



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

VPR-YL-2014-0001

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ'NE GELEN HASTALARDAN
ALINAN DİŞKİ ÖRNEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
VARLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI VE ELISA İLE
ARAŞTIRILMASI**

Ceren DEVECİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran AYSUL

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
VPR-YL-2014-0001

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ'NE GELEN HASTALARDAN
ALINAN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
VARLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI VE ELISA İLE
ARAŞTIRILMASI

Ceren DEVECİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuran AYSUL

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ceren DEVECİ tarafından hazırlanan “ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ'NE GELEN HASTALARDAN ALINAN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. VARLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI VE ELISA İLE ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, 21/11/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

1-Prof. Dr. Hasan EREN

2- Doç. Dr. Nuran AYSUL

3- Doç. Dr. Esin GÜVEN

Üniversitesi :

Adnan Menderes Üniversitesi

Adnan Menderes Üniversitesi

Atatürk Üniversitesi

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* soyuna bağlı protozoonlarca oluşturulan, tüm dünyada ve Türkiye’de yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır. Genel olarak immün sistemi normal yetişkinlerde belli bir önem taşımaz. Ancak, immunsupresif (immün sistemi baskılanmış) erişkinlerde, çocuklarda, bazı hayvan yavrularında sulu sarı ishal ile birlikte şiddetli hastalık tablosu oluşturarak ölüm ile sonlanan klinik tablolar oluşturur.

Zoonoz bir hastalık olması ile birlikte cryptosporidiosisin tedavisinin güç olması bu hastalığın önemini artırır. Monoksen bir biyolojiye sahip olan *Cryptosporidium* türleri, genellikle sindirim sistemine yerleşmekte (bazı durumlar dışında) ve dış ortama dışkı ile birlikte 4-6 µm çaplı ookist formuyla atılmaktadır.

Bulaşma ise temel olarak, bu ookistlerin su başta olmak üzere ookistle bulaşık gıdaların alınmasıyla gerçekleşmektedir. Parazit küçük olduğu için çoğu filtreden kolaylıkla geçebilir. Ayrıca arıtmada kullanılan çoğu kimyasala dirençli olmasıyla birlikte dış ortama atılan ookist formunun enfektif olmasından dolayı hastalık özel bir konuma gelmiştir.

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gelen farklı yaş grubundaki hastaların dışkı örneklerinde *Cryptosporidium parvum*’un Kinyonun asit-fast ile boyanmış preparatların mikroskopik bakışı ve *Cryptosporidium parvum* antijenlerinin ELISA yöntemiyle araştırılması iki yöntemin sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	3
1.2. Taksonomi	4
1.3. Morfoloji	9
1.4. Yaşam Döngüsü	11
1.4.1. Ekskistasyon (Kist Formunun Kaybolması) Dönemi	11
1.4.2. Merogoni Dönemi	12
1.4.3. Gametogoni Dönemi	12
1.4.4. Döllenme Dönemi	13
1.4.5. Ookist Dönemi	13
1.4.6. Sporogoni Dönemi	13
1.5. Bulaş ve Epidemiyolojisi	15
1.6. Cryptosporidiosis	17
1.7. Patojenite	17
1.8. Klinik Tablo	18
1.8.1. İntestinal Cryptosporidiosis	18
1.8.1.1. Asemptomatik Taşıyıcılar	18
1.8.1.2. Akut Sınırlı Enfeksiyon	18
1.8.1.3. Kronik Enfeksiyon	19
1.8.1.4. Fulminant Enfeksiyon	19
1.8.2. Respiratuar Cryptosporidiosis	19
1.8.3. Hepatobiliyer Cryptosporidiosis	19
1.8.4. Pankreatik Cryptosporidiosis	19

1.9. Tanı	20
1.9.1. Direkt Mikroskopi Yöntemi	21
1.9.1.1. Boyasız Direkt Mikroskopi Yöntemi	21
1.9.1.2. Boyalı Direkt Mikroskopi Yöntemi	21
1.9.2. Serolojik Yöntemler	22
1.9.2.1. DFA (Direkt Immunfloresans Tekniği)	22
1.9.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	22
1.9.2.3. IFA (İndirekt Floresan Antikor Testi)	23
1.9.2.4. Hızlı Immunokromatografik Yöntemler	24
1.9.3. Moleküler Yöntemler	25
1.9.4. Histopatolojik İnceleme	27
1.9.5. Kültür Yöntemleri	28
1.10. Tedavi	29
1.11. Korunma	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Gereç	36
2.1.1. İnsan dışkısı	36
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	36
2.1.3. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri	36
2.1.4. Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar	37
2.2. Yöntem	37
2.2.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması	37
2.2.2. Kinyonun Asit-Fast Boyama Yöntemi	37
2.2.2.1. Kinyonun Carbol-Fuchsine Hazırlanması	38
2.2.2.2. Loefflerin Metilen Mavisi Hazırlanması	38
2.2.3. ELISA Yöntemi	39
2.2.3.1. Örneğin Hazırlanması	39
2.2.3.2. Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması	39
2.2.3.3. Konjugat Solüsyonunun Hazırlanması	40
3. BULGULAR	42
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ	50
ÖZET	51

SUMMARY	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	64
TEŞEKKÜR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
µl	Mikrometre
UV	Ultra viyole
PH	Hidrojenin Gücü (Power of Hidrojen)
AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (Acquired Immun Deficiency Syndrome)
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
COWP	<i>Cryptosporidium</i> oocisti duvar proteini(<i>Cryptosporidium</i> Oocyst Wall Protein)
dH₂O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
EIA	Enzyme Immun Assay
ELISA	Enzime-Bağlı-İmmün Analiz (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
GP60	60 kDa glikoprotein
HACCP	Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi (Hazard Analysis and Critical Control Point)
HIV	AIDS'e neden olan virus (Human Immunodeficiency Virus)
HFL	Human Fetal Lung
HSP70	(70 kDa Heat Shock Protein)
Ig G	Vücutta üretilen antikorlar (immünglobin G)
Ig M	Vücutta üretilen antikorlar (immünglobin M)
IFA	İmmüno Floresan Antikor Yöntemi (Immunofluorescence Assay)
ITS	Internal Transcribed Spacer
KCr₂O₇	Potasyum Dikromat
KOH	Potasyum Hidroksit
mRNA	mesajcı RNA
PBS	Tampon çözelti (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Darbeli alan jel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

