirdeklidir ve her birinden 6-8 merozit oluşur. Bu merozitler yeni hücrelere girerek tekrar eşeysiz çoğalma ile Tip 1 merontları (Tip 1 meront döngüsü) veya Tip 2 merontları oluşturmaktadırlar.^{10, 20, 30}

2.1.1.4.3. Gametogoni Dönemi

Şizogoni sonrası Tip II merontların içinde oluşan 4 merozoit ve hücre parçalanınca serbest hale geçen bu merozoitler yeni bir döngü oluşturmazlar. Fakat bu merozoitler konak içinde yeni hücrelere girdiklerinde mikro veya makrogametositlere, daha sonra da makro ve mikrogametlere dönüşür.³¹

2.1.1.4.4. Fertilizasyon

Kamçısız, fakat hareketli mikrogamet, makrogameti döller ve sonucunda zigot meydana gelmektedir.¹⁰

2.1.1.4.5. Ookist duvarının oluşumu

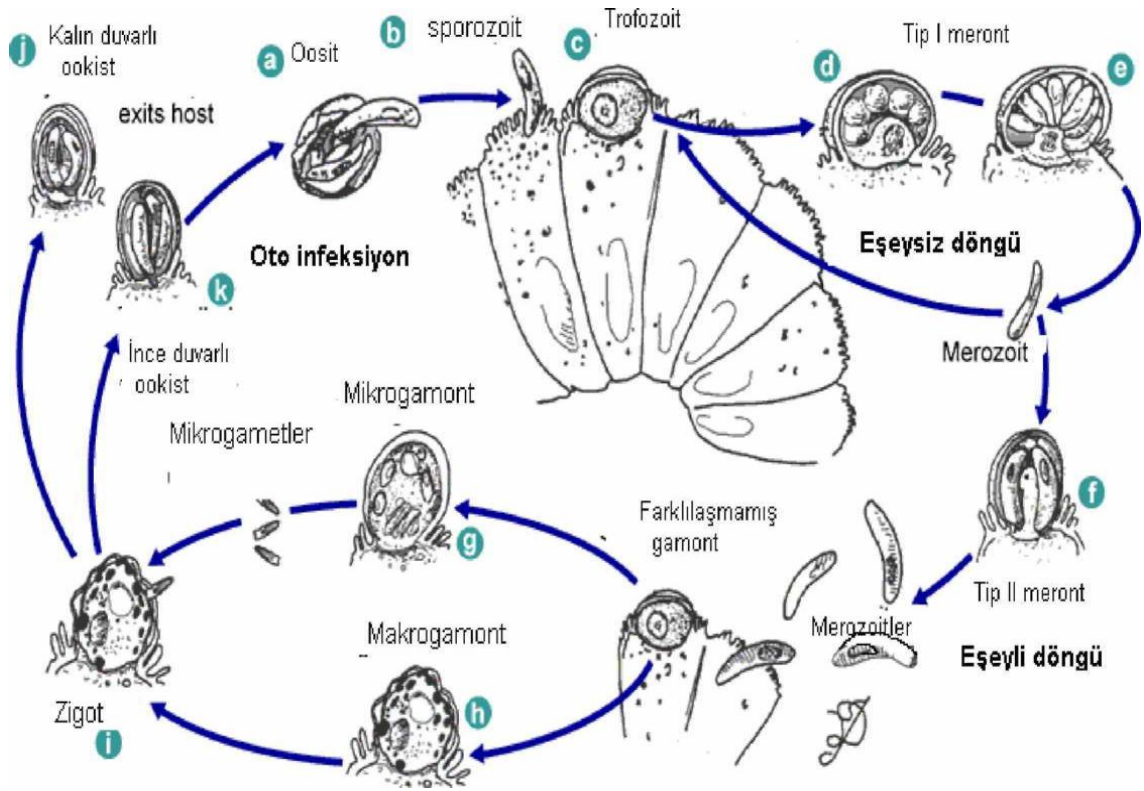
Bu dönemde zigot iki veya üç farklı tabakanın birleşmesinden meydana gelen ookist duvarıyla çevrilir.³² *Cryptosporidium*'un ookist duvarı kimyasal ve mekanik etkilere karşı dirençlidir. Ookistin elektron mikroskopunda fark edilebilen en büyük özelliklerinden birisi, ookist duvarı üzerinde ookistin yarısını veya üçte birini kuşatan şerit şeklinde bir yapının varlığıdır. İnce bağırsaklarda sporozoitler bu yapıdan dışarı

çıkar. Ookistin içerisinde sporokistler bulunmaz, sadece dört sporozoit bulunur.^{20, 33} Duvarın dış tabakası asidik özellikte glikoprotein filamentleriyle kaplıdır. Orta kısımda mikobakteriyel lipidler ve balmumu benzeri sert yapılı kompleks lipit tabakası içerir. İç tabakası ise yine glikoproteinlerden oluşmuştur. Hücre duvarında yüksek oranda lipid olması, karbol fuksin ile boyandıktan sonra asit-alkol dekolorizasyon işleminden etkilenmemesini sağlar.²⁰

2.1.1.4.6. Sporogoni Dönemi

Konak hücrede olgunlaşan ookistlerin içinde sporlanma ile enfektif sporozoitler meydana gelir. *C.parvum* 'un eşeyli üremesiyle 2 farklı tip ookist oluşumu gözlenir. Oluşan ookistlerin yaklaşık olarak %80'i kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlı bir yapı gösterir.^{31, 34} 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 yani otoenfeksiyondan sorumludurlar.^{20, 35}

Kalın çeperli yapıda olan 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışkıları ile dışarıya atılırlar ve konaklar arası bulaşmada rol oynarlar. Bu tip ookistler hem dış oto enfeksiyon yoluyla, hem kişiler arası direk temasla, hem de bulaşlı yiyecek içeceklerle ağızdan alınırlar ve bu şekilde parazitoz insanlar arası bulaşma gösterir. Yani bulaşma fekal-oral yolla, ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir. Bu kistler çevre ve iklim koşullarına uzun süre dayanıklı yapıdadır.^{36, 37} *Cryptosporidium*'a ait ookistlerin yaşam döngüsü ve gelişim evreleri şekil 2.1 de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *Cryptosporidium*'a ait yaşam döngüsünde ookistlerin gelişim evreleri²⁰

2.1.2. Epidemiyoloji

Cryptosporidium enfeksiyonu ilk olarak 1976 yılında immün sistemi baskılanmış iki insanda görülmüştür.³⁷ Bugün yapılan araştırmalarda *Cryptosporidium*'un Antartika dışında tüm dünyada görüldüğü bildirilmiştir^{15, 38} *Cryptosporidiosis*in epidemiyolojisini etkileyen birçok faktör vardır. Şöyle ki az sayıda ookistin enfeksiyonu oluşturma yeteneğine sahip olması, ookistlerin uzun süre dış ortamda canlı kalması ve birçok dezenfektana karşı dirençli olması, konaktan atıldığında enfektif özellik göstermesi, bazı genotipler için hayvanların rezervuar olması ve ayrıca İmmünsupresif olma gibi nedenler *cryptosporidiosis* epidemiyolojisini etkileyen faktörlerdir.^{15, 25}

Deneyssel ve epidemiyolojik bilgilere dayanarak, 10-100 ookistle insanların enfekte olabileceği ve primer enfeksiyondan bir süre sonra 100-1000 ookist ile reenfeksiyonun gelişebileceği bildirilmiştir.³

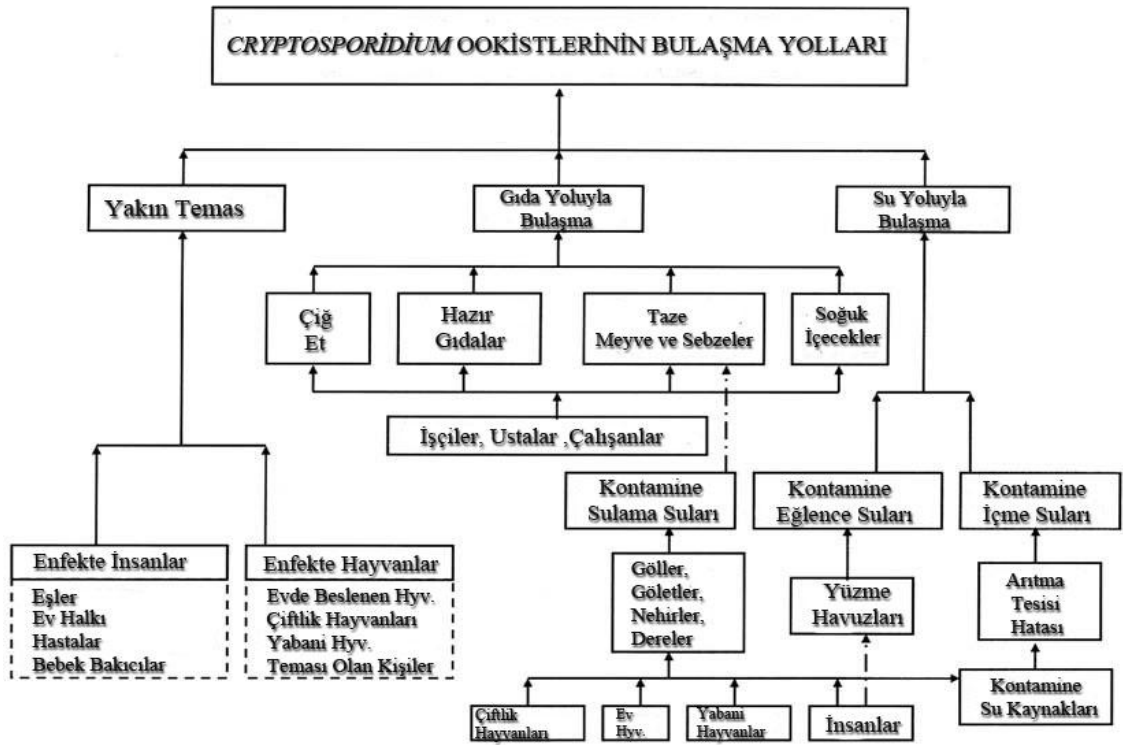
Cryptosporidium enfeksiyonları için risk faktörleri veteriner hekimlik, evcil hayvan besleme, hayvancılık ile uğraşma, laboratuvarlarda çalışma gibi nedenler ve kanalizasyon sistemleri bozuk, içme suları hijyenik olmayan yerlere seyahat etmek, enfekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama durumu^{18, 25, 39} ve immun sistemin baskılandığı durumlar sayılabilir.^{15, 18, 24, 37} Erişkinlerde *Cryptosporidium* görülme oranı çocuklara göre daha düşüktür. Çocukluk yaş grubu içerisinde ise dört yaş altındaki özellikle de iki yaş altındaki çocuklarda daha sık görülür.^{40, 41} HIV pozitif hastalarda CD4 sayısının düşük olması durumunda cryptosporidiosis görülme sıklığının daha fazla olduğu bildirilmektedir.⁴² Günümüzde güvenli olmayan içme sularının kitlesel yok edici etkisinin anlaşılmasıyla *C. parvum* CDC tarafından biyoterörizm ajanları listesine konulmuştur.⁴³

Cryptosporidium enfeksiyonunun ortaya çıkması için, fekal-oral yolla bulaşan ookistlerin enfekte insan, hayvan ya da kontamine yüzeylerle yakın temasla veya su ve yiyecekler aracılığıyla alınması gerekir.³⁷ Cryptosporidiosis, insandan insana direkt yolla, su ve besin yoluyla, hayvanlara temasla, olası hava yoluyla, toprak ve taşıyıcı konaklarla (kuşlar, arthropotlar) indirekt yolla ve seksüel yolla bulaşının gerçekleşebileceği bildirilmiştir.^{3, 10} Çocukluk çağında sık görülen insandan insana direkt bulaş, cryptosporidiosisin zorunlu zoonotik bir enfeksiyon olmadığını göstermektedir.⁴⁴ Kreşlerde ve hastanelerde ortaya çıkan salgınlar insandan insana (anthroponotik) direkt bulaşın göstergesidir.¹⁰ Ayrıca besin kaynaklı salgınlar bildirilmektedir. Turist ishaline de neden olduğu rapor edilmiştir.⁴⁵ New York'ta taze elma suyu, İngiltere'de uygun şekilde pastörize edilmemiş süt, tavuk salatası, çiğ yeşil

soğan, taze meyve ve sebzelerle hazırlanan enfekte yiyeceklerle oluşan salgınlar bildirilmiştir.¹⁸

Su kaynaklı bir patojen olan *Cryptosporidium* ookistleri hem tatlı hem de tuzlu suda aylarca enfektif olarak kalabilirler.⁴⁶ İçme suyunun rutin klorlama ve ozonlamasının *Cryptosporidium* ookistleri üzerinde öldürücü etkisi çok azdır veya hiç bulunmamaktadır.^{9, 47} Bugüne kadar bildirilmiş su kaynaklı cryptosporidiosis salgınlarının çoğunluğunun kontamine içme suyuna bağlı olarak geliştiği, ancak bir kısmının da yüzme gibi faaliyetlerde kontamine olmuş suyla temas sonucu oluştuğu bildirilmiştir.²⁴ *Cryptosporidium* ookistlerinin klora dirençli olmalarının yanında, 2.5 µm çapındaki filtrelerle yapılan arıtma işlemlerinde bu filtrelerden çok kolay geçebildikleri görülmüştür. Bu nedenle su kaynaklı salgınların önlenmesi için su arıtmasında 1 µm çapından küçük filtrelerin kullanılması önerilmektedir.³ Gıda, içecek ve çevresel sistemlerde protozon parazitlerden olan *Cryptosporidium*'un inaktivasyonu için birçok yöntem kullanılmıştır. Isıtma, soğutma, filtrasyon, çöktürme, UV ışığı, ışınlama yüksek basınç ve ses dalgalarını içeren bu fiziksel yöntemlerin parazitin infektivitesini etkilediği bildirilmektedir.⁴⁸ Bulaşmadan sorumlu ookistler günümüzde bilinen pek çok dezenfektana, soğuğa, ısıya, ve neme dirençli olup %10'luk formol de veya %50 derişik amonyak solüsyonunda 30 dakika içinde, ayrıca 60°C ve üzeri sıcaklıklarda veya -20°C sıcaklıkta 30 dakika bekletmekle inaktive olur.²⁰ *Cryptosporidium* ookistlerinin 180 rpm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7.0'de iki saat içinde öldüğü bildirilmekte, ayrıca su dezenfeksiyon işleminde kullanılan ozonlamanın, *Cryptosporidium* ookistlerinin infektivitesini 1 ppm konsantrasyonda 10 dakika süre ile ortadan kaldırdığı bildirilmiştir.⁴⁹

Cryptosporidium ookistlerinin bulaşım kaynakları ve bulaşma yolları ile ilgili ayrıntılı bilgi şekil 2.3 te verilmiştir.



Şekil 2.3. *Cryptosporidium* ookistlerinin bulaşım kaynakları^{6, 50}

Cryptosporidium ookistlerinin özellikle nemli hava ve sıcaklıkla beraber yoğunluğundaki artışa bağlı olarak, *Cryptosporidium* enfeksiyonları da artış göstermektedir. Bazı bilim adamları cryptosporidiosisin bilhassa ılık ve ıslak mevsimlerin hastalığı olduğuna dikkat çekmişlerdir. Mevsimlerin bol yağış alması, parazitin içme sularına ve bazı gıdalara bulaşma riskini artırmaktadır. Türkiye’de ise insanlarda cryptosporidiosis olgularının bahar aylarında yükselerek, Eylül ve Ekim aylarında pik yaptığı bildirilmiştir.^{19, 51-53}

Cryptosporidiosis’in epidemiyolojisi ve insidansı ile ilgili, HIV pozitif olgularda pek çok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları büyük farklılıklar göstermektedir. Bu durumun, çalışmaların planlanmasına, laboratuvar yöntemlerinin duyarlılığına, coğrafik yerleşime, seçilen çalışma grubundaki farklılıklara ve hastalığın farklı safhalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Dünyada farklı ülkelerde, dışkıda ookistlerin görülmesiyle belirlenen enfeksiyon insidansının, Avrupa ve Amerika'da %1-3, gelişmekte olan ülkelerde ise %5-10 arasında değiştiği bildirilmiştir.⁵⁴ Tanı ve teşhis yöntemlerindeki gelişmeler daha fazla olguya tanı konmasını sağlamış seroprevalans çalışmalarıyla bu enfeksiyonun çok daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Avrupa ve Amerika'da %25-35, Venezuela ve Peru'da ise seropozitiflik %65 olarak bildirilmiştir.⁵⁵ Diyare öncelikli olmak üzere semptomatik hastalar araştırıldığında Çin'de⁵⁶ %13.49, İngiltere'de⁵⁷ %2.0, Suudi Arabistan'da⁵⁸ %11.6, Zaire'de %30 oranında cryptosporidiosis saptandığı bildirilmektedir.¹⁰ Parazitin prevelansı ile AIDS 'li hastalarda yapılan çalışmalarda; Güney Afrika'da⁵⁹ %28, Kenya'da⁶⁰ %34.0, Etiyopya'da⁶¹ %26.9, Hindistan'da⁶² %17.2 Brezilya'da⁶³ %8.6, oranında *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, cryptosporidiosisin insanlarda prevelansının %0-35.5 arasında olduğu bildirilmiştir.⁶⁴ Ülkemizde cryptosporidiosis ile ilgili ilk çalışma Özcan ve ark.⁶⁵ tarafından yapılmış ishali çocuklarda %8.2, ishali olmayan çocuklarda %4.1 olarak saptanmıştır. İzmir'de Usluca¹⁵ tarafından yapılan araştırmada 21 örnekte (%12.96), Elgün¹¹ tarafından Adana'da yapılan çalışmada 37 örnekte (%24.02), İstanbul'da⁶⁶ 5 yaşın altındaki diyareli 73 çocuğun, yalnızca birinde (%1.37), Ankara'da⁶⁷ ise 50 çocuğun 7'sinde (%3.5) *Cryptosporidium* ookistleri saptanırken, Sivas'ta⁶⁸ yapılan çalışmada %19.8, Eskişehir'de⁵¹ diyareli çocuklarda %3.6, Ankara'da⁶⁹ parazitoloji laboratuvarına başvuran 32.582 kişinin 45'inde (%0.13), Konya'da⁷⁰ ise 250 kişinin katıldığı araştırmada %1.6 oranında, *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır.