RADP	Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	Ribosomal DNA
RFLP	Rekstriksiyon Para Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
SSCP	Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism)
ssurRNA	Küçük Ribizomal RNA alt ünitesini kodlayan bölge (Small Subunit Ribosomal RNA)
18S rRNA	18 S ribozomal RNA

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 1.1. Türkiye’de <i>Cryptosporidium</i> ’un insanlardaki prevalansı	3
Çizelge 1.2. <i>Cryptosporidium</i> ’un sınıflandırılması	5
Çizelge 1.3. Türler ve yerleştiği konaklar	6
Çizelge 1.4. <i>Cryptosporidium</i> cinsinin sınıflandırmadaki yeri	8
Çizelge 1.5. Ülkemizde ve bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda <i>Cryptosporidium</i> spp. görülme sıklığı	16
Çizelge 3.1. Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> spp.	42
Çizelge 3.2. ELISA Yöntemi ile tespit edilen <i>Cryptosporidium parvum</i> ’lu hastaların yaşlara göre dağılımı	44
Çizelge 3.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> ’ lu şüpheli hastalara ait bilgiler ve mikroskopi-ELISA sonuçları	46

RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
Resim 2.1. Kinyonun asit-fast boyası ile <i>Cryptosporidium</i> ookistlerin x100 mikroskop görüntüsü	38
Resim 2.2. IDEXX <i>Cryptosporidium parvum</i> ELISA kiti	39
Resim 2.3. ELISA yönteminin yapılış aşaması	41
Resim 2.4. ELISA reader ile optik dansite 450 nm’de ELISA okuyucusunda okutulması	41
Resim 3.1. Kinyonun asit-fast boyaması ile <i>Cryptosporidium</i> ookistleri	43
Resim 3.2. ELISA plağında pozitif ve negatif kuyuların görünümü (ilk 92 hasta)	44
Resim 3.3. ELISA plağında pozitif ve negatif kuyuların çıplak gözle görünümü	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 1.1. <i>Cryptosporidium</i> spp'e ait yaşam döngüsünde ookist gelişim evreleri	14

1.GİRİŞ

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* cinsine bağlı, protozoonların neden olduğu, tüm dünyada oldukça yaygın olarak bulunan ve 100'den fazla canlı türünde görülen zoonoz bir hastalıktır (Miller ve ark 2003a).

Cryptosporidium cinsi organizmalar; memeli, sürüngen, kuş ve balıklar gibi birçok konakta hastalığa neden olan coccidian protozoonlardır (Current ve Bick 1989). Bu parazitin 100'ün üzerinde farklı türü rapor edilmiş olup dünyada yaygın olan patojen protozoondur (Spano ve Crisanti 2000). *Cryptosporidium* türleri insanlarda ve hayvanlarda ishal ve gastroenteritin önemli bir sebebi olarak bilinmektedir. Yedi *Cryptosporidium* türünün (*C.parvum*, *C.hominis*, *C.meleagridis*, *C.felis*, *C.canis*, *C.suis* ve *C.muris*) insanlarda hastalığa sebep olduğu, fakat salgınların ve vakaların çoğunda *C.parvum* ve *C.hominis* saptandığı bildirilmiştir(Cacciò ve ark 2005). Son yıllarda bu parazitin suyla geçerek salgınlar yapması ve özellikle immun yetmezliği olan şahıslarda inatçı ishallere neden olmasından dolayı dikkatleri üzerine çekmiştir. Günümüzde ise bu protozoon ile ilgili birçok çalışmalar yapılmıştır (Current ve Bick 1989, Spano ve Crisanti 2000).

Hastalığa neden olan *Cryptosporidium* türleri, insan dahil pek çok konağın sindirim ve solunum sistemi epitellerindeki mikrovilluslarda intraselüler, ekstrasitoplazmik olarak yerleşmektedir (Xiao ve ark 2000, Riggs 2002). Bu yerleşim nedeniyle diğer hücre içi parazitlerinden ayrılırlar. Çünkü diğer hücre içi yerleşim gösteren parazit türleri hücrenin sitoplazmasına yerleşirken, *Cryptosporidium* türleri hücrenin ekstrasitoplazmik alanında yerleşirler. *Cryptosporidium* türlerinin olgun ookistleri 4-5 µm çapında, yuvarlak olup içlerinde çıplak halde dört sporozoit bulundurmaktadır (Unat ve ark 1995).

Cryptosporidium cinsi parazitler, hem bağışıklığı sağlam kişilerde hem de immun yetmezliği olan kişilerde enfeksiyon oluşturmaktadırlar. Sağlıklı kişilerde asemptomatik enfeksiyon veya kendiliğinden geçen ishallere neden olurken, immun yetmezliği olan kişilerde ağır seyirli ve kronik ishallere, pankreas, safra ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilmekte ve hastalık ölümlere sonlanabilmektedir (Gün 1996, Döşkaya ve ark 2003). Çocuklarda cryptosporidiosis prevalansının yetişkinlere göre daha yüksek olduğu ve semptomların çok daha şiddetli seyrettiği belirtilmektedir (Fayer ve Urgan 1986, Ungar 1995). Çocukluk çağında prevalansın yüksek çıkmasının en önemli nedenleri, bu yaş grubunda fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması, temizlik kurallarına yeterli özenin

gösterilmemesi ve immun sistemlerinin tam gelişmemiş olmasıdır (Current ve Bick 1989). İngiltere'de incelenen semptomatik 867 hastada %5 oranında, beş yaşın altındaki çocuklarda ise %7 oranında cryptosporidiosis tanısı konduğu bildirilmiştir (Al-Braiken ve ark 2003). Yapılan bir çalışmada okul öncesi kreşlerdeki beş yaş altı semptomatik ve asemptomatik çocuklarda cryptosporidiosis prevalansı sırasıyla % 3.2 ve % 4.7 olarak belirtilirken (Miller ve ark. 2003b), gündüz bakım merkezlerindeki çocuklarda cryptosporidiosis prevalansını %8.9 olarak bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, cryptosporidiosis oranı 0-3 yaş grubundaki çocuklarda %2.97, 4-10 yaş grubundaki çocuklarda %1.17 ve 11-15 yaş grubundaki çocuklarda %2.6 olarak bulunmuştur.

Dünya genelinde endemik ve epidemik ishal olgularından sorumlu olan cryptosporidiosis, AIDS'li hastalarda ishale neden olmaktadır (Fahey 2003). 1993'te Amerika Birleşik Devletleri'nin Güney Milwaukee bölgesinde içme suyu kaynaklı olarak ortaya çıkan ve 400.000'den fazla kişiyi etkileyen salgınla birlikte olgu epidemik karakter taşıyan önemli hastalıklar grubuna dahil edilmiştir (Sears ve Kirkpatrick 2001, Dillingham ve ark 2002, Fahey 2003).

1982 yılına kadar daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerin enfeksiyonu olarak bilinen cryptosporidiosis' in özellikle laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle, bağışıklık sistemi sağlam kişilerde de hastalığa yol açtığı saptanmıştır (Mackenzie ve ark 1994).

Türkiye'de cryptosporidiosis ile ilgili yapılan çalışmalarda, insanlarda hastalığın prevalansının % 0-35,5 olduğu bildirilmiştir (Al-Qubaji 2005, Tanyüksel ve ark. 1995). Türkiye'de insanlardaki cryptosporidiosis prevalansı Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir. Hayvanlar ve gıdalar üzerine yapılan araştırmalar çoğunlukla insan ağırlıklıdır. Bu çalışmaların çoğu tanı temellidir. 1980–1996 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında yapılan bir çalışmada toplam 122400 dışkı örneğinde, incelenen dışkıların 45'inde (% 0,04) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (Şener ve ark. 1997). Ocak 1995–Mayıs 1997 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi pediatri polikliniğinden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ishalleri 540 çocuğa ait dışkı örneği ile 0–6 yaş grubu yetiştirme yurdunda yaşayan ishalleri 67 çocuktan alınan dışkı örnekleri incelenmiş olup, 607 örneğin 22'sinde (%3,6) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır. Yine Ankara Onkoloji Hastanesinin değişik kliniklerinde yatan 106 gastroenteritli kanser hastası Mart–Temmuz 1992 tarihleri arasında çalışma grubu olarak incelenmiş, hastaların 18'inde (%16,9) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır (Gün ve ark. 1994).

Çizelge 1.1. Türkiye’de *Cryptosporidium*’un insanlardaki prevalansı (Kar 2007).

Şehir	Çalışma grubu	(%)	Araştırmacılar
Ankara	İshalli 106 kanserli olgu	16,9	Tanyüksel ve ark. 1995
	İshalli olmayan 60 kanserli olgu	0	
İzmir	İshalli 31 kanserli olgu (1-18yas)	35.5	Ok ve ark. 1995
	İshalli olmayan 28 olgu	14.0	
İzmir	Hemodiyalizli 46 olgu (16-69 yas)	30.4	Ok ve ark. 1996
Elazığ	Hemodiyalizli 41 olgu (14-67 yas)	7.1	Yücel ve ark. 2000
	İshalli 194 olgu (0-60 yaş)	1.54	
Eskisehir	İshalli 607 olgu (0-6yaş)	3.6	Dogan ve Akgün, 1998
Bursa	İshalli 173 çocuk	2.9	Mıstık ve ark. 1992
İstanbul	İshalli 73 çocuk (0-5 yaş)	1.36	Mülazımoğlu ve ark. 1993
Adana	İshalli 110 olgu (4-6 yaş)	11.8	Özcan ve ark. 1987
	İshalsiz 58 olgu (4-6 yaş)	4.1	
Sivas	İshalli 110 olgu (0-80 yaş)	11.8	Özçelik ve ark. 1996

Her geçen yıl, gerek bağışıklık sistemi baskılanmış olguların sayısındaki artış, gerekse bağışıklık sistemi sağlam kişilerde salgınlara neden olması cryptosporidiosisin önemini arttırmıştır (Ülgen ve Balcıoğlu 2007).

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gelen farklı yaş grubundaki hastaların dışkı örneklerinde *Cryptosporidium parvum* antijenlerinin ELISA yöntemiyle araştırılması ve modifiye asit-fast ile boyanmış preparatların mikroskobi sonuçlarının ELISA sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Günümüz koşullarında tek başına mikroskobik bakı tanı için yetersiz kalmakta, ikinci bir doğrulama testi olarak ELISA yönteminin rutinde kullanılmasının daha uygun olacağı kanısına varılmıştır ve bölgemizde fazla örnek sayısı ile daha kapsamlı çalışma yapılması gerektiği önerilmektedir.

1.1. Tarihçe

Cryptosporidium cinsi ilk kez 1895’de Clarke tarafından fark edilmiş olup ‘fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri’ şeklinde tarif edilmiştir. Tyzzer tarafından 1907’de tanımlanmıştır (Current ve Garcia 1991). Önceden bilinen coccidian parazitlerin aksine ookistlerinin içindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistlerinin olmaması nedeniyle

Cryptosporidium (=gizli sporokistler) olarak isimlendirilmiştir. Tyzzer farenin mide bez epitelinde yerleşen etkeni *Cryptosporidium muris*, sadece ince bağırsağında gelişen ve *Cryptosporidium muris*'den daha küçük ookistlere sahip olan türü ise *Cryptosporidium parvum* olarak tanımlamıştır (Tyzzer 1912). Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda memeli, kanatlı ve reptillerde bulunan diğer türler saptanmıştır (Starling ve Arrowood 1993, Sears ve Kirkpatrick 2001).