Ülkemizde İmmünsupresif hasta gruplarında yapılan araştırmalarda ise şu sonuçlar alınmıştır. Ankara Onkoloji Hastanesi'nde⁴⁰ 106 neoplastik hasta üzerinde yapılan bir çalışmada %16.9, oranında ookistlere rastlanmıştır, İzmir Ege Üniversitesi

Tıp fakültesi hemodiyaliz bölümünde yapılan bir çalışmada, böbrek yetmezliği olan 46 hastanın %30.4'ün de ookist bulunmuştur.⁷¹

2.1.3. Patojenite

Cryptosporidium türleri, sindirim kanalının hemen her bölgesinde yerleşebilmekte, fakat en ağır enfeksiyon, etkenin jejunum bölgesine yerleşmesi durumunda görülmektedir.^{15, 32} *Cryptosporidium* spp.'nin neden olduğu enfeksiyonda, patolojik bulgular ile ilgili yapılmış bir çok çalışma bulunmakla beraber parazitin hastalık oluşturma mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.²² Etkenin bağırsak epitelinde fonksiyon değişikliğine neden olduğu ve aynı derecede bağırsağa ait aynı yapıyı ve sinir sistemini de etkilediği, fazla sayıdaki parazit invazyonunun mikrovillüslarda fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bilinmektedir.⁸

Cryptosporidiosis de diyarenin nedenleri arasında ince bağırsaklardaki enterositlerin ağır hasarı veya ölümü, villüs atrofisi ve lamina propriadaki hücresel enflamasyon rol oynamaktadır. Enfekte epitelyum hücrelerinden sitokinler (TNF- α , IL1, IL8) salgılanarak enflamatuvar ve bağışık sistem hücreleri bu bölgede toplanmaktadır. Epitel hücrelerinden prostoglandinler (PGE₂), enflamasyon hücrelerinden P maddesi gibi noropeptidler salınır. Bunun sonucu olarak Na⁺ emiliminde azalma, epitelyal permeabilitesinde ve Cl⁻ sekresyonunda artış nedeniyle ishal ortaya çıkmaktadır.^{10, 55} Prostoglandinler Na⁺ azalmasına aracılık ederken Cl⁻ sekresyonunu, TNF- α ise prostoglandinlerin üretimini uyarırlar.⁷² Bununla ilişkili olarak cryptosporidiosisli AIDS olgularında serum sitokin düzeyleri ile semptomlar arasında bir korelasyon bulunmazken, prostoglandin inhibitörlerinin cryptosporidiosis semptonlarını ortadan kaldırmada etkili olmadığı bildirilmiştir.⁷³ Robinson ve arkadaşları *C.parvum* ile enfekte

gönüllülerde diyarenin şiddeti ve durumu ile nöropeptid P maddesi arasındaki korelasyonu göstermiştir.^{10, 74}

C. parvum'un patolojik değişiklikler oluşturabilme yeteneği ile ilgili hücre kültüründe yapılan araştırmalarda, parazitin nükleer kondansasyona ve DNA fragmentasyonu ile karakterize apoptozise neden olduğu ortaya konmuş ve enfeksiyonun birinci gününde gözlenen bu apoptik değişikliklerin bir proteaz olan caspase aracılığı ile geliştiği tespit edilmiştir.^{8, 75}

2.1.4. İmmunité

Bugün *Cryptosporidium* da bağışık yanıt hakkında bildiklerimizin çoğu farelerde yapılmış çalışmalara dayanmaktadır.¹⁰

2.1.4.1. Hücresel İmmunité

Sitotoksik T hücreleri (CD4 T lenfositler) ve IFN- γ cryptosporidiosisin iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır. Cryptosporidiosisin kontrolünde, CD4 sayısı önemlidir. Çünkü CD4 sayısı 180 hücre/mm³'den yüksek olduğunda AIDS hastalarında enfeksiyon kendini sınırlarken, 100 hücre/mm³'ün altında enfeksiyonun kronikleştiği, 50 hücre/mm³'ün altında ise fulminan enfeksiyon tablosunun geliştiği bildirilmektedir.^{38, 39, 76, 77}

Cryptosporidiosis enfeksiyona karşı oluşan ilk immun yanıt, T-lenfosit artışı sonucu oluşan barsak enflamasyonudur. Ayrıca interlökin-12 (IL-12), interlökin-8, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinler de artış da görülmektedir.^{77, 78} IFN- γ 'nın barsaklardan salınımı, ookist atılımının kontrolünde rol oynamaktadır. IFN- γ tedavisinin barsak epitelyum hücrelerini aktive ettiği ve enfeksiyonun kısmi temizlenmesini sağladığı bildirilmektedir.^{15, 38, 79} Ayrıca IL-12'nin IFN- γ üretimini uyaran önemli bir faktör olduğu ve inaktivasyonunun kronik enfeksiyona neden olduğu bildirilmektedir.^{2, 22, 76}

2.1.4.2. Humoral İmmunite

Cryptosporidium ile enfekte olmuş insanlarda parazite karşı antikorlar üretilmektedir.¹⁵ *Cryptosporidium*'da oluşacak re-enfeksiyondan korunmada spesifik antikorların başlıca rol oynadığı düşünülmektedir.^{15, 22} Enfeksiyonda ilk önce immunglobin M (IgM), ardından immunglobin G (IgG) antikor yanıtı oluşmakta, IgG düzeyi ise birkaç ay içinde azalıp daha sonra yıllarca pozitif kalabilmektedir. Ayrıca immunglobin A (IgA) ve immunglobin E (IgE) antikorlarında da artış olmaktadır.⁷⁷

2.1.5. Klinik

Cryptosporidium enfeksiyonunun insanlarda olması için gerekli ookist sayısının 10'dan az olduğu bildirilmiştir.⁸⁰ Enfeksiyonun kuluçka süresi 2-21 gün arasında değişmektedir.⁸¹ İnsanlarda enfeksiyon şiddetini belirleyen en önemli faktör hastanın immunitesidir.^{13, 23, 39} İmmünsupresif ve immünkompetan bireylerde en önemli belirti ishaldir. Dışkının sulu görünümünde olduğu, mukuslu olabildiği fakat kan ve lokosit içermediği bildirilmektedir. Daha az sıklıkla görülen belirtiler ise bulantı, kusma, karın ağrısı, halsizlik, iştahsızlık ve baş ağrısıdır.^{12, 14, 39}

2.1.5.1. İmmün Sistemi Sağlam Bireylerde Klinik

İmmünkompetan bireylerde cryptosporidiosis genellikle iki hafta kadar sürmekte ve sonrasında ishal şikâyetinin kendiliğinden iyileştiği görülmektedir.^{2, 15, 81, 82} İshalin yanında iştahsızlık, karın ağrısı, kilo kaybı, bulantı, halsizlik, kusma ve hafif derecede ateş de gözlenebilir.²³

2.1.5.2. İmmün Sistemi Baskılanmış Bireylerde Klinik

İmmünsupresif bireylerde enfeksiyon bir- iki haftalık ishalden, kronik, yaşamı tehdit tehdit eden kolera benzeri tabloya kadar değişebilmektedir. Cryptosporidiosis; AIDS, kızamık gibi bazı viral hastalıklar, gammaglobulinlerin düştüğü hastalıklar,

kemik iliği hastalıkları, böbrek yetmezliği olan hastalar, karaciğer nakli olan hastalar, insüline bağımlı diyabet hastaları, lösemi ve diğer kanser tedavisi uygulanan hastalarda şiddetli semptomlar oluşturur. Bu tür hastalarda ishal iki aydan uzun sürmekte, enfeksiyon süresince dışkı ile ookist atılımı, şiddetli dehidratasyon, kilo kaybı ve malnütrisyon görülmektedir.^{9, 12, 15} CD4 hücre sayısı >180 hücre/ml olduğu AIDS'li kişiler cryptosporidiosis'i kısmi hafif geçirirken, bu sayının altında olanlarda kronikleşme izlendiği ve hastalığın inatçı bir durum aldığı bildirilmektedir.^{2, 7, 15, 81, 83} Bu tür hastalarda bağışıklığı baskılayan nedenlerin ortadan kaldırılması durumunda tedavide başarı sağlanabildiği bildirilmiştir.³⁴ Hastalarda sıvı kaybı oldukça fazla olup, günde 3-6 litre arasında, hatta bazı hastalarda günde 17 litreye kadar çıkabilir^{9, 23, 39, 83}. *Cryptosporidium* genellikle barsaklara yerleşmesine rağmen,² immüsupresif hastalarda barsak dışında (mide, pankreas, safra kanalları, böbrek, solunum sistemi) farklı organlarda da görülmektedir.^{24, 27, 83, 84}

2.1.6 Laboratuvar Tanı

Cryptosporidiosis'in rutin tanısı temelde dışkı taraması ve etkenin görülmesi prensibine dayanır.²⁷ Endoskopi, mukozal biopsi taramaları,^{8, 85} etkilenen dokuların radyografisi, bronşialveolar lavaj,⁸ ince barsak aspiratı, endoskopik pankreas kanalları grafisi²⁷ gibi tekniklerden de teşhis amacı ile yararlanılmaktadır. Fakat bu tekniklerin tek başına kullanımları, hastalıkla ilgili kesin ve yeterli bilgiye ulaşmada yetersizdir.⁸⁶

Hastalığın tanı ve teşhisi, serum analizi ve etkene spesifik antikorun tayini ile de yapılabilir.⁸ Cryptosporidiosis'te, ookist ve sporozoit antijenlerine karşı IgG, IgA ve IgM'ler oluşur.⁸⁷ Oluşan antikorların tespiti amacı ile IFAT (indirek immünfloresan antikor testi), ELISA ve Western blot yöntemlerinden yararlanılabilmektedir. IFAT tekniğinde ookist veya hem ookist hem de sporozoit antijenleri kullanılabilmektedir. Bu

yöntemle hastalığı geçiren kişilerde 1/40-1/640 titre de pozitif sonuçlar bulunmakta ve bu durum yaklaşık bir yıl kadar sürmektedir.⁸⁸

1. Direkt tanı yöntemleri
 - A. Mikroskopik yöntemler
 - a. Boyasız preparatlar
 - b. Boyalı preparatlar
 - B. Moleküler tanı yöntemleri
2. Serolojik yöntemler
 - A. Serumda antikor aranmasında kullanılan yöntemler
 - B. Dışkıda *Cryptosporidial* antijen aranmasında kullanılan yöntemler
 - a. ELISA (Enzim Linked İmmünassay) tekniği
 - b. DFA (Direkt İmmünfloresans) tekniği
 - c. Hızlı immünekromatografik yöntemler
3. Histopatolojik tanı yöntemleri
4. Kültür yöntemleri

2.1.6.1 Direkt tanı yöntemleri

2.1.6.1.1 Mikroskopik yöntemler

Boyasız preparatlar

Boyasız mikroskopik incelemelerde *Cryptosporidium* ookistlerinin içyapıları ve yapısal özellikleri görülememekte ve morfolojik olarak da mayalarla karışabilmektedir. Boyasız preparatların hazırlanması için yüzdürme ve çöktürme tekniklerinden yararlanılmaktadır. Yoğunlaştırma için çinko sülfat (%33), sodyum klorür (%36) Sheather'in şeker çözeltisi, kullanılmaktadır. Yalnız *Cryptosporidium* ookistleri aranacaksa en az 500 rpm ve 10 dakika süre ile santrifüj edilmelidir.^{9, 64} Dışkı

örneklerini, serum fizyolojik ile karıştırıp direk taze preparat hazırlayarak X10, X40 objektiflerde incelenebilir.⁸⁹ Boyasız preparatlarda genellikle tanı zordur ancak ön bir tarama alternatifi olarak kullanılabilir.^{8, 34}

Boyalı Preparat

Cryptosporidium tanısında diğer protozoonların tanısında kullanılan boyama yöntemleri kullanılmaz.^{34, 38} Ookistlerin gösterilmesinde Kinyouns acid-fast, modifiye acid-fast sıcak boyama, giemsa, nigrosin, safranin-metilen mavisi (SMB), karbol fuksin boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır.^{27, 86, 90} Ookistleri mantarlardan ayırt etmede en sık kullanılan, spesifik, güvenilir, ve tanı değeri yüksek yöntem acid-fast boyama yöntemidir.⁴¹ Modifiye asit-fast yönteminde ookistler pembe veya kırmızı renkte, mayalar ve dışkı artıkları ise yeşil veya mavi renkte boyanırlar.^{38, 91} Karbol fuksin boya yönteminde ise ookistler ışık kırıcı özellikte, duvarı düzgün ve oval yapılar şeklinde görülürken, zemin kırmızı renkte görülür.⁹²

2.1.6.1.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

Moleküler araştırmalar *Cryptosporidium*'un taksonomisi ve türlerin ayırımına önemli kazanımlar sağlamıştır.²¹ Klinik örnekler ve çevresel kaynaklardan *Cryptosporidium* türlerini saptamak için, PCR yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.²⁷ Donmuş, kötü koşullarda muhafaza edilmiş veya içerisinde çok az etken bulunan numunelerde tanı amacı ile PCR'ın güvenle kullanılabileceği bildirilmektedir.⁹³

PCR, hızlı ve duyarlılığı yüksek bir yöntem olmasına rağmen, yöntemi kısıtlayıcı pek çok faktörde vardır. Şöyle ki DNA izolasyonu esnasında gözden kaçmış diğer mikroorganizmalardan ve özellikle laboratuvar kaynaklı kontaminasyona bağlı olarak yanlış pozitif sonuçlar oluşabilmektedir, bu nedenle ookistlerin örneklerden dikkatlice izole edilmesi gerekmektedir. Genel olarak da PCR pahalı, zaman alıcı ve

deneyimli personele ihtiyaç duyan bir tekniktir.^{8, 37} Etkene yönelik uygun bir DNA ekstraksiyon yöntemi bulmak ve en ideal primerleri seçip kullanmak gerekmektedir.² Yaygın olarak kullanılan fenol-kloroform ekstraksiyonu,⁹⁴ dışkıda bulunan kompleks polisakkaritler, bilirubin, safra tuzları, ve bazı diğer bileşenler PCR yöntemini inhibe edebilmektedir.²

Son zamanlarda tanıda kullanılmak üzere seçilebilecek hedef moleküller konusunda detaylı bilgilere ulaşılmıştır. İzole edilen etkenin türünün, canlılığının ve enfektivitesinin tespiti amacı ile geliştirilmiş pek çok PCR tekniği mevcuttur.⁹⁵ İlk önce PCR ile uzun bir baz bölgesinin üretilip daha sonra o bölge içindeki küçük belli alanlara yönelik primerler koyularak tekrar PCR ile o bölümlerin üretildiği, klasik PCR'a göre 4-5 kat daha etkili olan nested-PCR,⁹⁶ üretilen hedef DNA miktarını dolayısıyla ortamda bulunan etken miktarını ortaya koyabilen, özel işaretli hibridizasyon problemleri kullanarak yapılan Real-Time PCR,⁹⁷ özel TaqMan problemlerinin kullanıldığı ve genel olarak Real-Time PCR'a benzeyen Taq Man PCR,⁹⁸ izolatların ayrımında kullanılan AP-PCR (arbitrary primed PCR) örnek olarak verilebilir.⁹⁹

PCR'la cryptosporidiosisın tespiti için sıklıkla 18s SSU rRNA geni¹⁰⁰(ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge), hsp 70 mRNA geni¹⁰¹ (70-kDa ısı şok proteini), β tubulin kodlayan mRNA geni,¹⁰² amyloglikosidoz enzimini kodlayan mRNA geni⁹⁵, methionin aminopeptidaz, T-kompleksprotein 1 delta (TCP-1) içeren chaperonin kodlayan genler,^{8, 103}COWP, TRAP-C1 (trombo spondin related adhesive proteins *Cryptosporidium*-1), TRAP-C2 genleri kullanılan moleküllerdendir. Duyarlılık yönünden en yaygın gen bölgelerinin, nested PCR tekniğinde kullanılan ve genomda tek kopyası bulunan dihidrofolat redüktaz enzimini kodlayan gen ile genomda 5 kopyası bulunan 18s rRNA geni olduğu bildirilmektedir.¹⁰⁴

2.1.6.2. Serolojik Yöntemler

2.1.6.2.1 Serumda Antikor Aranmasında Kullanılan Yöntemler

Bu yöntemler kullanılarak *Cryptosporidium* ookistlerine duyarlı antikorların varlığı incelenmektedir.¹⁰⁵ ELISA, IFAT ve Western blot (WB) bahsedilen yöntemler arasında bulunmaktadır.^{45, 80, 106}