Önceleri hastalığın önemi çok iyi anlaşılamamış olsa da 1970'lerde buzağı ve insanlarda cryptosporidiosis'in ortaya konulması ile birlikte etkene olan ilgi de artmıştır (Tzipori ve Ward 2002).

İlk insan olguları 1976 yılında, 3 yaşındaki gastroenteritli bir kızda ve daha sonra da immun sistemi baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide görülmüş olup, bu olgu bir çiftlikte yaşayan hayvanlarda saptanan enfeksiyonla aynı zamanda ortaya çıkmıştır. Bu nedenle cryptosporidiosis'in zoonoz bir hastalık olabileceği düşünülmüştür. 1981-1982 yıllarında ise AIDS'li hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları saptanmış ve şiddetli ishale neden olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerde görülen uzun süreli, sıklıkla bol sulu dışkı ve zayıflama gibi belirtiler enfeksiyonun fırsatçı patojen olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki yıllarda yayımlanan araştırmalarda hayvan bakıcılarında, turistlerde ve bağışıklığı sağlam kişilerde de salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (Döşkaya ve ark 2003, Çetinkaya 2004, Berger 2006, Özcel ve ark. 2007).

Yoğunlaşan çalışmalar, etkenin immün sistemi normal hayvan ve insanlarda da hastalık yapabildiğini göstermiştir. Hayvan bakıcılarında (Current 1983), veteriner hekimlerde, turistlerde (Jokipii ve ark 1985) ve bağışıklığı sağlam kişilerde de (Wolfson ve ark 1985) bu enfeksiyona rastlandığı bildirilmiştir. Enfeksiyonun klinik ve epidemiyolojisine ilişkin bilgilerin çoğu 1985-1995 yılları arasında elde edilmiştir (Fayer ve Ungar 1986, Soave ve Weikel 1990, Current ve Garcia 1991). Günümüzde cryptosporidiosis enfeksiyonu tüm dünyada görülmekte olup bağışıklık sistemi sağlam bireylerde de salgınlara yol açmaktadır (Smith ve ark 2006).

1.2.Taksonomi

Dünya Sağlık Örgütüncü *Cryptosporidium*'un sınıflandırılması şöyledir (Mehlhorn ve Piekarski 2002).

Çizelge 1.2. *Cryptosporidium*'un sınıflandırılması (Mehlhorn ve Piekarski 2002)

Alem	Protista
Altalem	Protozoa
Şube	Apicomplexa
Sınıf	Sporozoa
Altsınıf	Coccidia
Takım	Eucoccidia
Alttakım	Eimeriorina
Aile	Cryptosporidiidae
Cins	Cryptosporidium

Mevcut bilgiler ışığında saptanan türler ve yerleştiği konaklar şu şekildedir (Fayer ve Ungar 1986).

Çizelge 1.3. Türler ve yerleştiği konaklar (Fayer ve Ungar 1986).

Tür	Konak
<i>C. muris</i>	Fare, insan
<i>C. parvum</i>	Memeli
<i>C. meleagridis</i>	Kuşlarda, insan
<i>C. wrairi</i>	Domuz
<i>C. tyzzeri</i>	Tavuk
<i>C. agni</i>	Koyun
<i>C. bovis</i>	Sığır
<i>C. cuniculus</i>	Tavsan
<i>C. felis</i>	Evcil kedi, insan
<i>C. nasorum</i>	Balık
<i>C. hesi</i>	Maymun
<i>C. serpentis</i>	Yılan
<i>C. baileyi</i>	Tavuk
<i>C. hominis</i>	İnsan
<i>C. canis</i>	Köpek, insan

Cryptosporidium cinsi protozoonlar omurgalıların sindirim ve solunum yollarını kaplayan epitel hücrelerinin mikrovillus bölgesinde yerleşen parazitler olarak bilinmektedir (Fayer ve Ungar 1986, Current ve Garcia 1991).

Cryptosporidium türlerinin sınıflandırmadaki yeri ilk olarak 1911’de Leger tarafından belirlenmiştir (Dubey ve ark 1990). *Cryptosporidium* türleri, Apicomplexa şubesinde, Coccidia alt sınıfında, Eucoccidia takımı ve Eimeriina alt takımında, Cryptosporidiidae ailesinde yer almaktadır. (O’Donoghue 1995).

Bulaşma yollarının anlaşılmasında en önemli sorun *Cryptosporidium* türlerini birbirinden ayırt etmeyi sağlayacak morfolojik özelliklerin bulunmayışıdır. Başka bir problem de taksonomideki belirsizliklerdir. Bu durum, insanlarda hastalık yapan türlerin sayısının tam olarak saptanamamasına neden olmakta ve salgın veya sporodik bir olgudan sorumlu türü ayırt edebilecek ve tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (Morgan-Ryan ve ark 2002).

Çizelge 1.4. *Cryptosporidium* cinsinin sınıflandırmadaki yeri(Levine 1985, Mehlhorn ve Piekarski 2002)

Sınıflandırma	isim	Biyolojik Özellikleri
Alem	Animalia	Ökaryotik, tek hücreli canlı Polar halka, rhoptriler, mikronemler, conoid ve subpellicula rmikrotubullerden oluşmuş apikal kompleks yapıları vardır. Veziküler bir çekirdeğe sahiptirler.
Alem Altı	Protista	
Kök	Apicomplexa	
Sınıf	Sporozoa	Eşeyli ve eşeysiz üreme, ookist teşkili, trofozoitlerde kayma kontraksiyon ile hareket özellikleri vardır.
Sınıf Altı	Coccidia	Biyolojilerinde merogoni, gametogoni ve sporogoni aşamaları görülür. Eşeyli faz hücre içinde gerçekleşir. Ergin gamontlar küçük olup yine hücre içidir. Çoğu omurgalılarda parazitlenir.
Takım	Eucoccidia	Merogoni omurgalı konakta geçer.
Takım altı	Eimeriina	Makro ve mikrogamet oluşumu ayrı izler, Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet gelişir. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet gelişir. Zigot hareketsizdir, ön kısımda conoid bulunur.
Aile	Cryptosporidiidae	Monoksen olan gelişimde konak süreci hücrenin yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez, çıplak 4 sporozoiti vardır. Mikrogametleri filagella taşımaz.
Soy	<i>Cryptosporidium</i>	

Tyzzer farelerde yaptığı çalışmalar sonucunda ilk olarak *Cryptosporidium muris* ve *Cryptosporidium parvum* olmak üzere iki tür tanımlamıştır. *Cryptosporidium muris* mide paraziti olup büyük, oval ookist yapısına sahip iken *C. parvum* ince barsaklarda parazitlenmektedir ve küçük, yuvarlak ookistlere sahiptir (Tyzzer 1910). *C. parvum*'un memeli hayvanlarda en sık rastlanan etken olduğuna dikkat çekilirken, *C. muris*'in ise daha çok kronik enfekte hastalardan izole edildiği bildirilmiştir. Benzer biyolojik ve morfolojik farklılıklar kanatlılarda etkili olan *C. meleagridis* ve *C. baileyi* ile reptilleri enfekte eden *C. serpentis* ve *C. saurophilum* arasında da ortaya konmuştur (Xiao ve ark 2000).

Cryptosporidium türleri insanlarda ve hayvanlarda ishale ve gastroenteritin önemli sebeplerinden biri olarak tanınmaktadır. Yedi *Cryptosporidium* türünün (*C.parvum*, *C.hominis*, *C.meleagridis*, *C.felis*, *C.canis*, *C.suis* ve *C.muris*) insanlarda hastalığa sebep olduğu, fakat salgınların ve vakaların çoğunda *C.parvum* ve *C.hominis* saptandığı bildirilmiştir (Cacciò ve ark. 2005).

Önceleri *Cryptosopidium* cinsindeki tür sınıflandırılması ookist morfolojisi, konak seçiciliği gibi fenotipik özelliklere dayandırılmış olup 1984 Teksas, 1987 Carrolton ve 1993 Milwaukee salgınlarında tür ayrımı yapılamamıştır (Butler ve Mayfield 1996). Son zamanlarda tür ayrımında PCR-RFLP ve sekans analizleri gibi güvenilir teknikler uygulanmaya başlanmıştır. Ribozomal RNA' nın küçük alt biriminin, *C.parvum*' un önceden keyfi olarak sınıflandırılmış insan, sığır, kedi, fare, köpek, maymun, domuz, yaban gelinciği gibi *C.parvum* türünün farklı genotipleri olduğunu göstermiştir (Xiao ve ark 1999b). Daha sonraki analizler insan, sığır, kedi ve köpek türlerinin farklı türler olduğunu göstermiştir. Diğer genotiplerin tek bir türe ait olup olmadıkları tartışmalıdır. Bu konunun değerlendirilmesi morfolojik, biyolojik ve genetik araştırmaların desteğiyle yapılacaktır. Örneğin 18s rRNA ve HSP70 geni üzerindeki araştırmalar *Cryptosporidium*'un iki ana grup oluşturduğunu göstermektedir. *C. muris* ve *C.serpentis* bir grupta *C.hominis*, *C.parvum*, *C.baileyi*, *C.felis*, *C.canis* ve *C.meleagridis* diğer grupta yer almaktadır (Xiao ve ark 2000).

1.3. Morfoloji

Cryptosporidium cinsi Coccidian protozoonlar içinde en küçük ookiste sahiptir. Ookistler oval ya da yuvarlak olabilir. *Cryptosporidium* türleri yapı şekillerine göre morfolojik olarak birbirlerinden farklılık göstermektedir. Sporlanmış ookistlerin her biri dört sporozoitin yanında çeşitli küçük tanecikler ve zara bağlı yuvarlak ya da oval şekilli

kürecikler içerirler. Araştırmacılar ookistlerde sporokist olmadığını rapor etmişlerdir (Fayer ve Ungar 1986, Yücel 1989, Unat ve ark 1995).

Sporozoitlerin ön uçları sivri, arka uçları yuvarlak yarım ay biçimindedir. Ön uçlarından ookistin kutbuna bitişik olan bu sporozoitler, ookist içinde dönük olacak şekilde birbirlerine paralel uzanmışlardır. *Cryptosporidium muris*'in sporozoitleri 1.0-1.1 mikrometre, *C. parvum* 1.2-4.9 µm büyüklüğündedir. Her bir sporozoit arkada kalan 1/3 bölümünde belirgin bir çekirdek bulunmaktadır. Trofozoitler 2.0-2.5 µm çapında, yuvarlak ya da oval şekildedir ve intrasellüler yerleşim gösterirler. Trofozoitler 1.0-1.3 µm çapında büyük bir nükleoluslarının olması, sporozoit ve merozoitlerde bulunan apikal kompleksinin olmaması, sporozoitlerin ve tip I merozoitlerin merontlara geçiş dönemleri olarak kabul edilir. Nükleusun bölünmesi ile tek nükleuslu trofozoitler çok nükleuslu (6-8 nükleus) meront (şizont) durumuna geçerler. Fiziksel olarak farklı olan 2 tip meront yaklaşık olarak 4-5 µm çapındadır. Tip I merontlar 6-8 merozoit oluştururlar. Tip I merontlardan gelişen Tip II merozoitler 4 merozoit oluştururlar ve Tip I meronttaki merozoitlere benzerler. Tip I ve Tip II merozoitler yapı olarak birbirine benzerler. Bu merozoitler yaklaşık olarak 1-5 µm boyutlarında, ön ve arka uçları yuvarlak yarım ay görünümündedir. Bunlar tek bir vesiküler nükleus, endoplazmik retikulum ve çeşitli tanımlanmamış granüller içerirler. Mikrogamontlar erkektirler ve nadir olarak bulunurlar. İç yapısı incelendiğinde mikrogamontların erken dönemde birçok yoğun nükleus parçaları, ribozom, endoplazmik retikulum, membrana bağlı vakuoller içerdikleri görülmektedir. Yoğun ve sferik nükleus tanecikli sitoplazma kitlesinin merkezden uzak bölümde yer almıştır. Bir mikrogametositte 4-5 µm boyutlarında olabilen 14-16 adet mikrogamet gelişir. Olgun mikrogametler şişkin duran apikal uçlar nedeniyle takoz görünümündedir ve çift katlı bir dış membranı ile kuşatılmıştır. Yoğun olan nükleus mikrogametinin büyük bir bölümünü işgal etmekte ve nükleus yanında bir mitokondri bulunmaktadır. Mikrogamontların çok genç formları trofozoitlerden ayırt edilemez. Makrogamontlar hemen hemen küreseldir. Geniş tek bir nükleus ve endoplazmik retikulum içerirler ve etrafları "pelikula" olarak adlandırılan çift katlı bir membranla kuşatılmıştır. Olgun makrogamontlar 3.2-5.0 µm çapında olup, bunlar da çeşitli granüller yardımıyla ayırt edilmektedir. Ayrıca makrogamontların olgunlaşmasıyla birlikte hücrede polisakkaritlerin ve yoğun görünümlü taneciklerin sayısı da artar (Fayer ve Ungar 1986).