Serumda *Cryptosporidium* spp.'ye spesifik antikorların tespitinde kullanılan IFAT'ın dışkıda ookist saptama yöntemleri ile birlikte kullanılması durumunda cryptosporidiosis prevalansının daha doğru olarak tespit edileceği bildirilmektedir.¹⁵ İncelenecek materyalin formalin ile tespit edildiği veya stoklama uygunsuz yapıldığında ELISA, IFAT gibi testler önemli bir teşhis alternatifidirler.⁹³ Fakat, genel anlamda antijen-antikor oluşumunu ortaya koyma prensibiyle çalışan testler, mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon verme riski, belli bir oranda taşımaktadır.³⁷

2.1.6.2.2. Dışkıda Cryptosporidial Antijen Aranmasında Kullanılan Yöntemler

Monoklonal antikor temeline dayalı DFA yöntemi dışkıda bulunan organizmaların yüzeyindeki antijenlerin immünolojik olarak tespitinde kullanılan değerli bir yöntemdir.¹¹

Serolojide tanı yöntemi olarak 1980'den beri kullanılmaya başlanan ELISA yöntemi, bir hemaglutinasyon plağı çukuru içinde oluşan antijen antikor kompleksi üzerine, enzimle işaretli anti insan IgG, IgM ve diğer antikorların eklenmesi ve substrat ilavesiyle pozitif olgularda renk oluşmasının tespitine dayanan ve parazit hastalıklarının tanısında güvenilir bir yöntemdir.^{10, 107}

İmmunokromatografik yöntemler ile kombine antijen taraması yapabilirler. Bu tekniğin en büyük avantajı, test süresinin kısa olması ve aynı reaksiyonda birden fazla sonuç alınmasıdır.¹¹

2.1.6.3. Histopatolojik Tanı Yöntemleri

1980 yılına kadar insanlardaki enfeksiyon tanısı, genellikle ince bağırsaktan, bazen de rektumdan alınan materyallerde, mukoza epitel hücrelerinin fırçası kenarlarında tek tek kümeler halinde bulunan *Cryptosporidium* cinsine ait parazitlerin gelişim dönemlerinin gösterilmesiyle yapılabilmektedir.^{9, 64, 83} Histolojik incelemelerde *Cryptosporidium*'ları bazofilik boyayan Hematoksilen eosin boyaları kullanılmakta^{9, 83} ve Hematoksilen eosin ile *Cryptosporidium* mor renkte gözükmetedir.^{15, 38}

2.1.6.4. Kültür Yöntemleri

Cryptosporidium'un konak hücre ortamındaki gelişimi ilk 2004 yılında gösterilmiştir. Bu da *Cryptosporidium*'un anlaşılmasını kolaylaştırabilecek önemli bir adım olmuştur. Parazitin tüm evrim aşamalarını hücre kültürlerinde görmek mümkündür, fakat ookist çok küçük boyutlarda olduğu için yapısının anlaşılması zordur. Kültürler, 37 °C'de ve %5'lik CO₂ ortamda inkübasyona bırakılır 48 veya 72 saat sonra alınır.¹⁰⁸

2.1.7. Tedavi

Rehidratasyon ve nutrisyonel desteği kapsayan nonspesifik destek tedavi cryptosporidiosisin klinik semptomlarının kontrolünün sağlanmasında önemlidir.^{15, 23, 39,}

2.1.7.1. İmmün Sistemi Yeterli Kişilerde Tedavi

İmmün sistemi sağlam kişilerde *Cryptosporidium* enfeksiyonları çoğunlukla kendiliğinden iyileşir, ishal yaklaşık iki haftada sonlanır. İmmünkompetan bu bireylerde nadiren oral veya intravenöz sıvı desteğine ihtiyaç duyulur.¹⁰⁹

2.1.7.2. İmmün Sistemi Baskılanmış Kişilerde Tedavi

İmmüsupresif bireylerde yaşamı tehdit edici uzun süren enfeksiyona neden olduğu için etkili bir kemoterapik ile tedaviye gereksinim vardır.⁹ Çok sayıda kimyasal ve immünoterapötik ajan ile in vivo, in vitro, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılmış fakat halen spesifik veya koruyucu tedavi bulunamamıştır.^{13, 15, 22} Bir aminoglikozid olan paramomisin en fazla kullanılan ajandır.²² Kronik ve şiddetli ishali olan tüm hastalara Nitazoksanid önerilmektedir.²³ Son zamanlarda yapılan çalışmalarda spiramisin, azitromisin, ve klaitromisin’inde enfeksiyon üzerine etkili olduğu belirtilmektedir.²⁵

İmmüsupresif bireylerde yapılan antiretrovidal tedavi ile viral yükün azalması, CD4 sayısının artması ve klinik belirtilerde hızlı düzelmeyeyle beraber ookist atılımında azalma görülmektedir.^{22, 24} Ayrıca probiyotik kullanımı ookistin sayısını azaltmakta ve atılım süresini kısaltmaktadır. Henüz *Cryptosporidium*'a yönelik aşı geliştirilememiştir.^{13, 15}

2.1.8. Korunma

Cryptosporidium ookistleri dış ortamda uzun süre canlı kalabilirler. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarını kontrol altına almak için de çevrede bulunan bu ookistlerin yayılımının önlenmesi önemlidir. Ookistler çevre koşullarına ve

dezenfeksiyon işlemine dayanıklıdır. -20 °C’de 72 saat dondurmak veya 45 °C-55 °C’de 20 dakika ısıtma işlemi ookistlerin enfektivitelerini azaltır veya yok eder.¹²

Korunmada, ellerin uygun şekilde yıkanması,^{15, 24} havuz sularının yutulmamasına özen gösterilmesi, insan ve hayvan kaynaklı dışkılar ile direkt temasın kesilmesi, içme suyunun güvenli olması için gereken tedbirler alınmalıdır.²⁴ Bilhassa, laboratuvarlar, hastaneler, gündüz bakım evleri gibi toplu yaşam alanlarında genel hijyenik kurallara dikkat edilmesinin önemli olduğu bildirilmektedir. Enfekte bireylerle temasın azaltılması, enfekte atıkların uygun şekilde yok edilmesi, şüpheli kontamine suların kullanılmadan önce kaynatılması gibi tedbirler faydalıdır.^{25, 39}

Enfekte olmuş hayvanların dışkıları, yağmur ve kar sularıyla nehirlerle ulaşarak su kaynaklı bulaşa sebep olmaktadır.²³ Evlerde kuyu suyu kullanımı veya yağışların etkisiyle yüzey suları kontamine olursa, suların filtrasyonu oldukça önemlidir.²³ enfeksiyonun önlenmesinde içme suyunun arıtılması en önemli tedbirlerdendir.¹⁸ 1 µm’den daha küçük por büyüklüğü olan filtreler ve revers ozmoz filtrelerle suyunun filtrasyonu genellikle yeterlidir.^{15, 18} *Cryptosporidium* ookistleri çok sayıda kimyasal dezenfektana dirençli olduğundan enfeksiyon kontrolü için dezanfektanların kullanımı sınırlıdır.^{25, 38, 39} En çok tavsiye edilen dezenfektan %2.5 sodyum hipoklorit solüsyonudur. %5 amonyum ve %10 formalin solüsyonunda 4°C’de 18 saat bekletmekle ookistlerin enfektivitesini ortadan kaldırdığı bildirilmektedir.⁸³ Yüksek derecede etkili ve toksik özellikteki dezenfektanlardan (etilen oksit, amonyak, metil bromid ve ozon) kullanımı en fazla olan ozondur.⁷ Yüksek konsantrasyonda Klorin sudaki ookistler üzerine az etkili veya etkisizken,^{13, 18} UV oldukça etkilidir.^{13, 38} Suyun 72 °C’de 1 dakika ısıtılması veya suyun kaynatılması ookistlerin inaktive olması için yeterlidir.¹⁸

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Ocak–Temmuz 2014 tarihleri arasında Erzurum Yakutiye Araştırma ve Uygulama Hastanesinde; intaniye, hematoloji, nefroloji, medikal onkoloji, çocuk, çocuk hematoloji, organ nakli, obstetrik, dahiliye gastroenteroloji, nefroloji kliniklerinden yaşları 0-94 arasında değişen 80 immünsupresif ve 92 immünkompetan hastanın ishal örnekleri çalışma kapsamına alındı.

Olguların tümüne gönüllü bilgilendirme formunu içeren bir anket formu uygulandı.

Çalışma için gerekli etik onay Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurulu’ndan alındı (Onay tarihi:26.12.2013 karar no:18).

3.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- ELISA yıkama cihazı
- Işık mikroskobu
- Florasan mikroskobu
- Thermal Cyclers
- Çalkalayıcı
- Vorteks
- Microplate Reader
- Açılır rotoru olan ve 13000 rpm de dönebilen santrifüj
- ELISA test kiti
- DFA test kiti
- DNA stool ekstraksiyon kiti
- DNA Loading Dye

- DNA ladder
- Tris Borik Asit
- Master Mix
- TE buffer
- 0,2 ml'lik PCR tüpü ve 1,5 ve 2,0 ml'lik ependorf tüp
- Karbol fuksin
- Metilen mavisi
- Lugol
- Sulfirik asit
- Metil Alkol
- Aseton Alkol
- Plastik dışkı kapları
- Lam, lamel
- Jel Elektroforez tankı
- UV görüntüleme sistemi

3.3. Dışkı Örneklerinin Saklanması

Çalışma kapsamına alınan dışkı örneklerine ilk önce parazitolojik inceleme yapıldıktan sonra aynı gün Modifiye ait-fast (MAF) boyama işlemi uygulandı. Kalan dışkı örnekleri hiçbir koruyucu madde eklenmeden ikiye ayrılarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. ELISA ve DFA çalışması yapılacak örnekler -20 °C' de saklandı. DNA izolasyonu yapılacak örnekler ise çalışma zamanına kadar -80 °C' de saklandı.

3.4. Yöntemler

Çalışmaya alınan ishalleri dışkı örnekleri ilk olarak nativ- lugol yöntemi ile barsak helmintleri ve protozoonları açısından değerlendirildi. Daha sonra örnekler MAF boyama yöntemi kullanılarak *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden araştırıldı.

-20 °C’ de saklanan örneklerde ELISA yöntemi uygulanarak *Cryptosporidium* spp. ookistine yönelik antijen araştırıldı. Yine aynı örneklere bu kez DFA yöntemi uygulanarak bu parazite ait antijen yapıları araştırıldı.

Kullanılan üç yöntemin herhangi birinde pozitif saptanan örneklere ayrıca PCR yöntemi uygulandı. PCR ‘da pozitif bulunan ürünler agaroz jelde görüntülendi ve oluşan bantlar markerla kıyaslandı.

3.4.1. Parazitolojik İnceleme Yöntemi

Sızdırmaz kaplarda laboratuvara getirilen ishalleri dışkı örnekleri bekletilmeden ilk önce makroskopik muayene yapıldı. Daha sonra serum fizyolojik ve lügol kullanılarak lam lamel arası preparat yapılarak X10 ve X40 objektif de parazitolojik yönden incelendi.

3.4.2. Modifiye Asit-Fast Yöntemi

1. İshalleri dışkı örneklerinden lam üzerinde kalın olmayan yayma preparat hazırlandı ve kuruması sağlandı.

2. %96-100’lük metanol’de üç dakika tutularak veya alevden üç kez geçirilerek tespit edildi.

3. Preparata Kinyoun's karbol fuksin boyası döküldü ve yaklaşık 5 dakika bekletildi bu esnada preparat alttan kaynamayacak şekilde ısıtıldı. Boyalı preparat yıkandı. Yıkama işlemine yıkama suyunun rengi renksiz oluncaya kadar devam edildi.

4. Preparat %50 aseton alkolde 3-5 saniye tutulup musluk suyunda yıkandı.

5. Preparat üzerine %1'lik H₂SO₄ döküldü 2-3 dakika beklendi. Musluk suyunda yıkandı.

6. Preparat üzerine metilen mavisi döküldü 1 dakika beklendi. Musluk suyu ile yıkandı.

7. Preparat havada kurutulduktan sonra İmmersiyon yağı dökülerek önce X40'lık objektifde daha sonra X100 objektifde ışık mikroskopunda değerlendirildi.^{15, 110}

3.4.3. ELISA Yöntemi

Hasta örneklerinde *Cryptosporidium* spp. antijenlerini belirlemeye yönelik olarak *Cryptosporidium* 2nd Nesil ELISA kit (DIAGNOSTIC AUTOMATION LOT: DALN1082) kullanıldı.



Şekil 3.1. Çalışmada kullandığımız ELISA kiti ve ELISA plate okuyucu

3.4.3.1. Örneğin Hazırlanması ve Çalışma Prosedürü

1. -20 °C’de saklanan dışkı örnekleri ve +4 °C’de saklanan reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
2. Test üretici firmanın önerisi doğrultusunda tüp dilüsyon prosedürüne göre hasta örneklerine uygulandı.
- 3 Gerektiği kadar tüp hazırlandı ve holder’e yerleştirildi. Kontroller içinde ilave tüpler konuldu.
4. Bir tüp içerisine 0.7 ml Dilüsyon Buffer (yıkama solüsyonu) ve 0.1 gr büyüklüğünde dışkı örneği kullanılarak örnek dilüsyonu hazırlandı ve kullanılmadan önce iyice karıştırıldı.
5. Bir mikropipet kullanılarak 1. kuyucuğa 100 µl negatif kontrol eklendi.

6. Başka bir mikropipet kullanılarak 2. kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol eklendi.
7. Daha sonra diğer kuyucuklara dilüsyon yapılmış örneklerden 100 µl eklendi.
8. Oda sıcaklığında (15-25 °C) 60 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra yıkandı. Yıkama işlemi 5 kez yapıldı.
9. Her kuyucuğa 2 damla enzim konjugat eklendi.
10. Oda sıcaklığında (15-25 °C) 30 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra yıkandı.
11. Her bir kuyucuğa 2 damla kromojen ilave edildi.
12. Oda sıcaklığında (15-25 °C) 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
13. Daha sonra her bir kuyucuğa 2 damla stop solüsyonu eklendi. İyice karışması sağlandı. Stop solüsyonu eklendikten sonra 5 dakika içinde reaksiyon sonuçları okundu.
14. Örneklerin bulunduğu plak bir ELISA okuyucusu kullanılarak sonuçlar okundu.

3.4.3.2. Sonuçların Yorumlanması

Havaya karşı bütün kuyucuklar 450 nm dalga boyunda okundu

Pozitif sonuç: Herhangi bir kuyu negatif kontrolden daha sarı görülüyorsa veya ELISA okuyucusunda absorbans değeri 0.15 OD (optimal density) değeri veya daha fazlasını gösterirse sonuç pozitif olarak kabul edildi.

Negatif sonuç: Herhangi bir kuyu negatif kontrolden daha sarı görülüyorsa veya ELISA okuyucusunda absorbans değeri 0.15 OD (optimal density) değerinden daha düşük ise sonuç negatif olarak kabul edildi.

3.4.4. DFA Yöntemi

3.4.4.1. Reaktif Hazırlanması

Çalışmada MERİFLOUR *Cryptosporidium/Giardia* (Made in USA) kiti kullanılmıştır.

1. Kit kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

2. İhtiyaç duyulduğu kadar wash buffer hazırlandı. Örneğin; 2.5 mL 20X wash buffer + 47.5 mL distile veya deiyonize su kullanıldı. Hazırlanan solüsyon kullanılabileceği kadar oda ısısında bekletildi.

3.4.4.2. Test Prosedürü

1. Oda ısısına getirilmiş gaita örneğinden transfer loop kullanılarak bir damla fekal örnek slayt kuyusuna aktarıldı. Bütün kuyucuk boyunca örnek yayıldı. Slaytın yüzeyinin çizilmemesine özen gösterildi.

2. Yeni bir transfer loop kullanılarak bir damla Pozitif kontrol farklı bir slayt kuyusuna aktarıldı. Bütün kuyucuk boyunca örnek yayıldı. Slaytın yüzeyinin çizilmemesine özen gösterildi.

3. Yeni bir transfer loop kullanılarak bir damla Negatif kontrol farklı bir slayt kuyusuna aktarıldı.

4. Slaytların oda sıcaklığında tamamen kuruması için beklenildi. Yaklaşık 30 dakika kadar.

5. Daha sonra her bir kuyuya bir damla Detection Reagent eklendi.
6. Her bir kuyucuğa bir damla Counterstain solüsyonu eklendi.
7. Bir stick yardımıyla reaktifler karıştırıldı ve bütün kuyucuğun yüzeyine yayıldı. Slaytın yüzeyini çizmemeye özen gösterildi.
8. Slaytlar oda sıcaklığında nemli ve güneş ışınlarını geçirmeyen bir kutu içinde 30 dakika inkübe edildi.
9. Detection Reagent ve Counterstain'in fazlası uzaklaştırılncaya kadar 1X Wash Buffer'ın yumuşak akışı ile bir yıkama şişesi kullanılarak slaytlar durulandı. Örneklerin birbirine karışmamasına ve çapraz kontaminasyon oluşmaması için dikkat edildi.
10. Slaytın uzun kenarı ile temiz bir kağıt havluya dokunarak buffer solusyonun fazlası uzaklaştırıldı. Slaytların kurumamasına dikkat edildi.
11. Her bir kuyucuğa bir damla Mounting Medium eklendi ve bir lamelle kapatıldı.
12. 100-200X büyütme kullanılarak her bir kuyucuk bütünüyle tarandı. Işıma gözlenen slaytlar daha yüksek büyütmede doğrulandı.

3.4.4.3. Sonuçların Yorumlanması:

Kontrol Sonuçları

1. *Cryptosporidium* ookistleri yuvarlaktan hafifçe oval şekle doğru 2-6 µm çapında şekillerdir. Ookist duvarları elma yeşili parlaklığında boyanacak ve bu yapı görülecek.

2. Mikroskopta arka plan materyali karşıt boya olarak mat kırmızı alanlar olmalı.
3. Negatif kontrol örnekleri elma yeşili floresan veren karakteristik kist veya ookist morfolojisi sergilememelidir.
4. Slayt hazırlama esnasında artefaktlara baēlı olarak arka planda floresan veren şekiller olabilir. Bu arka plan floresan ışımalarının parlak olmayışı, elma yeşili rengi veya kist morfolojisinde olmayışı ile kolaylıkla fark edilebilmektedir.

Hasta Örnekleri

Hazırlanan dışkı numunelerinde bir veya daha fazla yeşil elma rengine ve karakteristik kist morfolojisinde görülen örnekler *Cryptosporidium* spp.'nin bulunması açısından pozitif olarak deēerlendirildi.

Kalite Kontrol

Pozitif ve Negatif Kontroller her çalışmada hasta örnekleri ile birlikte uygulandı. Kontrol örneklerinde beklenen reaksiyonlar, şekiller görülmemişse çalışma başarısız kabul edildi ve çalışma tekrar edildi.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan DFA kiti ve kullanılan IFA florasan mikroskobu

3.4.5. Dışkı Örneklerinin *Cryptosporidium* spp. Açısından Moleküler

Yöntemlerle Değerlendirilmesi

3.4.5.1. *Cryptosporidium* İçin Primerler ve Restriksiyon Enzimlerinin Seçimi

Daha önceki çalışmalarda başarılı sonuçlar alındığı bildirilen *Cryptosporidium*'un SSU rRNA'sına yönelik primer çifti kullanıldı.

3.4.5.2. Dışkı Örneklerinden *Cryptosporidium* DNA'sının İzolasyonu

Herhangi bir koruyucu madde eklenmeden -80 °C'de dondurularak saklanmış dışkı örneklerinden i-genomic stool, DNA Extraction Mini Kit (lot no:14210146) (Intron Biotechnology, Inc. South Korea) ile üretici firmanın önerdiği prosedür doğrultusunda DNA elde edildi. *Cryptosporidium* spp. SSU rRNA proteinine yönelik rRNA F ve rRNA R primerleri kullanıldı. Elde edilen DNA ürünü %1'lik agaroz jelde görüntülendi.

3.4.5.3. DNA İzolasyonu Basamakları

(Miktarlar tek dışkı örneği içindir)

1. Dışkı örnekleri (80°C’de saklanan) oda sıcaklığına getirildi.
2. 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tübüne 180-220 mg dışkı örneği koyuldu.
3. Dışkı örneğine 200 µl SPL tamponu eklenerek karıştırıldıktan sonra kuvvetlice vorteksleyerek iyice karışması sağlandı.
4. Karışım ısı bloğunda 70 °C’de 5 dakika bekletildi.
5. Yeni bir 1,5 ml’lik tüp hazırlandı içine IR Spin Kolon yerleştirildi. Bir önceki basamakta karışımdan elde edilen süpernatant hazırlanan IR Spin Kolon'a döküldü.
6. 13,000 rpm de 1 dakika santrifuj edildi, üstteki IR Spin Kolon atıldı.
7. Karışıma 200 µl SL tamponu, 20µl Proteinase K, 5 µl RNase A eklendi kuvvetlice vortekslenerek iyice karışması sağlandı.
8. Karışım ısı bloğunda 65 °C’de 15 dakika bekletildi. Bu süre içinde her 2-3 dakikada tüp ters düz edilerek iyice karışması sağlandı.
9. Karışıma 200 µl, SB tamponu eklendi, pipetleme yaparak iyice karışması sağlandı.
10. Karışıma 250 µl etanol (% 80) eklendi, pipetleme yaparak iyice karışması sağlandı.
11. 2,0 ml’lik yeni bir toplama tüpü hazırlandı, içine Spin Kolon yerleştirildi. Bir önceki basamakta elde edilen karışımdan 750 µl bu yeni hazırlanan tüpe eklendi.
12. Karışım 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı.
13. Üstteki Spin Kolon yeni bir 2.0 ml’lik tübe aktarıldı. Spin Kolon'a 700 µl SWA tamponu eklendi. 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı.
14. Spin Kolon yeni bir 2,0 ml’lik tüpe aktarıldı. Spin Kolon'a 700 µl SWB tamponu eklendi. 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı.

15. Spin Kolon steril 1.5 µl'lik reaksiyon tüpüne aktarıldı. Üzerine direkt Spin Kolon'un membranının üzerine gelecek şekilde 50 µl SE tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin Kolon atıldı.

15. Elde edilen 50 µl DNA PCR için kullanımına kadar -20°C'de saklandı.

3.4.5.4. *Cryptosporidium* DNA'sının PCR İle Gösterilmesi

PCR

Cryptosporidium spp. için 0,2 µmol HPLC Purifiye (41 baz) rRNA F ve rRNA R birinci basamak, (48 baz) nest rRNA F ve nest rRNA R ikinci basamak primerleri (İnvitrogen, Germany) kullanıldı.

Liyofilize haldeki primerler prospektüslerinde belirtilen miktarda TE buffer ile sulandırıldı.

TE Bufferın Hazırlanması:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (pH=8,0).

- Her bir primerden 100 pmol'lük solüsyon hazırlandı. Çözündükten sonra vortekslendi.
- 10 pmol konsantrasyonu için 180µl apirojen su+ 20 µl stok primer olacak şekilde tekrar sulandırıldı.
- 50 µl'lik 4 ependorfa ayrılarak -20 °C'de saklandı.

PCR Miksinin Hazırlanması:

Birinci basamak PCR için

PCR'de hazır Master Mix (2X) (Thermo Scientific USA) kullanılmıştır

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

• PCR Master Mix (2X)	25µl
• rRNA F (10 pmol/µl) primer	1 µl
• rRNA R (10 pmol/µl) primer	1 µl
• dH ₂ O	18 µl
• Template DNA	5 µl

2- Isı döngü programı

Ependorflar ısı döngü aygıtına (termal cycler) (Mj Mini, BİO-RAD, USA) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirildi.

94°C'de 5 dk ön denatürasyon

94 °C'de 50 sn 35 döngü

55 °C'de 30 saniye 35 döngü

72 °C'de 50 sn 35 döngü

72 °C'de 10 dakika son uzatma

İkinci basamak PCR için

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

• PCR Master Mix (2X)	25µl
• nest rRNA F (10 pmol/µl) primer	1 µl
• nest rRNA R (10 pmol/µl) primer	1 µl
• dH ₂ O	18 µl
• Birinci basamak PCR ürünü DNA	5 µl

2- Isı döngü programı

Ependorflar ısı döngü aygıtına (termal cycler) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirildi.

94°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94 °C'de 50 sn 35 döngü

55 °C'de 30 saniye 35 döngü

72 °C'de 50 sn 35 döngü

72 °C'de 10 dakika son uzatma

Isı döngü aygıtı ile amplifikasyon gerçekleştirildi.¹¹¹ Her PCR çalışmasında bir pozitif, bir negatif kontrol örneği kullanıldı. Elde edilen PCR ürünü görüntüleme yöntemi uygulanıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Tablo 3.1 *Cryptosporidium* spp.'nin PCR'ında kullanılan primerler.

Hedef Gene	Primer	Dizi	Uzunluk (bp)	Anneling	Kaynak
SSU rRNA	rRNA F	5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'			
SSU rRNA	rRNA R	5'-CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA-3'	1325		
SSU rRNA	nest rRNA F	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'		55	100, 111
SSU rRNA	nest rRNA R	5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'	826		

3.4.5.5. Jel Elektroforez ve Görüntüleme

Elde edilen ürünün görüntülenmesi için yatay elektroforez cihazı kullanıldı. Elektroforez işlemi ve *Cryptosporidium* spp. türlerine ait DNA bantlarının görüntülenmesi aşağıda belirtilen sıraya göre yapılmıştır.

1. Amplifikasyon ürünlerinin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması ve görüntülenmesi amacıyla, 0,5X'lik Tris Acetate Ethylene Diamine Tetra Acetic acid [Tris-asetat-EDTA (TAE)] tamponu içinde %1'lik agaroz (Prona, EU) ısı yardımıyla eritilerek homojen hale getirilmesi sağlandı.

2. Homojenizasyonun sağlanmasını takiben çözelti yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğutuldu, daha sonra üzerine ethidium bromide (10µg/ml, Sigma, ABD) konuldu ve yavaşça karışması sağlandı.

3. Elde edilen bu karışım jel taşıyıcısına (NYX Teknik,USA) dökülerek yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar taşıyıcı üzerine yerleştirildi,

4. Yaklaşık 30 dakika sonra soğuyan agarozdaki taraklar çıkarılıp, taşıyıcı elektroforez işlemi için örneklerin elektriksel alanda yürütüleceği tanka yerleştirildi ve tankın içerisi TAE tamponu ile dolduruldu.

5. PCR ürünleri yükleme boyası (6x Loading Dye, Vivantis, Malezya) ile 1 kısım boya 5 kısım PCR ürünü olacak şekilde karıştırılarak tarakların çıkarılmasıyla oluşan kuyucuklara dikkatlice yüklendi. Amplikonların ürün büyüklüklerinin belirlenebilmesi için 100 bp'lik marker (Omega, biotech. USA) solüsyondan (1 kısım stok marker+ 1 kısım yükleme boyası+ 4 kısım su) ilk ve son kuyucuğa 2 µl yüklendi.

6. Ürünlerin ve DNA markerin kuyucuklara yüklenmesinin ardından elektrik akımına (8 volt/cm) yaklaşık 20 dakika tabi tutularak cihaz durduruldu. Daha sonra PCR ürünleri içeren jel tank içerisinden çıkarılarak jel görüntüleme sistemi (TFX 20M Vilber Lourmat, Fransa) kullanıldı ve PCR işlemi sonucu oluşan DNA bantları görüntülendi, bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı ve sonuçlar kaydedildi.

3.5. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler hasta grupları, cinsiyet, yaş grupları, kullanılan içme suyu kaynağı, yerleşim yeri gibi değişkenler arası ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılmıştır. Analizlerde SPSS yazılımı (sürüm 17.0, SPSS Inc) kullanılmış; Pearson'un ki-kare testi sonuçlarına göre $p < 0.05$ değerleri önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Yapmış olduğumuz araştırmamız, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine ishal şikayeti ile başvuran 80 immünsupresif 92 immünkompetan toplam 172 hasta üzerinde yürütülmüştür. Tüm örnekler mikroskopik ve serolojik incelemeye tabi tutulmuş, bu inceleme sonucunda herhangi biriyle pozitiflik belirlenen örnekler moleküler yöntemlerle de araştırılmıştır. Çalışmamızda bu hastalara ait 172 fekal örneğin 6'sında Modifiye asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp.'ye ait olduğu düşünülen ookistler görüldü. Mikroskopta incelenen bu ookistler yoğunluk olarak değişkenlik gösterdi. Serolojik yöntemlerden ELISA yönteminin kullanılmasıyla 172 hasta örneğinin 10'unda pozitiflik, DFA yönteminin kullanılmasıyla da 7 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Moleküler yöntemler kullanılarak bu pozitiflikler araştırılmış ve 2 örnekte *Cryptosporidium* türlerine ait DNA'lar gösterilebilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan hastaların 84'ü kadın 88'i erkek idi. Yaşları en az ve en fazla 0-94 yaş arasında değişen hastaların ortalaması: 34.8605, Standart sapması: 24.63828 idi. Yine bu 172 hastanın 49'u 0-14 yaş arası, 123'ü 15 yaş ve üzerindeydi.

Çalışma kapsamına alınan hastaların 99'u (%57.6) şehirde, 73'ü (%42.4) ilçe ve köylerde oturmakta idi. Olguların içme suyu kullanma durumları değerlendirildiğinde şebeke suyu ve hazır su kullananların sayısı 141 (%82), kuyu suyu kullananların sayısı ise 31 (%18) idi.

Tablo 4.1. Çalışmada yaş gruplarının cinsiyete göre dağılımı

Yaş Aralığı	Kadın	%	Erkek	%	Toplam
0-14	20	%40.8	29	59.2	49
15 yaş ve üstü	64	%52.0	59	48.7	123
Toplam	84	%48.8	88	51.2	172

Tablo 4.2. Çalışmaya alınan hastaların kliniklere göre dağılımı ve oranları

Klinikler	Sayılar(n)	Oran %
İntaniye	54	31.4
Medikal Onkoloji	14	8.1
Hematoloji	17	9.9
Organ Nakli	6	3.5
Nefroloji	5	2.9
Çocuk	39	22.7
Çocuk Hematoloji	2	1.2
Radyasyon Onkoloji	3	1.7
Obstetrik	4	2.3
Dahiliye	28	16.3
Toplam	172	100

MAF boyama yöntemi kullanılarak hazırlanmış olduğumuz preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri mavi zemin üzerinde x40 büyütmede etrafı koyu bir hale ile kuşatılmış parlak yuvarlak şekiller olarak görülmüştür. Daha sonra bu preparatlar x100 büyütmede immersiyon kullanılarak yapılan incelemelerde sporozoit yapıları fark edilmiştir.

MAF boyama yöntemi kullanarak yaptığımız çalışmada immünsüpresif hasta grubunda 3 kişi de (%3.8), immünkompetan hasta grubunda ise 3 kişi (%3.3) pozitif olarak değerlendirilmiştir. İmmünsüpresif hasta grubunda, immünkompetan hastalara göre daha yüksek oranda görülmesine rağmen istatistiki olarak bu yükseklik anlamlı değildi (tablo 4.3).

Tablo 4.3. MAF boyama yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookist pozitifliğinin hasta gruplarına göre dağılımı

Hasta Grubu	Modifiye asit fast boyama				Toplam		X ² değeri	P değeri
	Negatif		Pozitif					
İmmünsupresif	77	%96.2	3	%3.8	80	%100	,030	,591
İmmünkompetan	89	%96.7	3	%3.3	92	%100		
Toplam	166	%96.5	6	%3.5	172	%100		

Boyama sonucu elde ettiğimiz sonuçları yaş gruplarına göre incelediğimizde 0-14 yaş grubunda (%8.2), 15 yaş ve üstü grupta (%1.6) pozitiflik saptandı. İstatistiki olarak sonuçlar karşılaştırdığımızda 0-14 yaş grubunda sınırda anlamlı kabul edilecek düzeyde yüksek oranda pozitiflik bulunduğunu söyleyebiliriz (tablo 4.4).

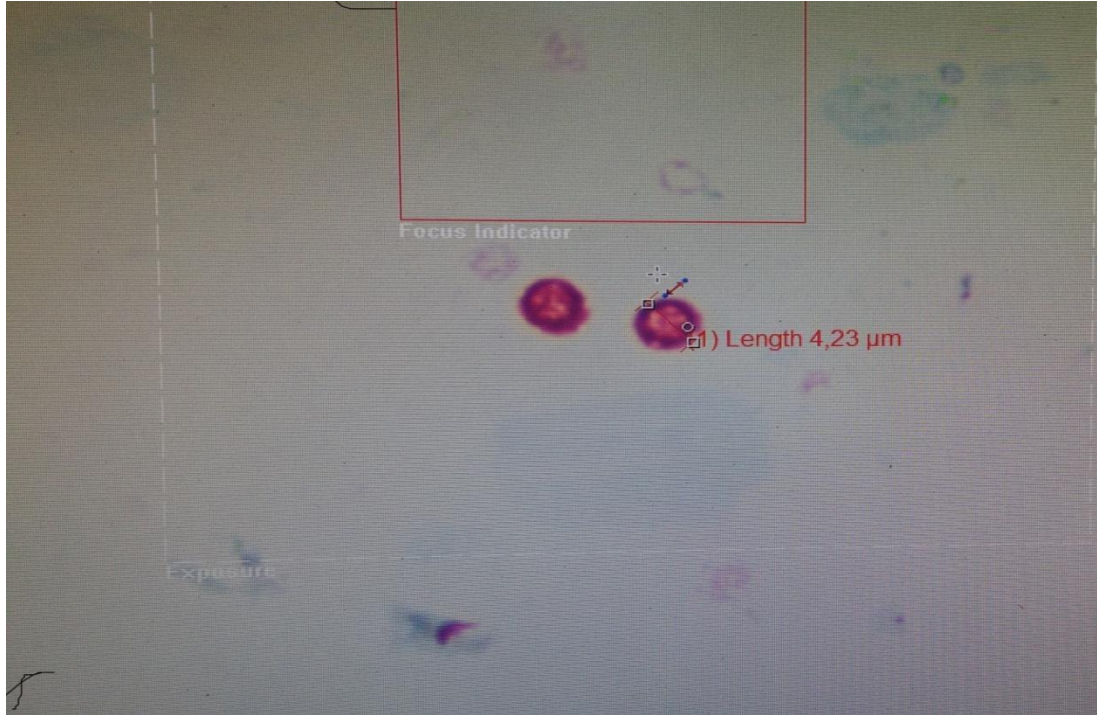
Tablo 4.4. MAF boyama yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookist pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu	Modifiye asit fast boyama				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
0-14	45	%91.8	4	%8.2	49	%100	4,448	0.056
15 yaş ve üstü	121	%98.4	2	%1.6	123	%100		
Toplam	166	%96.5	6	%3.5	172	%100		

Boyama sonucu elde edilen verileri cinsiyete göre karşılaştırdığımızda cinsiyete göre *Cryptosporidium* spp. ookisti bulunma durumu istatistiki anlamda herhangi bir farklılık göstermemiştir (tablo4.5).