Konak enterositleri içinde bulunan ookistlerin %80'i kalın duvarlı, yaklaşık %20'si ince cidarlıdır. Dış ortama geçen dirençsiz ince cidarlı ookistler otoenfeksiyondan sorumludurlar (Ülgen ve Balcıoğlu 2007).

1.4.Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium türleri aseksüel (şizogoni, merogoni) ve seksüel (gametogoni, sporogoni) olarak iki farklı çoğalma dönemini konak içinde gerçekleştiren bir yaşam döngüsüne sahiptirler. (Fayer ve ark 1997).

Cryptosporidium spp. monoksen bir parazittir. Ara konaksız bir yaşam döngüsüne sahip olup, konağın barsaklarında süren döngüler sonucu enfeksiyon oluşur. *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin alımı genellikle enfekte hayvan ve kişilerden veya dışkı ile enfekte olmuş gıda ve su ile olmaktadır. Yaşam döngüsü memelilerde enfeksiyona neden olan *Eimeria* ve *Isospora* gibi diğer koksidian parazitlerin yaşam döngülerine benzerlik göstermektedir. Buna göre başlıca altı gelişim evresi bulunmaktadır (Ülgen ve Balcıoğlu 2007).

1.4.1. Ekskistasyon (Kist Formunun Kaybolması) Dönemi

Dışkıyla atılan ookistlerin ağız yoluyla alınmasıyla hayat döngüsü başlar. Ookistler çevre koşullarına çok dirençlidir. Her ookist dört adet sporozoit içerir. Diğer koksidiyalardan farklı olarak sporokist içermezler. Enfekte olmuş hayvanın oniki parmak barsağı içinde safra tuzlarının ve tripsin gibi sindirim enzimlerinin etkisiyle ookistler parçalanır (ekskistasyon) Ancak bu tip karakteristik etmenler olmaksızın da ekskistasyon gerçekleşebilmektedir. Örneğin ılık, mukozal sıvı içerisinde ookistler açılabilir ki bu durum konjunktival enfeksiyonu, solunum sistemi enfeksiyonunu ve oto enfeksiyonunu destekler (Dubleyle ve ark 1990). Konakta şekillenen ekskistasyona benzer kist açılımı bazı şartlar altında dış ortamda da gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin, 37 °C'deki musluk suyunda bulunan veya bir şekilde 37 °C' ye maruz bırakılan ookistler, hemen sonra derişik çamaşır suyuna alındığında ekskiste edilebilmiştir. Bu iki durumda da kistlerin açılmasına etki eden asıl faktör olasılıkla osmotik streştir. Yine safra tuzlarının tek başına kistlerin açılımını uyardığı, total safra salgısının da özellikle ookistin zayıf hipoklorit solusyonu gibi oksidatif ajanlara maruz kalmasından sonra ekskistasyonu sağladığı yapılan deneysel çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan bir diğer araştırmada, 4-23 °C'lik bir ortamda bir gece tutulan ookistlerin 37°C deki fosfat-buffer tuz solusyonunda saatlerce bekletildikten sonra açıldığı gözlenmiştir. Bilim adamları,

genel olarak ookistlerin açılabilmesi ve açılan ookistlerden çıkan sporozoitlerin etkinliği için en uygun pH'nın 6,8-7,4 olduğunu ifade etmişlerdir (Starling ve Arrowood 1993).

Ookistin açılması ookist duvarı üzerinden başlar ve açılan aralıktan aktif hareketli 4 sporozoit serbest hale geçer. Sporozoitler muz şeklindedir. Baş kısımları bağlayıcı protein içerir. Bazı kaynaklarda bu birleştirici proteine feeder organeller denilmektedir. Serbest hale geçen sporozoitler barsağın apikal yüzeyindeki hücrelere yüzlek şekilde tutunurlar (Sears ve Kirkpatrick 2001).

1.4.2. Merogoni Dönemi

Konak hücre yüzeyine tutunan sporozoit ilk önce apikal kompleksi aracılığı ile özellikle de mikronem kaynaklı olarak membran eritici faktörü salgılar. Böylece konak mikrovillusların ve membranı ile kendisini sararak koruma alanı oluşturan vakuöl oluşturur. Etkene intraselüler fakat ekstrasitoplazmik bir konum kazandıran bu yapı “parazitik vakuöl” olarak adlandırılır (Starling ve Arrowood 1993, Sears ve Kirkpatrick 2001). Vakuöl içerisinde yuvarlaklaşıp trofozoit halini alan protozoon eşeysiz olarak (merogoni=şizogoni) çoğalarak tip I merontları oluşturmaktadır. Şizogoni sırasında trofozoitin çekirdeği ard arda iki veya üç kez bölünerek 6-8 çekirdekli şizontu oluşturur. Takip eden dönemde her bir çekirdek, şizont duvarında farklı kısımlardan dışa doğru evagine olur. Böylece kendi plazmasına kavuşur ki sonuçta merozoitler şekillenmiş olur (Dubey ve ark 1990). Şekillenen merozoitler konak hücreyi parçalayarak barsak lümenine dökülürler ve civardaki tahrip olmamış sağlam hücrelere tutunurlar (Sears ve Kirkpatrick 2001). Merozoitler burada yeni bir şizogoni aşamasına girerek ya tip I ya da tip II şizontları oluştururlar. Her iki şizontun da oluşumu aynı tarzda gerçekleşir. Ancak, tip I şizonttan 6-8 merozoit şekillenirken tip II şizonttan sadece 4 merozoit oluşur. Bu noktadan itibaren, Tip I şizontlardan köken alan merozoitler konakta yeni hücreleri enfekte ederek tekrar bir merogoni başlatırlar. Cryptosporidiosis'te, özellikle de immünsüpresif hastalarda, Tip I şizont oluşumunun sürekli tekrarı söz konusu olabilmektedir ki persistensliğin temelinde yatan ana etkenin de bu olduğu bildirilmektedir (Starling ve Arrowood 1993).