Tablo 4.5. MAF boyama yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookist pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Modifiye asit fast boyama				Toplam	X ²	P
	Negatif		Pozitif				
Erkek	85	%96.6	3	%3.4	88	%100	,003 ,637
Kadın	81	%96.4	3	%3.6	84	%100	
Toplam	166	%96.5	6	%3.5	172	%100	



Şekil 4.1. MAF boyamada *Cryptosporidium* ookistlerinin görünümü (X100)

172 hastaya ait dışkı örnekleri nativ-lugol ile yöntemiyle incelendi ve bulunan parazitlerin sayısı ve yüzdesi tablo 4.6. da gösterilmiştir

Tablo 4.6. Dışkı örneklerinde mikroskopik muayene sonucu bulunan parazitler

Görülen Türler	Sayı	Yüzde (%)
<i>Giardia intestinalis</i>	4	2.3
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0.6
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	0.6
<i>Blastocystis hominis</i>	1	0.6
<i>Cyclospora sp.</i>	1	0.6
<i>Endolimax nana</i>	1	0.6

ELISA yöntemi kullanılarak 172 fekal örnek incelendi. Bu örneklerin 10' unda *Cryptosporidium spp.*'ye ait antijen tespit edildi. ELISA test kiti prosedürüne göre kör (blank) negatif kontrol 1, negatif kontrol 2, pozitif kontrol 1 ve pozitif kontrol 2 kullanılarak uygulanan yöntem ile çalışılan örneklerin bulunduğu plak ELISA okuyucusunda 450 -630 nm'de okutuldu. Bu cihazda 0.15 OD ve bu değerin üstü pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.2. Çalışmamızdaki ELISA plağında kör, negatif kontrol (NK) 1, NK 2, pozitif kontrol (PK)1, PK 2; pozitif ve negatif kuyuların görünümü (81 hasta sonucu)



Şekil 4.3. Çalışmamızdaki ELISA plağında blank, negatif kontrol (NK) 1, NK 2, pozitif kontrol (PK)1, PK 2; pozitif ve negatif kuyuların görünümü (91 hasta sonucu)

Pozitif olguların hasta gruplarına göre dağılımına bakıldığında İmmüsupresif hasta grubunda 5 kişi de (%6.3) immünkompetan kontrol grubunda ise yine 5 bireyde (%5.4) ELISA yöntemiyle sonuç pozitif idi (tablo 4.7).

Tablo 4.7. ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* antijen pozitifliğinin hasta gruplarına göre dağılımı

Hasta Grubu	ELISA				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
İmmüsupresif	75	%93.7	5	%6.3	80	%100	,052	,536
İmmünkompetan	87	%94.6	5	%5.4	92	%100		
Toplam	162	%94.2	10	%5.8	172	%100		

Pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımını incelediğimizde 0-14 yaş aralığında 5 hasta (%10.2), 15 yaş ve üzeri grupta ise yine 5 kişi (%4.1) pozitif olarak değerlendirildi (tablo 4.8).

Tablo 4.8. ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Aralığı	ELISA				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
0-14	44	%89.8	5	%10.2	49	%100		
15 yaş ve üstü	118	%95.9	5	%4.1	123	%100	2,412	,119
Toplam	162	%94.2	10	%5.8	172	%100		

Hastaların kullanmış oldukları içme suyu kaynağına göre sonuçlarını karşılaştırdığımızda şebeke suyu veya hazır su kullananlarda (%4.3), kuyu suyu kullananlarda ise (%12.9) oranın da pozitiflik saptandı. Kuyu suyu kullananlarda yüksek pozitiflik sınırda anlamlı olduğu gözlemlendi (tablo 4.9).

Tablo 4.9. Hastaların kullandıkları su kaynağına göre ELISA ile *Cryptosporidium* bulunma sayısı ve oranları

Kullanılan Su	ELISA				Toplam		X ²	P
Kaynağı	Negatif		Pozitif					
Şebeke suyu+hazır su	135	%95.7	6	%4.3	141	%100.0	3,471	,083
Kuyu Suyu	27	%87.1	4	%12.9	31	%100.0		
Toplam	162	%94.2	10	%5.8	172	%100.0		

Hastalarda ELISA ile cinsiyete göre *Cryptosporidium* spp. ookisti bulunma durumu incelenmiş erkeklerde (%5.7), kadınlarda (%6.0) bulunmuştur. Cinsiyet ile *Cryptosporidium* pozitifliği arasında herhangi bir fark bulunmamıştır (tablo 4.10).

Tablo 4.10. ELISA yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookist antijen pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	ELISA				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
Erkek	83	%94.3	5	%5.7	88	%100	,006	,597
Kadın	79	%94.0	5	%6.0	84	%100		
Toplam	162	%94.2	10	%5.8	172	%100		

Hastaların ikamet ettikleri yerlerini göz önünde bulundurarak ELISA antijeni saptanma durumunu incelediğimizde şehirde oturanlarda (%2.0), ilçe ve köyler de oturanlarda ise (%11.0) pozitiflik bulunmuştur. İlçe ve köylerde oturanlarda yüksek *Cryptosporidium* antijen pozitifliği görülmesi anlamlı bulunmuştur (tablo 4.11).

Tablo 4.11. ELISA yöntemi ile saptanan *Cryptosporidium* spp. ookist antijen pozitifliğinin yerleşim yerine göre dağılımı

Yerleşim Yeri	ELISA				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
Şehir	97	%98.0	2	%2.0	99	%100	6,131	,016
İlçe+Köy	65	%89.0	8	%11.0	73	%100		
Toplam	162	%94.2	10	%5.8	172	%100		

DFA sonuçlarına göre 172 diyare şikayeti olan hastalardan 7 tanesi pozitif olarak değerlendirildi. Bu pozitif sonuçların immünsüpresif ve immünkompetan hastalara göre dağılımını incelediğimizde immünsüpresif grup da yer alan bireylerde (%5.0), immünkompetan bireylerde ise (%3.3) olarak bulundu (tablo 4.12).

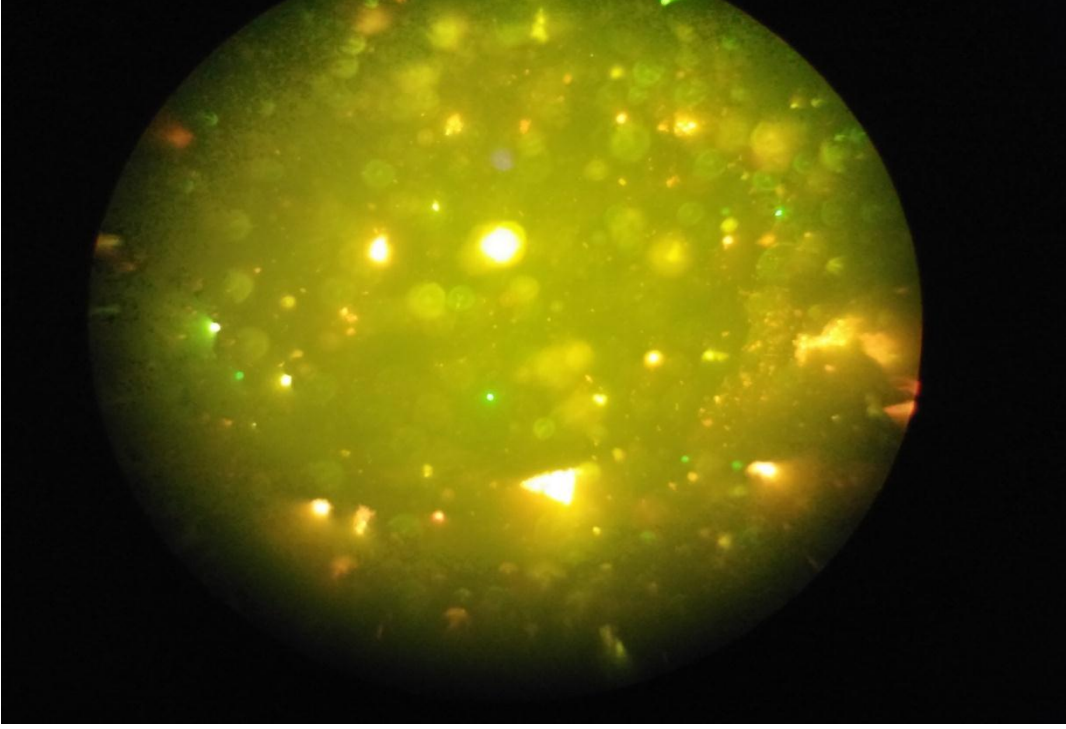
Tablo 4.12. DFA yöntemi ile *Cryptosporidium* antijen pozitifliğinin hasta gruplarına göre dağılımı

Hasta Grubu	DFA				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
İmmünsupresif	76	%95.0	4	%5.0	80	%100	,332	,423
İmmünkompetan	89	%96.7	3	%3.3	92	%100		
Toplam	165	%95.9	7	%4.1	172	%100		

DFA yöntemi kullanarak yaptığımız çalışmada, yaş gruplarına göre pozitifliği ayrı ayrı incelediğimizde 0-14 yaş aralığında (%8.2) pozitiflik, 15 yaş ve üstü grupta (%2.4) oranında pozitiflik bulunmuştur (tablo 4.13).

Tablo 4.13. DFA yöntemi ile *Cryptosporidium* antijen pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Aralığı	DFA				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
0-14	45	%91.8	4	%8.2	49	%100	2,941	,103
15 yaş ve üstü	120	%97.6	3	%2.4	123	%100		
Toplam	165	%95.9	7	% 4.1	172	%100		



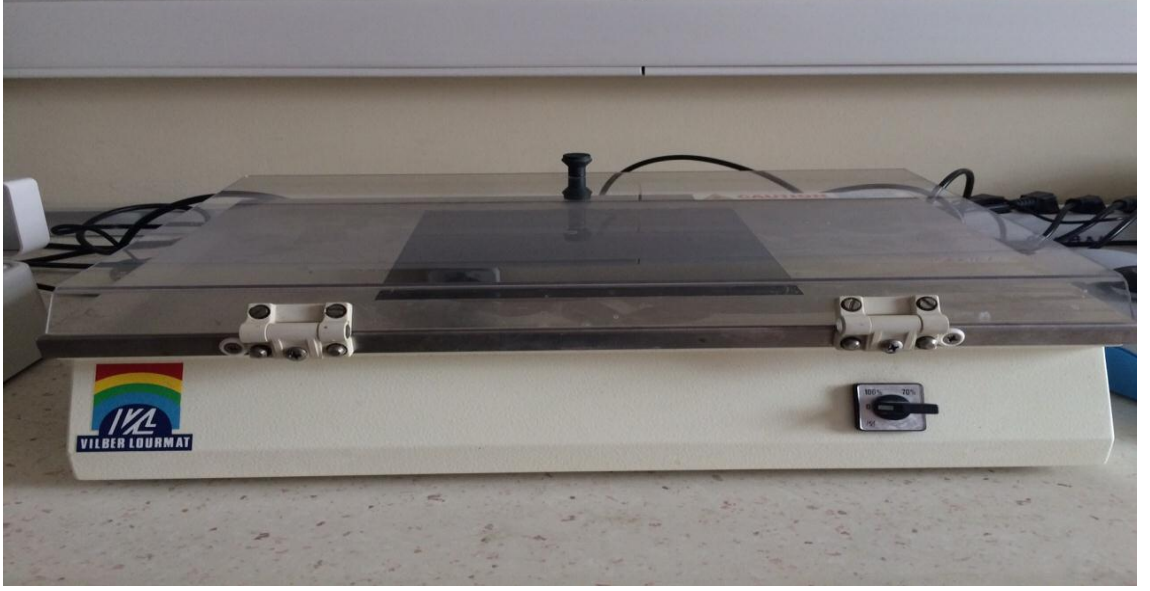
Şekil 4.4. DFA ile *Cryptosporidium* spp. ookisti saptanan örneklerden biri (X40)

DFA yöntemi kullanarak inceleme yaptığımız 172 dışkı örneğinin 8'inde *Giardia*'ya ait kistler saptandı (şekil 4.5).



Şekil.4.5. DFA ile *Giardia* saptanan örneklerden birinin resmi(X40)

PCR çalışmaları için -80C' de saklanan örneklerden mikroskop ve serolojik yöntemlerden pozitif kabul edilen dışkı örnekleri çalışmaya alınmış olup bunlardan 2 tanesinde *Cryptosporidium* spp.'ye özgü bantlara rastlanmıştır.



Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan UV görüntüleme cihazı



Şekil 4.7. PCR çalışmalarında kullanılan jel elektroforez tankı ve thermal cycler

PCR yöntemiyle pozitif olarak değerlendirilen hastaların dağılımına baktığımızda immünsüpresif grupta (%0), immünkompetan grupta ise (%2.2) idi (tablo 4.14).

Tablo 4.14. PCR ile farklı hasta gruplarında *Cryptosporidium* araştırılması

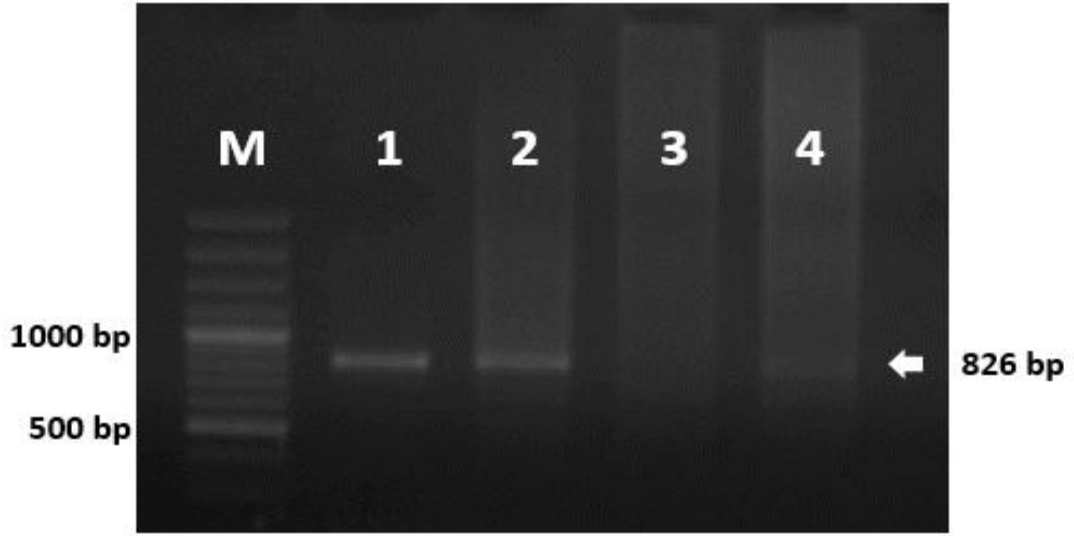
Hasta grup	PCR				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
İmmünsupresive	80	%100	0	%0.0	80	%100	1,760	,285
İmmünkompetan	90	%97.8	2	%2.2	92	%100		
Toplam	170	%98.8	2	%1.2	172	%100		

PCR sonuçlarını yaş gruplarına göre değerlendirdiğimizde 0-14 yaş grubunda (%4.1), 15 yaş ve üzeri grupta (%0.0) olarak bulundu (tablo 4.15).

Tablo 4.15. PCR ile farklı yaş gruplarında *Cryptosporidium* araştırılması

Yaş Grup	PCR				Toplam		X ²	P
	Negatif		Pozitif					
0-14	47	%95.9	2	%4.1	49	%100	1,400	,329
15 yaş ve üstü	123	%100.0	0	%0.0	123	%100		
Toplam	170	%98.8	2	%1.2	172	%100		

Çalışmamızda PCR ile *Cryptosporidium* türleri yönünden pozitif bulunan örneklerin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi sonucu oluşan pozitif bant görüntülerinin UV sistemi altındaki görüntüsü şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların agaroz jelde yürütülmesi sonucu UV ışık altındaki PCR görüntüsü. M: Marker (100bp ladder) 1,2:*Cryptosporidium* pozitif hasta sonucu, 3: *Cryptosporidium* negatif kontrol, 4: pozitif kontrol (826 bp).

DFA yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (tablo 4.16).

Tablo 4.16. ELISA sonuçları ile DFA sonuçlarının karşılaştırılması

Test edilen	DFA pozitif	DFA negatif	Toplam
ELISA pozitif	7	3	10
ELISA negatif	0	162	162
Toplam	7	165	172

Duyarlılık: 100.0

Özgüllük: 98.18

Pozitif kestirim değeri: 70.0

Negatif kestirim değeri: 100.0

Testin doğruluk oranı: 98.26

DFA boyama yöntemi baz alınarak MAF boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (tablo 4.17).

Tablo 4.17. MAF boyama yöntemi ile elde edilen sonuçların DFA sonuçları ile karşılaştırılması

Test edilen	DFA pozitif	DFA negatif	Toplam
MAF pozitif	6	0	6
MAF negatif	1	165	166
Toplam	7	165	172

Duyarlılık: 85.71

Özgüllük: 100.0

Pozitif kestirim değeri: 100.0

Negatif kestirim değeri: 99.4

Testin doğruluk oranı: 99.42

PCR ile elde edilen sonuçların DFA boyama sonuçları ile karşılaştırılması (tablo 4.18).

Tablo 4.18. PCR sonuçları ile DFA sonuçlarının karşılaştırılması

Test edilen	DFA pozitif	DFA negatif	Toplam
PCR pozitif	2	0	2
PCR negatif	5	165	170
Toplam	7	165	172

Duyarlılık: 28.57

Özgüllük: 100

Pozitif kestirim değeri: 100

Negatif kestirim değeri: 97.06

Testin doğruluk oranı: 97.09

ELISA yöntemi baz alınarak DFA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (tablo 4.19).

Tablo 4.19. DFA yöntemi sonuçları ile ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

Test edilen	ELISA pozitif	ELISA negatif	Toplam
DFA pozitif	7	0	7
DFA negatif	3	162	165
Toplam	10	162	172

Duyarlılık: 70.0

Özgüllük: 100

Pozitif kestirim değeri: 100

Negatif kestirim değeri: 98.18

Testin doğruluk oranı: 98.26

Tablo 4.20. *Cryptosporidium* saptanan hastalara ait demografik özellikler klinik ve laboratuvar bulguları

Hasta No	Klinik	Yaş	Cinsiyet	Modifiye asit fast	ELISA	DFA	PCR	İçme suyu kaynağı	Eşlik eden hastalık	Karın ağrısı
17	İntaniye	65	K	+	+	+	-	kuyu	lösemi	+
28	Medikal onkoloji	80	K	-	+	-	-	şebeke	Mide malign neoplazm	+
62	Organ nakli	45	E	+	+	+	-	şebeke	-	+
67	Radyasyon onkoloji	41	K	-	+	+	-	şebeke	meme ca	-
76	Hematoloji	3	E	+	+	+	-	kuyu	lenfosarkom	+
117	İntaniye	43	E	-	+	-	-	kuyu	-	+
119	Çocuk	2	K	+	+	+	-	kuyu	-	-
120	Çocuk	1	E	-	+	-	-	şebeke	-	-
128	Çocuk	1	E	+	+	+	+	kuyu	-	-
161	Çocuk	10	K	+	+	+	+	şebeke	-	+

5. TARTIŞMA

Kanserli olgu sayılarında son yıllarda gözlenen artış, immüsupresyon, immüsupresif ilaçların artan kullanımı, nüfusun yaşlanması ve malnütrüsyon sonucunda paraziter enfeksiyonlara duyarlılık artmıştır. Cryptosporidiosis de dünyanın birçok bölgesinde giderek yaygın hale gelen, hem immün yetmezliği bulunanlarda hem de immün sistemi sağlam bireylerde sağlık problemi oluşturan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle nosokomiyel ishallerde üçüncü en sık patojen (%7.2) olarak yer alması *Cryptosporidium*'un önemini daha da arttırmaktadır.^{20, 112, 113}

İshalli hastalarla yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* Avrupa ve Kuzey Amerika'da %1-4, Afrika, Asya, Avustralya, Güney ve Orta Amerika'da %3-20 oranlarında olduğu bildirilmiş, ülkemizde farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda ise görülme sıklığının %0-35.5 olduğu bildirilmiştir.¹¹⁴

Gelişmekte olan ülkelerdeki ishallerin de %12'sinden, gelişmiş ülkelerdeki ishallerin ise %7'sinden, *Cryptosporidium* türlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir.^{113, 115}

Hastalığın bulaşmasının genel olarak fekal-oral yol ile olduğu, direkt veya indirekt temas, kontamine olmuş kaynak veya içme suları, yine kontamine olmuş gıdalar ve ihtimalle havanın bulaşmaya neden olabileceği bildirilmiş, kurumaya oldukça duyarlı olan parazit açısından suların özel öneme sahip olduğuna dikkat çekilmiştir.^{8, 37}

Enfeksiyonun görülmesinde cinsiyetin etkisinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde cinsiyet farkı ile enfeksiyon görülme arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir.^{15, 116, 117}

Bizim çalışmamızda az sayıda dışkı örneği incelenmiş olmasına rağmen enfeksiyonunun görülmesinde cinsiyetin etkisinin olmadığı görülmüştür.

Gelişmiş ülkelerin birçoğunda cryptosporidiosis olguları 1-4 yaşlar arasında daha fazla görülmektedir.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Bu yaş grubunda hijyen eksikliğine bağlı bulaşım daha kolay olması ve bağışıklık sistemin yeterince gelişmemesi bu yaştaki prevalansı etkilemektedir.¹¹⁹ Bu nedenle *Cryptosporidium*'un çocukluk dönemindeki ishalleri hastalıklarda önemli bir etyolojik etken olduğu ve ishalleri dışkıların rutin parazitolojik değerlendirilmesinin gerektiği düşünülmüştür.¹¹⁶

Fathy ve ark.¹²⁰ Mısır'da 250 çocuğu kapsayan çalışmalarında 56 çocukta (%22,4) oranında PCR ile pozitiflik bulunurken, Hindistan da Shah ve ark.¹²¹ yaptıkları çalışmada 175 ishal şikayeti bulunan çocuklardan 7'sinde (%4) Kinyoun's asit fast boyama ile, ELISA yöntemi ile 48 çocukta (%27,4) pozitiflik bulunmuştur. Brezilyada Saredi ve ark.¹²² yaptığı başka bir çalışmada ise 553 çocuğun 21'inde (%3.8) modifiye Kinyoun's boya metoduyla pozitiflik bulunmuştur.

Yılmaz ve ark.¹²³ Van'da 2000 çocuğu kapsayan çalışmalarında ELISA ile 97'sinde (%4.9), boyama ile 39'unda (%1.95) *Cryptosporidium* ookisti bulmuşlardır. Akyön ve ark.⁶⁷ Ankara'da 12 yaşın altında 200 ishalleri ve 50 sağlıklı çocukta IFA, DFA, Giemsa boyama, ve MAF boyama yöntemleriyle inceleme yapmışlar ve 7 çocukta (%3.5) *Cryptosporidium* ookisti saptamışlar. Eskişehir'de Doğan ve ark.⁵¹ 0-6 yaş grubunda ishalleri 607 çocuğun 22'sinde (%3.6), Elazığ'da Çiçek tarafından yapılan araştırmada 0-5 yaş grubu 417 çocuğun 19'unda (%4.55) boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookistleri bulunmuştur.³³ Yine Diyarbakır'da 2011 de ishal şikayeti olan 5 yaş altı 178 çocuğun 8'inde(%4.49) ELISA ile pozitiflik bulunmuştur.²⁰

Çalışmamızda 0-14 yaş arasında 49 çocukta ELISA yöntemi ile 5'inde *Cryptosporidium* pozitifliği bulunmuştur. Enfeksiyon, çocukluk çağında (%10.2), 15 yaş ve üzeri yaş grubundan (%4.1) daha yüksek oranda görülmüştür. Çocuklarda

görülen bu yüksekliğin bu yaş döneminde immün sistemin yeterince gelişmemiş olması ve hijyen eksikliği ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Hastaların bağışıklık sisteminin durumunun *Cryptosporidium* spp.'nin görülmesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde, bağışıklık sistemi bir şekilde baskılanmış hastalarda enfeksiyonun daha fazla görüldüğü bildirilmektedir.^{15, 124, 125} Ayrıca immün yetmezliğin enfeksiyona karşı konak duyarlılığını değiştirdiği düşünülmektedir.¹²⁴ Antiretrovidal tedavi alan HIV pozitif hastalarda *Cryptosporidium* spp'nin görülme sıklığı anti retrovidal tedavi almayanlara göre azaldığı bildirilmiştir.^{15, 126}

HIV pozitif hastalarda yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* pozitiflik oranı %3 -%74.2 arasında bulunmuştur.^{59, 63, 127-129} Enfeksiyon oranlarının birbirinden oldukça farklı olmasının nedeninin ülkeler arasındaki HIV pozitiflik oranlarının farklılığına, su kaynaklarının kontaminasyon derecesine, sosyoekonomik farklılığa ve tanıda kullanılan yöntemlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bağışıklık sistemin baskılandığı malign hastalıklarla cryptosporidiosisin ilişkisinin araştırıldığı birçok araştırma bulunmaktadır. Çeşitli maligniteleri olan hastalarda *Cryptosporidium* spp.'nin görülme oranının %1.3 ile %17 arasında değiştiği bildirilmiştir.^{130, 131} Enfeksiyonun bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerin yanında bağışıklık sistemi normal kişilerde de görüldüğü bildirilmektedir.^{129, 132}

Batero ve ark.¹³³ akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, anti-HIV pozitif ve diğer immün yetmezliği olan 111 olguda en sık rastlanan parazitin *Cryptosporidium* olduğunu bildirmişlerdir. Jayalakshmi ve ark.¹³⁴ Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada, ishali olan 89 HIV'li hastanın dışkı örneklerini ELISA ve MAF boyama yöntemiyle araştırmışlar ve 11 (%12.4) pozitif sonuç elde etmişlerdir. Nwodo ve ark.¹³⁵ Güney Afrika'da ishali olan ve HIV pozitif 35 hastanın dışkı örnekleri

üzerinde yürüttükleri çalışmada sad-ELISA yöntemi ile 26 (%74.3) pozitiflik bulmuşlardır.

Ülçay ve ark.¹³⁶ 2008'de yaptıkları bir çalışmada ishalleri immünsüprese 36 olgunun 3'ünde (%8.6) *Cryptosporidium* saptamışlardır. Tanyüksel ve ark.⁴⁰ 116 farklı kanserli hastaların 18'inde (%17.0) Eren ve ark.²⁰ 2011'de 254 immün sistemi baskılanmış bireylerde, 55 immün sistemi normal kontrol grubunda; immünsüpresif bireylerin yer aldığı grupta 18 kişide (%7.08), 55 sağlıklı bireyin 2'sinde (%3.6) ELISA ile pozitiflik bulmuşlardır. Yine Sarı ve ark.¹³⁷ 2003'de hemodiyaliz tedavisi gören 47 kronik böbrek yetmezlikli ve 36 sağlıklı bireyin bulunduğu çalışmada *Cryptosporidium* spp'nin hasta grubunda %6.4, kontrol grubunda %2.1 oranında pozitiflik bildirmişlerdir.

Araştırmamızda *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların 5'inin (%6.3) immün sistemi baskılayan bir hastalığı ve buna yönelik ilaç tedavisi uygulaması olduğu saptanmıştır. Bu nedenle immün sistemi baskılanmış bireylerde ishal etkeni olarak *Cryptosporidium* spp.'nin atlanmaması gerektiği düşünülmüştür. Fakat çalışmaya alınan olguların immün sistemi baskılanmış olanlar ile immün sistemi sağlam olanlar arasında *Cryptosporidium* görülme arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Buna karşın çocuk yaş grubunda daha yüksek oranlarda görülmüştür.

Cryptosporidium'un su kaynaklarında tespit edilmesi halinde tür ayrımının yapılması önemlidir.¹³⁸ McLauchlin ve ark.¹³⁹ bildirdiğine göre İngiltere'deki su kaynaklı 8 cryptosporidiosis salgınından 5'inin *C.hominis* ile 3'ünün *C.parvum* ile olduğu bildirilmiştir. *C. parvum*'un bildirildiği üç salgında su kaynaklarının koyun dışkısı ile kontamine olduğu, salgınların ilkbahar aylarında görüldüğü ve zoonotik bulaş sonucu olduğu düşünülmüştür. Bu durumdan farklı olarak *C.hominis*'in saptandığı beş salgının, tüm yıl boyunca, kanalizasyon suları ile kontaminasyon sonucu ortaya çıktığı

anlaşılmıştır.¹³⁹ Araştırmamızda kırsal alanda yaşayanlarda, şehirde yaşayanlara göre anlamlı kabul edilecek düzeyde *Cryptosporidium* pozitifliği tespit edildi. Bu duruma, kırsal alanlarda yaşayan vakalarda yağışlar ve kar erimeleri nedeniyle hayvan veya insan dışkılarının içme ve kullanma sularına daha fazla karışması sonucu olduğu düşünülmektedir.

İçme suyu kaynağı ile enfeksiyon görülmesi arasındaki ilişki incelendiğinde, kaynatılmamış çeşme suyu kullanımı ile enfeksiyon arasında ilişki olduğunu ileri süren çalışmalar olduğu gibi¹⁴⁰ çeşme suyu kullanımının enfeksiyonun temel bulaş yolu olmadığını bildiren araştırmalara da rastlanmaktadır.^{15, 118, 141} Çalışmamızda *Cryptosporidium* saptanan vakalarda kuyu suyu kullananlarda, şebeke suyu veya hazır su kullananlara göre pozitiflik sonuçların değerlendirilmesinde kuyu suyu kullanımının *Cryptosporidium* pozitifliği açısından sınırda anlamlı düzeyde çıktığını söyleyebiliriz. Bu duruma yine köy, kasaba, ilçe gibi küçük yerleşim alanlarında içme suyu kaynaklarını insan ve hayvan kaynaklı fekal atıkların kirletimine daha açık olmasının yol açtığı düşünülmektedir.

Cryptosporidium açısından dışkı örneklerinin incelenmesinde mikroskopik değerlendirme en sık kullanılan yöntemdir.¹⁴² Mikroskopik incelemede en sık kullanılan modifiye Kinyoun asit fast boya yöntemi kolay uygulanması, preparatların değerlendirme öncesi bekletilebilmesi, maliyetinin az olması, ookistlerin içyapısını ayrıntılı olarak gösterebilmesi ve kalıcı olması gibi nedenlerle yararlı görülmüştür. Fakat bu boya yönteminin ekonomik bir yöntem olduğu bildirilmesine rağmen, mikroskopik değerlendirmenin zaman alıcı işlemler gerektirmesi, tecrübeli bir uzman tarafından değerlendirilmesine gereksinim duyulması gibi nedenlerle alternatif bir tanı yöntemin kullanımına gerek olduğu kanısındayız.

Epidemiyolojik ve prospektif araştırmalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun saptanması ve izlenmesi için ELISA kitlerinin kullanılması önerilmektedir.¹⁴³ Yine Cryptosporidiosis üzerine yapılan kapsamlı çalışmalarda basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren ELISA'nın rutin çalışmalarda kullanılmasının faydalı olacağı bildirilmiştir.¹³⁴ Özellikle incelenecek materyalin formalin ile tespit edildiğı veya stoklamanın uygunsuz yapıldığı koşullarda ELISA, IFAT gibi testler önemli bir teşhis alternatifi konumundadır.⁹³ Fakat genel anlamda antijen-antikor oluşumunu ortaya koyma prensibi ile çalışan testler, belli bir oranda diğerk mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon verme riski taşırlar.³⁷ IFAT'tan daha duyarlı olduğı bildirilen testin, etkinliğinin kitlelere göre değışebilmesi, güvenilirliği açısından incelenen materyalin her ml'sinde 10^3 - 10^4 'ten daha çok ookistin bulunması gerekmesi, ELISA yönteminin bir diğerk olumsuzluğudur.¹⁴⁴ Yine de ELISA yöntemi boyama yöntemlerine göre, oldukça duyarlı bir yöntem olup sensitivite ve spesifite %94'ün üzerindedir.^{8, 106}

IFAT testinin % 100'e yakın bir sensitivite ile çalıştığı 1 ml sıvıda bulunan 100 ookist bile tespit edebildiğı bildirilmiştir.² Fakat, testin ookist konsantrasyon tekniklerinden, dışkı içeriğinden etkilenebilme,¹⁴⁴ pahalı ve zahmetli olma, alg, mantar sporu gibi materyalde bulunabilecek yapılarla da çapraz etkileşim göstererek yanlış pozitifliklere neden olma gibi dezavantajları da bulunmaktadır.⁹⁸

Morfolojik özelliklerine göre mikroorganizmaların tanımlanması hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. Ancak son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemlerden mikroorganizmaların genomlarını esas alan nükleik asit analizleri sayesinde etkene hızlı ve güvenilir tanı konulması, uygun sınıflandırmanın yapılması ve etkili tedavi seçeneklerinin oluşturulması mümkün olacaktır.

PCR'ın ELISA ve IFAT yöntemlerine alternatif olarak dışkıda *Cryptosporidium*'un saptanmasında duyarlı ve seçici bir yöntem olduğu bildirilmektedir.^{37, 145} Bu yöntemin mikroskopik değerlendirme yönteminden daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. PCR yönteminin duyarlılığı, hedef gene bağlı olarak 1 ml dışkı örneğinde 20 ookist kadar olabilmektedir. Bu yöntem çok sayıda örneğin değerlendirilmesinde daha kolay uygulanabilen, maliyeti göreceli olarak daha ekonomik olan ve aynı zamanda ookistlerin genotiplendirmesinin yapılabilmesine imkan veren bir yöntemdir.¹⁴⁶ PCR aynı zamanda sekans analizi, RFLP gibi yöntemlerle birlikte tür tür ayrımı yapılmasına olanak vermektedir. Fakat; hızlı, güvenilir ve duyarlı bir yöntem olmasına karşın bazı kısıtlılıkları vardır. Canlı olmayan mikroorganizmaların saptanması ve laboratuvar kontaminasyonu gibi nedenlerle yalancı pozitif sonuçlar verebilmektedir.³⁷ Dışkı örneği içerisinde çok az sayıda ookist olması ve ookistlerin dışkının her yerine homojen şekilde dağılmamış olması nedeniyle PCR yönteminin mikroskopik değerlendirmeden daha az sayıda pozitif sonuca neden olabileceği bildirilmektedir.^{15, 147, 148} Dışkıda bulunan bilirubin, safra tuzları, polisakkarid kompleksleri gibi dışkıda bulunan bazı maddeler, çok küçük miktarlarda bulunmaları halinde bile PCR'i inhibe edebilmektedir.¹⁵ Yine DNA ekstraksiyonundan önce bazı ookistler hasar görmüş olabileceği için PCR sonucu ile mikroskopik değerlendirme arasında farklılıklar olabilmektedir.^{147, 148} Ookistler sıcaklık değişikliklerinden hasar görmektedir. Koruyucu olarak potasyum dikromat içerisinde saklanan ookistlerin + 4 °C'de hasar görmeden korunabildiği, bu şekilde 1 yıldan daha uzun süre saklanan dışkılarda yapılan moleküler çalışmaların olumlu sonuç verebildiği bildirilmektedir. Ancak dışkının uzun süreli saklanmasında kullanılan potasyum dikromat ve formaldehitin çok güçlü PCR inhibitörleri olduğu, DNA ekstraksiyonu öncesinde bu maddelerin uzaklaştırılması gerektiği bildirilmektedir.¹⁴⁹ PCR yönteminin rutin tanıda

kullanılması için bu sorunların ortadan kaldırılması ve yöntemin standardize edilmesi gerekir.^{15, 147}

Çalışmamızda MAF boya yöntemi ile 6, ELISA ile 10, DFA yöntemiyle 7 ookist saptanmışken PCR ile bunlardan 2'sinin genomik DNA'sı gösterilebilmiştir. *Cryptosporidium* saptanan olguların genelinde az miktarda ookist içerdiği görülmüştür. Dışkıda ookistlerin çok az sayıda bulunmasının ve literatürde belirtildiği gibi homojen dağılım göstermemesinin bu sonuca yol açtığı düşünülmüştür. PCR'da daha düşük pozitif sonuçlar elde etme nedenlerimizden biri olarak da DNA ekstraksiyonundan önce ookistlerin hasar görmüş olabilme durumunun olabileceğini de düşünmekteyiz.