1.4.3. Gametogoni Dönemi

Tip II şizontlardan (merontlar) meydana gelen merozoitler ise yeni bir döngü oluşturmamakta ancak konak içinde yeni hücrelere girdiklerinde eşeyli üreme fazı olan

gametogoniye başlamaktadırlar. Gametogoni ile birlikte merozoitler makro ve mikrogamontlara dönüşürler. Bu dönüşümün büyük bir kısmı makrogamont yönünde gerçekleşir (Starling ve Arrowood 1993).

1.4.4. Döllenme Dönemi

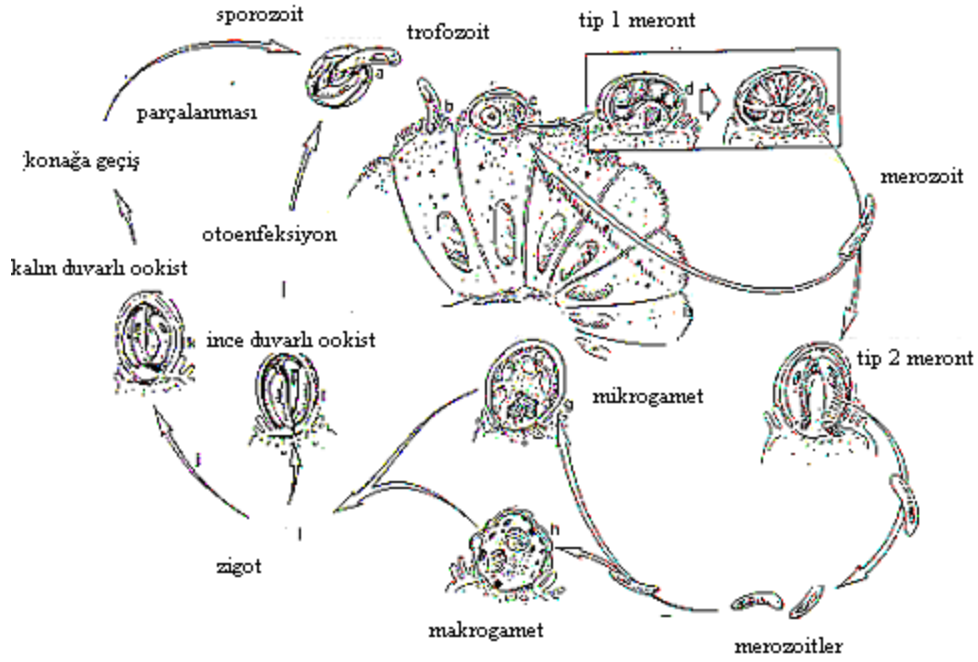
Mikrogamontlardan küçük, kamçısız fakat hareketli mikrogametler oluşur. Oluşan mermi benzeri mikrogametlerden biri makrogameti döller ve sonucunda zigot meydana gelir (Altıntaş 1997, Özcel ve ark 2007).

1.4.5. Ookist Dönemi

Zigot duvarının kalınlaşması ile parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayacak olan, dış çevre koşullarına dayanıklı ookist meydana gelmektedir (Ash ve Orihel 1990, Berger 2006, Özcel ve ark 2007).

1.4.6. Sporogoni Dönemi

Sporlanma diğer coccidianlardan farklı olarak konak içinde gerçekleşir. Ookist içinde sporlanma ile enfektif sporozoitler oluşmaktadır (Soave ve Weikel 1990, Current ve Garcia 1991).



Şekil 1.1. *Cryptosporidium* spp'e ait yaşam döngüsünde ookist gelişim evreleri (Goldoft ve Todd 2008).

Cryptosporidium ookistleri konak hücreleri içinde iken sporogoni geçirmekte, barsak lümenine döküldüklerinde enfektif hale gelmektedirler. Oysa diğer coccidian parazitlerden *Cyclospora*, *Toxoplasma* ve *Isospora* türlerinin ookistleri, konakları dışında dış ortamda oksijenle temas edene kadar sporlanmamaktadırlar (Plorde 1990, Current ve Garcia 1991). Ookistlerin % 80'i dış koşullara dayanıklı kalın bir duvar ile çevrilip dışkıyla atılarak diğer konaklara enfeksiyonu bulaştırmaktadır. Yaklaşık % 20'si ince çeperli olup, konak hücrede içlerindeki sporozoitlerin serbestleşmesiyle diğer enterositlere girerler ve yeni bir yaşam döngüsü başlatarak otoenfeksiyona sebep olurlar. Bu otoenfektif ookistler, az sayıda ookistle enfekte olan kişilerde bile şiddetli enfeksiyonların gelişiminden sorumludurlar. Bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise etken dışarıdan yeniden alınmasa da uzun süren ve hastanın yaşamını tehlikeye düşürebilen tabloların ortaya çıkmasına neden olabilecekleri düşünülmektedir (Fayer ve ark 1997).