Crptosporidium'un genotiplendirilmesinde genellikle COWP ve 18S rRNA genleri kullanılmaktadır.¹⁵⁰ Yu ve ark.¹¹¹ farklı primer çiftlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada 18S rRNA geni ile oldukça spesifik sonuçlar alındığı bildirilmektedir ve kullanılan primerler SSU rRNA genine yöneliktir, duyarlılığı ve seçiciliği oldukça yüksektir.

İngiltere'de McLauchlin ve ark.¹⁵⁰ yaptıkları çalışmada *Cryptosporidium* ookistleri saptanan dışkı örneklerinde PCR ve mikroskopi yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada mikroskopi ile %96.8'inde saptandığı bildirilmiştir. PCR yöntemi ile 18S rRNA, COWP ve TRAP-C1 genlerine yönelik primerlerin karşılaştırılması sonucu duyarlılıklar 18S rRNA için %97, COWP için %91, TRAP-C1 için %66 olarak belirlenmiştir. Her üç PCR prosedürünün duyarlılığının, mikroskobide gözlenen ookist sayısı artışı ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir. Bu PCR prosedürü ile negatif sonuç alınma nedeninin DNA'nın uygunsuz saklanma koşulları ve PCR inhibitörleri ile hasar görmesi, cryptosporidial DNA'nın olmaması ya da çok az miktarda olması, ookistlere benzer yapıdaki diğer organizmaların olması ve bunların monoklonal antikor olarak

reaksiyon göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Alternatif olarak yüksek kopya sayısı veya nested PCR prosedürü ile yöntemin duyarlılığının artırılabilceği bildirilmiştir.¹⁵
¹⁵⁰ Bizim çalışmamızda da hassasiyeti artırmak için nested PCR yapılmış fakat yukarıda bahsedilen nedenlerden bir veya birkaçından dolayı diğer yöntemlere göre daha düşük PCR pozitifliği bulduğumuzu düşünmekteyiz.

Sirrisena ve ark.¹⁵¹ 12 yaş altı 138 kişiyi kapsayan çalışmalarında MZN (Modifiye Ziehl Nielsen) boyama ile 8 pozitiflik bulmuşken bunlardan yalnız birini PCR ile doğrulayabilmişlerdir. Bizim yaptığımız 172 kişiyi kapsayan çalışmamızda da MAF boyama ile 6 kişi de pozitiflik sonuç bulmuşken bunların 2'sinde PCR ile pozitifliği gösterebildik 4 örnekte PCR negatif idi.

PCR yöntemi ile mikroskopi yöntemini karşılaştırdığımızda PCR'ın mikroskopik incelemeden daha fazla zamana gereksinim duyduğu ve başlangıçta daha fazla maliyete sahip olduğu görülmektedir. Az sayıda örneğin incelenmesinde oldukça pahalı bir yöntem olmasına karşın PCR'ın çok sayıdaki örneğe aynı anda uygulanabilir olmasıyla maliyeti düşürebilmektedir. Acit-fast boya yönteminin uygulanması PCR yöntemine göre daha kısa sürmektedir. Ancak preparatın değerlendirilmesi için deneyimli uzmana ihtiyaç varken, PCR'ın değerlendirilmesi spesifik bandın olup olmasına bakılarak kolayca karar verilebilmektedir. PCR'nin diğer bir avantajıda yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olması çok sayıda örneğe aynı anda uygulanabilmesi ve tür ayırımı yapılabilmesidir. Bu nedenlerle epidemiyolojik araştırmalarda özellikle salgının kaynağının araştırılmasında gelecek vadeden bir yöntem olma özelliğindedir.¹⁴²

Çalışmamızda DFA yöntemi altın standart kabul edildiğinde ELISA yönteminin duyarlılığı %100, seçiciliği %98.18, MAF boyama yönteminin duyarlılığı %85.71

seçiciliği %100.0 PCR yönteminin duyarlılığı %28.57 seçiciliği %100 olarak hesaplanmıştır.

Enfeksiyona neden olan *Cryptosporidium* türlerinin ülkelere göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Slovenya'da Soba ve ark.¹⁵² yaptıkları bir çalışmada ishalleri hastalarda, hayvanlarda görüldüğü bilinen *Cryptosporidium* türlerinin saptandığı bildirilmiştir (26 hastada *C.parvum*, iki hastada *C.hominis*, bir hastada *Cryptosporidium* cervine genotipi). Bu sebeple Slovenya'da enfeksiyonun temelde zoonotik orjinli olduğu düşünülmüştür. Fakat genellikle hayvanlarda görülen türlerin insanlarda görülmesinin nedeninin enfeksiyonun insana adapte olmuş *C. parvum* alt türleri ile olabileceği düşünülmüştür. Kenya'da Wagneci ve ark.¹¹⁷ yaptıkları bir çalışmada PCR yöntemi ile tür ayırımı sonucu olguların %87'sinin *C. hominis*, %9'unun *C. parvum* geri kalan %4'ünün de *C. felis*, *C. canis*, *C. muris* ve *C. meleagridis* türlerine ait olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Kenya'da bulaşın çoğunlukla antroponotik *Cryptosporidium* türleriyle olduğunu göstermiştir. Brezilya'da Araujo ve ark.¹⁵³ yaptıkları bir çalışmada hem HIV ile enfekte hemde immün sistemi sağlam çocukların dışkı örneklerine PCR-RFLP yöntemi uygulanmış olguların %34.8'inde *C. hominis*, %17,3 ünde *C. parvum*, %8.7'sinde *C. meleagridis* bulunmuştur. İsviçre'de Glaser ve ark.¹⁵⁴ yaptıkları başka bir çalışmada ishal yakınması olan immün sistemi sağlam çocuklarda %5.5 oranında *Cryptosporidium spp.* saptandığını bildirmişler ve olguların %81.8'inin *C. hominis* olması nedeniyle bu bölgedeki enfeksiyonun antroponotik bulaş gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Araştırmamızda PCR ile pozitif bulunan örneklerle RFLP yöntemi veya sekans analizi yapılmadığından etkenin hangi tür olduğu ortaya konamamış ve etkenin zoonotik mi yoksa antroponotik geçişten sorumlu türler mi olduğu konusunda yorum yapamamıştır.

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

İshalli dışkı örneklerinin Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda Börekçi ve ark.¹¹⁴ %3.1, Fındık ve ark.⁷⁰ %1.6, Özçelik ve ark.¹⁵⁵ %11.8, İnceboz ve ark.¹⁵⁶ %0.4, Çeliksöz ve ark.⁶⁸ %19.8, Atambay ve ark.¹⁵⁷ %1.6, Doğancı ve ark.¹⁵⁸ %4, oranında *Cryptosporidium* ookistleri saptandığını bildirmişlerdir. Elgün¹¹ 154 ishalleri dışkı örneğini ELISA ve MAF boyama ile inceleme yapmış ELISA ile (%24), MAF boyama ile (%5.2) oranında pozitiflik bulmuştur. Türkiye'de yapılmış bazı çalışma örnekleri tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Türkiye'de farklı yörelerden saptanan cryptosporidiosis prevalansı

Çalışma Grubu	%	Kullanılan Yöntem	Araştırmacılar	Şehir
İshalleri 92 kişi	5.93	ELISA ve EZN Boyama	Direkel ve ark. ¹⁵⁹	Mersin 2008
İshalleri 154 kişi	5.2	Modifiye asit-fast	Elgün ¹¹	Adana
	24.0	ELISA yöntemi		(2007)
İshalleri ve ishalsiz 250 kişi	4.0	Kinyoun asit-fast	Hazer ¹⁹¹	Afyon 2007)
İshalsiz 361 kişi	11.8	Kinyoun asit-fast	Börekçi ve ark. ¹¹⁴	Mersin 2005
İshalleri 106 kanserli olgu	16.9	Ziehl-Nielsen ve	Tanyüksel ve ark. ⁴⁰	Ankara 1995
İshalsiz 60 kanserli olgu		Giemsa		
İshalleri 31 kanserli olgu	35.5	Sıcak Modifiye	Ok ve ark. ³¹	İzmir 1995
İshalsiz 28 olgu	14.0	asit-fast boyama		
İshalleri 607 olgu (0-6) yaş	3.6	Modifiye asit-fast	Doğan ve ark. ⁵¹	Eskişehir 1998

ABD'de Kehl ve ark.¹⁰⁷ yaptıkları bir çalışmada, iki ELISA yöntemi, DFA, asit fast boyama yöntemlerini *Cryptosporidium* ookistlerini saptamak amacıyla

kullanmışlardır. 129 hasta örneğinden 55 örnekte pozitiflik bulunmuştur. Rosenblatt ve ark.¹⁶⁰ ABD'de mayo kliniğine başvuran hastaların 296 örneğin 100'ünde ELISA ve IFA ile pozitiflik bulmuşlardır. Yurt dışında *Cryptosporidium* prevalansı üzerine yapılmış çalışma örnekleri tablo 5.2 de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. Farklı ülkelerde cryptosporidiosis prevalansı ile ilgili yapılan bazı çalışmalar

Çalışma Grubu	%	Kullanılan Yöntem	Araştırmacılar	Ülke ve Yıl
İshalli çocuk	250 22,4	PCR	Fathy ve ark. ¹²⁰	Mısır 2014
İshalli HIV+ kişi	89 12.4	ELISA	Jayalakshmi ve ark. ¹³⁴	Hindistan 2008
İshalli 105 kişi	55.2	ELISA	Weitz ve ark. ¹⁶¹	ABD 1995
İshalsiz kişi	129 42.6	ELISA	Kehl ve ark. ¹⁰⁷	ABD 1995
İshalli çocuk	138 5.8 0.7	Modifiye asit-fast PCR	Sirisena ve ark. ¹⁵¹	Srilanka 2014

Cryptosporidiosisin görülme sıklığı mevsimlere ve coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Kuveyt'te yapılan bir çalışmada enfeksiyonun Ocak-Nisan aylarında, Guetemala'da yapılan bir çalışmada nemli ve yağmurlu mevsimlerde, Amerika'da Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezinin (CDC) 4 yıllık bir süreyi ve 47 eyaleti kapsayan bir çalışmasında, yaz mevsiminin son aylarında daha sık görüldüğü bildirilmiştir.^{20, 162, 163} Ülkemizde Doğan ve ark.¹⁴³ araştırmalarında, pozitif olguların mevsimsel dağılımı incelendiğinde Temmuz-Ekim aylarında belirgin bir artışın olduğu görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada ise örnek toplama zamanı Ocak-Temmuz dönemini içerisinde yapılmıştır. Örnek toplama işlemi yıl boyunca sürmediği için mevsimler arasında enfeksiyonunun görülme farklılığı hakkında yorum yapılamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızda ishalli bireylerde *Cryptosporidium* spp.'nin İmmünsupresif veya immünkompetan bireylerde görülme oranları farklı olsa da istatistiki olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmamıştır. Buna karşın çocuk yaş grubun da ve içme suyu olarak kuyu suyu kullananlarda dikkat çekici oranda pozitiflik yüksek bulundu. Yine kırsal alanlarda yaşayanlarda şehirde yaşayanlara göre yüksek orandaki cryptosporidium pozitifliği anlamlı kabul edilecek düzeyde idi.

Araştırmamız, bilhassa bağışıklığı baskılanmış bireylerde, çocukluk çağındaki bireylerde, içme suyu olarak kuyu suyu kullanan bireylerde ve kırsal alanda yaşayan bireylerde ishal etkeni olarak *Cryptosporidium* ookisterinin de araştırılmasının yararlı olacağını göstermiştir.

Cryptosporidium ookistlerini araştırmak için kullandığımız yöntemlerinin herbirinin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. ELISA yöntemi, yüksek duyarlılığa sahip olması, çok sayıda örneği bir arada çalışma imkanı sağlaması, hızlı bir şekilde sonuç alınması, çalışma kolaylığı gibi nedenlerle diğer yöntemlere tercih edilebilir.

Tez çalışmam sonunda hastanemiz parazitoloji laboratuvarında *Cryptosporidium* spp. immünokromotografik yöntemle çalışılmaya başlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Thompson RC, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 2005, 59: 77-158.
2. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clinical Microbiological Reviews*, 1999, 12: 554-563.
3. Griffiths JK. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Advances in Parasitology*, 1998, 40: 37-85.
4. Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O. Distribution of Cryptosporidium subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, 2006, 99: 287-292.
5. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in Cryptosporidium. *Experimental Parasitology*, 2010, 124: 90-97.
6. Ekinci Aİ. Kars Yöresinde Sığırlarda Cryptosporidium Türlerinin Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Kars: Kafkas Üniversitesi, 2012.
7. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiological Reviews*, 2004, 17: 72-97.
8. Kar S. Cryptosporidium parvum'un Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Üremenin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2007.
9. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 1991, 11: 873-897.

10. M.A. Ö, Özbel Y, Ak M. *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. Baskı. İzmir, Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22, 2007: 363-376.
11. Elgün G. İshalli Dışkı Örneklerinde *Cryptosporidium* Sp. Antijenin ELISA Yöntemi ile Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2009.
12. Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M. *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. Baskı. İstanbul, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 1995: 595-600.
13. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 2004, 126: 37-56.
14. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiological Reviews*, 1997, 10: 67-85.
15. Usluca S. İshalli Dışkılarda *Microsporidium* Spp. ve *Cryptosporidium* Spp.'nin Saptanması PCR Yöntemi ile Tür Tayininin Yapılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2009.
16. Galvan AL, Magnet A, Izquierdo F, Fernandez Vadillo C, Peralta RH, Angulo S, Fenoy S, del Aguila C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Science of the Total Environment*, 2014, 468-469: 368-375.
17. Döşkaya M, Dayangaç N, Kuman HA. *Cryptosporidium parvum*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003, 27: 64-70.
18. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. *Cryptosporidiosis*: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 2002, 4: 1059-1066.

19. Hazer Y. Afyonkarahisar Bölgesindeki Risk Gruplarında *Cryptosporidium parvum* Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2007.
20. Eren C. Farklı Gruplardaki İmmün-Süprese Bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve Modifiye Asit-Fast Boyama Yöntemi ile Araştırılması. Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 2011.
21. Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, Zhang X, Fayer R, Lal AA. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32: 1773-1785.
22. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 2002, 4: 1047-1058.
23. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 2004, 6: 773-785.
24. Leav BA, Mackay M, Ward HD. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, 36: 903-908.
25. Joachim A. Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 2004, 51: 251-259.
26. Saygı G. *Temel Tıbbi Parazitoloji*. Baskı. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Sivas, 1998: 94-96.

27. Sears CL, Kirckpatrick BD. *Cryptosporidiosis and Isosporidiosis. Principles and Practice of Clinical Parasitology*. Baskı. John Wiley & Sons Ltd. Pres., 2001: 139-164.
28. Fayer R, Speer A, Dubey JP. *The General Biology of Cryptosporidium in: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Baskı. Boca Raton, CRC Press, 1997: 1-41.
29. Harris JR, Petry F. *Cryptosporidium parvum: structural components of the oocyst wall. Journal of Parasitology*, 1999, 85: 839-849.
30. Altıntaş K. *Tıbbi Parazitoloji*. Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları, 2002: 170-172.
31. Ok ZÜ, Üner A, Korkmaz A. *Cryptosporidiosis. İmmün Yetmezliklerde Önemi Artan Hastalıklar, Özcel MA(ed) Yayın No:12*. Baskı. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği, 1995: 23-42.
32. Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium spp. and cryptosporidiosis. Microbiological Reviews*, 1986, 50: 458-483.
33. Çiçek M. 0-15 Yaş Grubu İshalli Çocuklarda *Cryptosporidium* sp. ve Diğer Bağırsak Parazitlerinin Görülme Sıklığı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabim Dalı. Yüksek Lisans, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2002.
34. Dubey JP SC, Fayer R. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Baskı. Portland, USA, CRC Pres, 1990: 1-199.
35. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2 Baskı. Nobel Tıp Kitapevi, 2002: 1919-1920.
36. Terzi G. Gıda kaynaklı protozon enfeksiyonlarının insan sağlığı açısından önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2005, 16: 47-55.

37. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30: 1305-1322.
38. Mandel GL, Bennett JE, Doli R. *Cryptosporidiosis In: Principles and Practise of Infectious Diseases*. Baskı. Philadelphia, Churchill Livingstone Inc., 2005: 3215-3228.
39. Chen XM, LaRusso NF. Human intestinal and biliary cryptosporidiosis. *World Journal of Gastroenterology*, 1999, 5: 424-429.
40. Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H. Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1995, 19: 56-63.
41. Casemore DP. ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 1991, 44: 445-451.
42. Inungu JN, Morse AA, Gordon C. Risk factors, seasonality, and trends of cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 62: 384-387.
43. Ceber K, Aslan G, Otag F, Delialioğlu N, Oztürk C, Babur C, Emekdas G. [Investigation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey.]. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2005, 29: 224-228.
44. Casemore DP, Wright SE, Copp RL. *Cryptosporidiosis Human and Animal Epidemiology. In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Baskı. USA, CRC Pres, 1997: 66-92.
45. Gilles H. *Cryptosporidiosis, In: Protozoal Diseases*. Baskı. New York, Oxford University Press, 1999: 592-606.

46. Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 1998, 84: 1165-1169.
47. Soave R, Weikel CS. *Cryptosporidium and Other Protozoa Including Isospora, Sarcocystis, Balantidium coli and Blastocystis. Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3 Baskı. New York, Churchill Livingstone Inc., 1990: 2122-2130.
48. Erickson MC, Ortega YR. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 2006, 69: 2786-2808.
49. Över U. İshalle Seyreden Hastalıklarda *Cryptosporidium*'un Rolü ve Sağlıklı Populasyonda Seroprevalansı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, 1996.
50. Fayer R. *General Biology, In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Baskı. Boca Raton, FL, CRC press, 2008: 1-43.
51. Doğan N. İshalli olgularda *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1998, 22: 243-246.
52. Harp JA, Goff JP. Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81: 289-294.
53. King BJ, Monis PT. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*, 2007, 134: 309-323.
54. Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerging Infectious Diseases journal*, 1997, 3: 51-57.
55. White AC. *Cryptosporidiosis In: Principles and Practice of Infectious Diseases*. Baskı. New York, Churchill Livingstone Inc., 2005: 3215-3228.

56. Liu H, Shen Y, Yin J, Yuan Z, Jiang Y, Xu Y, Pan W, Hu Y, Cao J. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14: 25.
57. Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2007, 26: 311-323.
58. Hawash Y, Dorgham L, Al-Hazmi AS, Al-Ghamdi MS. Prevalence of *Cryptosporidium*-associated diarrhea in a high altitude-community of Saudi Arabia detected by conventional and molecular methods. *Korean Journal of Parasitology*, 2014, 52: 479-485.
59. Samie A, Makuwa S, Mtshali S, Potgieter N, Thekiso O, Mbatia P, Bessong PO. Parasitic infection among HIV/AIDS patients at Bela-Bela clinic, Limpopo province, South Africa with special reference to *Cryptosporidium*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2014, 45: 783-795.
60. Wanyiri JW, Kanyo H, Maina S, Wang DE, Steen A, Ngugi P, Kamau T, Waithera T, O'Connor R, Gachuhi K, Wamae CN, Mwamburi M, Ward HD. *Cryptosporidiosis* in HIV/AIDS patients in Kenya: clinical features, epidemiology, molecular characterization and antibody responses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2014, 91: 319-328.
61. Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, Ye J, Feng Y, Xiao L. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes

- in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8: e2831.
62. Parghi E, Dash L, Shastri J. Evaluation of different modifications of acid-fast staining techniques and stool enzyme-linked immunosorbent assay in detecting fecal *Cryptosporidium* in diarrheic HIV seropositive and seronegative patients. *Tropical Parasitology*, 2014, 4: 99-104.
63. de Oliveira-Silva MB, de Oliveira LR, Resende JC, Peghini BC, Ramirez LE, Lages-Silva E, Correia D. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triangulo Mineiro region, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007, 40: 512-515.
64. Şimşir H. *Cryptosporidium parvum* Genotiplerinin İshalli Çocuklarda Çeşitli Yöntemlerle Tanımlanması. Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2006.
65. Özcan K, Köksal F, Aksaray N, Yiğit S. Çocuk ishallerinde *Cryptosporidium*'un rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 1987, 5: 329-332.
66. Mülazımoğlu L, Vahapoğlu H, Görgün Ö, Yıldırım İ, Semerci İ, Taşer B. Beş yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 1993, 23: 113-115.
67. Akyon Y, Erguven S, Arikan S, Yurdakok K, Gunalp A. *Cryptosporidium parvum* prevalence in a group of Turkish children. *The Turkish Journal of Pediatrics* , 1999, 41: 189-196.
68. Çeliksöz A, Çelik S. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesinde gastroenteritli ve malnütrasyonlu hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003, 27: 85-88.

69. Şener B, Ergüven S, Ercis S. 1980-1996 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi parazitoloji laboratuvarında dışkıının parazitolojik inceleme sonuçları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1998, 22: 37-40.
70. Fındık D, Karabayraktar A. Gaita örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1994, 18: 415-419.
71. Ok ÜZ, Korkmaz A, Ok GS, Özkan AT, Ünsal A, Özcel MA. Kronik böbrek yetmezliğinde *Cryptosporidiosis* ve *Blastocystosis*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1996, 20: 41-49.
72. Kandil HM, Berschneider HM, Argenzio RA. Tumour necrosis factor alpha changes porcine intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. *Gut*, 1994, 35: 934-40.
73. Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, Lewis DE, Shahab I, Janecki A, White AC, Jr. Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejunum of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infection and Immunity*, 2001, 69: 1172-1174.
74. Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, Weinstock JV, Lewis DE, Actor JK, White AC, Jr. Substance P expression correlates with severity of diarrhea in cryptosporidiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, 188: 290-296.
75. Ojcius DM, Perfettini JL, Bonnin A, Laurent F. Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes and Infection*, 1999, 1: 1163-1168.
76. Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection*, 1999, 1: 141-148.

77. McDonald V. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunology*, 2000, 22: 597-604.
78. Chai JY, Guk SM, Han HK, Yun CK. Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology*, 1999, 85: 234-239.
79. Sasahara T, Maruyama H, Aoki M, Kikuno R, Sekiguchi T, Takahashi A, Satoh Y, Kitasato H, Takayama Y, Inoue M. Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2003, 9: 278-281.
80. Laberge I, Griffiths MW, Griffiths MW. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 32: 1-26.
81. Markel EK, Voge M, John DT. *Medical Parasitology*. Bask1. Philedelphia, WB Saunders Company, 1992: 85-88.
82. Cox FE. History of human parasitology. *Clinical Microbiological Reviews*, 2002, 15: 595-612.
83. Ungar BLP. *Infectious Diseases and Their Etiologic Agents. In Principle and Practise of Infectious Diseases In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (eds)*. Bask1. New York, Churchill Livingstone, 1995: 2500-2510.
84. Garcia LA, Bruckner DA. *Diagnostic Medical Parasitology, Parasitic Infections in The Compromised Host*. Bask1. Washington DC, ASM press, 1997: 355-374.
85. Greenberg PD, Koch J, Cello JP. Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* in patients with severe diarrhea and AIDS. *Digestive Diseases and Sciences*, 1996, 41: 2286-2290.

86. Starling CR, Arrowood MJ. *Cryptosporidia*, In: *Parazitic Protozoa*. Baskı. Academic Press, 1993: 159-224.
87. Riggs MW. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection*, 2002, 4: 1067-1080.
88. Priest JW, Kwon JP, Moss DM, Roberts JM, Arrowood MJ, Dworkin MS, Juranek DD, Lammie PJ. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 1385-1392.
89. Akşehirli ŞG. Kayseri'de 0-5 Grubu İshalli Çocuklarda *Cryptosporidium*'un Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 1995.
90. MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31: 198-202.
91. Gilles H. *Cryptosporidiosis*, In: *Hart CA (eds).Protozoal Diseases*. Baskı. Newyork, Oxford University Press, 1999: 592-606.
92. Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30: 2869-2873.
93. Gasser RB, O'Donoghue P. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29: 1379-1413.
94. Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 5492-5498.

95. 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. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 43: 97-106.
96. Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva J, Jr. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34: 1769-1772.
97. Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40: 2335-2338.
98. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 2004, 38: 818-862.
99. Awad-El-Kariem FM, Robinson HA, Petry F, McDonald V, Evans D, Casemore D. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitology Research*, 1998, 84: 297-301.
100. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1578-1583.
101. Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, LeChevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and

- integrated cell culture-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 3427-3432.
- 102.** Widmer G, Orbach EA, Tzipori S. beta-tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1584-1588.
- 103.** Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct. *Tropical Medicine and International Health*, 2004, 32: 5-14.
- 104.** Pedraza-Diaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 2001, 7: 49-56.
- 105.** Fichtenbaum CJ, Ritchie DJ, Powderly WG. Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 16: 298-300.
- 106.** Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35: 1526-1529.
- 107.** Kehl KS, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33: 416-418.
- 108.** Boxell A, Hijjawi N, Monis P, Ryan U. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Experimental Parasitology*, 2008, 120: 67-72.

109. McDonald V, Stables R, Warhurst DC, Barer MR, Blewett DA, Chapman HD, Connolly GM, Chiodini PL, McAdam KP. In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, 34: 1498-1500.
110. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1983, 18: 185-190.
111. Yu JR, Lee SU, Park WY. Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. *Korean Journal of Parasitology*, 2009, 47: 293-297.
112. Ramratnam B, Flanigan TP. Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. *Postgraduate Medical Journal*, 1997, 73: 713-716.
113. Koturoglu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut ishallerde çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi*, 2004, 13: 1-19.
114. Börekçi G, Otag F, Emekdas G. Mersin'de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. *İnfeksiyon Dergisi*, 2005, 19: 39-46.
115. Alabdeen AZ. İshaller Hastalarda *Cryptosporidium* spp'nin Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi ve İmmüno-kromatografik Yöntem ile Araştırılması. Sağlık Bilimleri enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi, 2014.
116. Pereira MD, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SA, Garcia-Zapata MT. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Goias, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 66: 787-793.

117. Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwati SK, Revathi G, Hart CA. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 75: 78-82.
118. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183: 492-497.
119. Current WL, Bick PH. Immunobiology of *Cryptosporidium* spp. *Pathology Immunopathology Research*, 1989, 8: 141-160.
120. Fathy MM, Abdelrazek NM, Hassan FA, El-Badry AA. Molecular copro-prevalence of *Cryptosporidium* in Egyptian children and evaluation of three diagnostic methods. *Indian Pediatrics*, 2014, 51: 727-729.
121. Bera P, Das S, Saha R, Ramachandran VG, Shah D. *Cryptosporidium* in children with diarrhea: a hospital-based Study. *Indian Pediatrics*, 2014, 51: 906-908.
122. Saredi N, Bava J. Cryptosporidiosis in pediatric patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1998, 40: 197-200.
123. Yilmaz H, Tas-Cengiz Z, Cicek M. Investigation of cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Medical Journal*, 2008, 29: 526-529.
124. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiological Reviews*, 2002, 15: 145-154.
125. Wang KX, Li CP, Wang J, Pan BR. Epidemiological survey of cryptosporidiosis in Anhui Province China. *World Journal of Gastroenterology*, 2002, 8: 371-374.

126. Silva CV, Ferreira MS, Borges AS, Costa-Cruz JM. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. *Scand The Journal of Infectious Diseases*, 2005, 37: 211-215.
127. Lim YA, Rohela M, Sim BL, Jamaiah I, Nurbayah M. Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients in Kajang Hospital, Selangor. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2005, 36 Suppl 4: 30-33.
128. Samie A, Bessong PO, Obi CL, Sevilleja JE, Stroup S, Houpt E, Guerrant RL. *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. *Experimental Parasitology*, 2006, 114: 314-322.
129. Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 1017-1023.
130. Sreedharan A, Jayshree RS, Sridhar H. Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 1996, 14: 211-213.
131. Tanyuksel M, Gun H, Doganci L. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scand The Journal of Infectious Diseases*, 1995, 27: 69-70.
132. Bajer A, Bednarska M, Caccio SM, Wolska-Kusnierz B, Heropolitanska-Pliszka E, Bernatowska E, Wielopolska M, Paziewska A, Welc-faleciak R, Sinski E. Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland. *Parasitology Research*, 2008, 103: 37-42.
133. Botero JH, Castano A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised

- patients with and without gastrointestinal manifestations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2003, 45: 197-200.
- 134.** Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 2008, 51: 137-138.
- 135.** Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO. Comparative diagnostic techniques for cryptosporidium infection. *Molecules*, 2014, 19: 2674-2683.
- 136.** Ulcay A, Gorennek L, Coskun O, Araz E, Acar A, Eyigun CP. [Diagnosis of intestinal protozoa in patients with immune deficiency]. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2008, 32: 328-333.
- 137.** Sarı C, Sarı K, Ertuğ S. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* spp. ve *Blastocystis hominis* sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003, 27: 187-190.
- 138.** Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of cryptosporidium genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 4446-4454.
- 139.** McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38: 3984-3990.
- 140.** Baumgartner A, Marder HP, Munzinger J, Siegrist HH. Frequency of *Cryptosporidium* spp. as cause of human gastrointestinal disease in Switzerland and possible sources of infection. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 2000, 130: 1252-1258.

- 141.** Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander NQ, Chalmers RM, Morgan K, Nichols G, Beeching N, Osborn K. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging Infectious Diseases journal*, 2004, 10: 1241-1249.
- 142.** Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36: 995-998.
- 143.** Moss DM, Bennett SN, Arrowood MJ, Wahlquist SP, Lammie PJ. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of a cryptosporidiosis outbreak on a United States Coast Guard cutter. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 58: 110-118.
- 144.** Leng X, Mosier DA, Oberst RD. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 643-647.
- 145.** Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brien EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 1220-1223.
- 146.** Lindergard G, Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO. A novel multiplex polymerase chain reaction approach for detection of four human infective *Cryptosporidium* isolates: *Cryptosporidium parvum*, types H and C, *Cryptosporidium canis*, and *Cryptosporidium felis* in fecal and soil samples. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15: 262-267.

147. Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A. Cryptosporidium infection: diagnostic techniques. *Parasitology Research*, 2006, 98: 150-152.
148. Amar CF, Dear PH, McLauchlin J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of Cryptosporidium species from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 38: 217-222.
149. Jongwutiwes S, Tiangtip R, Yentakarm S, Chantachum N. Simple method for long-term copro-preservation of Cryptosporidium oocysts for morphometric and molecular analysis. *Tropical Medicine and International Health*, 2002, 7: 257-264.
150. McLauchlin J, Pedraza-Diaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL. Genetic characterization of Cryptosporidium strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 3153-3158.
151. Sirisena UM, Iddawela WM, Noordeen F, Wickramasinghe S. Prevalence and identification of Cryptosporidium species in paediatric patients with diarrhoea. *Ceylon Medical Journal*, 2014, 59: 75-78.
152. Soba B, Petrovec M, Mioc V, Logar J. Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from humans in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12: 918-921.
153. Araujo AJ, Kanamura HY, Almeida ME, Gomes AH, Pinto TH, Da Silva AJ. Genotypic identification of Cryptosporidium spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of Sao Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2008, 50: 139-143.
154. Glaeser C, Grimm F, Mathis A, Weber R, Nadal D, Deplazes P. Detection and molecular characterization of Cryptosporidium spp. isolated from diarrheic children in Switzerland. *Pediatric Infectious Diseases Journal*, 2004, 23: 359-361.

155. Özçelik S, Dökmetaş S, Sümer Z, İçağasioğlu D, Dökmetaş İ. Gastroenteritlerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1996, 20: 333-337.
156. İnceboz T, Sarı B, Orhan V. Gastrointestinal şikayetleri olan olgularda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2002, 26.
157. Atambay M, Daldal N, Çelik T. Malatya'da ishallerde *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003, 27: 12-14.
158. Doganci T, Araz E, Ensari A, Tanyuksel M, Doganci L. Detection of *Cryptosporidium parvum* infection in childhood using various techniques. *Medical Science Monitor*, 2002, 8: MT223-226.
159. Direkel Ş, Özerol İH, Durmaz R. İshallerde *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve modifiye Ehrlich- Ziehl- Neelsen boyama yöntemleriyle araştırılması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008, 1: 20-25.
160. Rosenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31: 1468-1471.
161. Weitz JC. [Detection of fecal *Cryptosporidium parvum* antigens using an ELISA technique]. *Revista medica de Chile*, 1995, 123: 330-333.
162. Bern C, Hernandez B, Lopez MB, Arrowood MJ, De Merida AM, Klein RE. The contrasting epidemiology of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 63: 231-235.
163. Dietz VJ, Roberts JM. National surveillance for infection with *Cryptosporidium parvum*, 1995-1998: what have we learned? *Public Health Reports*, 2000, 115: 358-363.

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Ahmet YILMAZ Doğum tarihi: 31.10.1976 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Evli, 2 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kan transfüzyon Merkezi Tel: 0442 232 51 41 Faks: 0449 236 00 00 E-mail: aymet25@hotmail.com
Eğitim
Lise: Kütahya Sağlık Meslek Lisesi (1994) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (1996-2001) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (2004-2009) Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji. Anabilim Dalı (2011-2015)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (KPDS 68.00, Kasım 2006)
Almanca:
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
.....
.....
İlgi Alanları ve Hobiler
.....
.....

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İmmünstüpre ve normal hasta bireylerde ishal etkeni olarak Cryptosporidium spp.'nin prevalansının mikroskopik ve serolojik yöntemler ile araştırılması pozitif sonuçların moleküler yöntemlerle tür tayininin yapılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Ahmet YILMAZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	BAP Projesi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Atatürk Üniversitesi			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel çalışması	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz Girişimsel olmayan Çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