1.5. Bulaş ve Epidemiyolojisi

Enfekte hayvan ve insanların dışkılarıyla atılan, dış faktörlere karşı dirençli ookistler çevreyi (su, toprak, bitkisel besinler vb.) kontamine eder. Çevredeki ookistlerin oral yolla alınmasıyla hastalık bulaşır. Cryptosporidiosis zoonoz bir enfeksiyon olup, dünya çapında bir dağılım gösterir (Saygı 1997, Köktürk 2002).

İnsandan insana bulaşma fekal-oral veya anal-oral yolla olabilmektedir. Özellikle çocuk bakımevlerinde ve hastanelerde ortaya çıkan salgınlar insandan insana bulaşın önemini kanıtlayan en önemli olaylar arasında yer alır (Albert ve ark 1986, Martino ve ark 1998, Köktürk 2002, Sarıkaya 2004). Erişkin kişilerde cryptosporidiosis görülme oranı çocuklara göre daha düşüktür. Çocukluk döneminde ise dört yaş ve özellikle de iki yaş altındaki çocuklarda parazitin görülme sıklığı artar. Bunun yanında anne sütü ile beslenmeyenlerin anne sütü ile beslenenlerden daha sık hastalığa yakalandıkları tespit edilmiştir (Bonilla ve ark 1992, Özçelik ve ark 1996, Saygı 1997).

Hastalık gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla daha fazla görülmektedir (Casemore 1991). İshalli ve mide-barsak şikayetleri olan, hastanede yatan ve dışkısı laboratuvara gönderilen yetişkin ve çocukların dışkı örneklerinden yapılan araştırmalara göre cryptosporidiosis oranının Avrupa'da %1-2, Kuzey Amerika'da 0.6-4.3, Asya, Avustralya, Afrika, Orta ve Güney Amerika'da ise % 3-4'den başlayıp %10-20'ye kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Fayer ve Ungar 1986).

Cryptosporidium ookistlerini taşıyan hayvan gübrelerinin yaygın bir biçimde toprağa bırakılması sonucu aerosol yayılma veya su kaynaklarının kontaminasyonu ile enfeksiyon oluşabilmektedir. *Cryptosporidium parvum*'un doğada yaygın olarak bulunması, ookistlerin her zaman enfektif olması ve oldukça küçük olmaları (3.5-6.0 µm), düşük sedimentasyon oranına (0.5µm/s) sahip olmaları ile enfeksiyonun yayılmasını kolaylaştırmaktadır. İşlenmemiş atık sularda, filtre edilerek işlenen atık sularda, kanalizasyonda, yeraltı sularında, yeryüzü sularında ve işlenmiş içme sularından ookistlerin tespit edilmesi dışkıyla kontaminasyon olabileceğini göstermektedir (Fayer ve ark 2000).

Amerika Birleşik Devleti'nde bir kaynak suyundan 400.000 kişi enfekte olmuştur. Su kaynaklı epidemi nedenleri arasında parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, klora dirençli olması ve çok az sayıda parazitin

dahi enfeksiyona neden olabilmesi gösterilmektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve cryptosporidiosis vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından salgın şeklinde olduğu bildirilmiştir (Ungar 1995, Topçu ve ark 2002). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Cryptosporidium* ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7.0'de iki saat içinde öldüğü kanıtlanmıştır. Su dezenfeksiyonunda kullanılan diğer bir yöntem olan ozonlama işleminin *Cryptosporidium* ookistleri üzerine etkisi araştırılmış ve enfektivitesinin 1 ppm konsantrasyonda 10 dakika sonra ortadan kalktığı gözlenmiştir. Aynı şartlarda *Cryptosporidium* ookistlerinin, *Giardia* kistlerine göre ozona 30 kat, klora ise 14 kat daha fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dezenfektanlarla yapılan çalışmalar sonucunda, sulardaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun, klor ya da klordioksitten daha etkili bir dezenfektan olduğu bildirilmiştir (Over 1996, Erickson ve Ortega 2006).

Çizelge1.5. Ülkemizde ve bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklığı (Direkel ve ark. 2011).

ÇALIŞMACI	YAPILDIĞI YER	YILI	GRUP	SAYI	GÖRÜLME SIKILIĞI %
Börekçi ve ark.	Mersin	2004	ishalsiz kişiler	361	3.1
Koturoğlu ve ark.	İzmir	2001	ishalli çocuklar	118	13.5
Otağ ve ark	Mersin	2006	ilkokul öğrenciler	72	5.5
Doğancı ve ark	Ankara	2001	ishalsiz çocuklar	50	6
Tumwine ve ark	Uganda	2001	ishalli çocuklar	1779	25
Tumwine ve ark	Uganda	2001	ishalsiz çocuklar	667	8.5
Yu ve ark	Kore	2002	ishalsiz kişiler	5262	3.3
Pereira ve ark	Brezilya	1999	ishalsiz çocuklar	445	14.4
Nagamani ve ark	Hindistan	2000	ishalli kişiler	1002	11.7
Iqbal ve ark	Pakistan	1996	ishalli çocuklar		10.3
Garcia ve ark	ABD Kanada	2002	çocuklar	401	21.2
Lee ve ark	Kore	2004	ishalli kişiler	942	1

İçme suyunun hijyenik olmaması, yetersiz kanalizasyon sistemleri gibi kötü hijyen koşulları, hayvancılıkla uğraşma, evcil hayvan besleme, veteriner hekimlik, epidemik bölgelere yolculuk, immun sistem yetmezliği, 0-4 yaş ve 60 yaş üstü olma gibi yaş faktörü, enfekte kişilerle yakın temas, toplu yaşama, yetersiz beslenme *Cryptosporidium* enfeksiyonları için risk faktörleri olarak bilinmektedir (Bonilla ve ark 1992, Spano ve Crisanti 2000, Altıntaş 2002).

1.6. Cryptosporidiosis

Bağışıklık sistemi sağlam olan konaklarda *Cryptosporidium* spp sıklıkla terminal jejunum ve ileumda görülüp daha hafif seyrederken, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde mide, duodenum, kolon, bilier, pankreatik kanallar ve solunum sisteminde yerleşerek çok ağır enfeksiyona neden olabileceği bildirilmiştir (Kösek ve ark 2001, Leav ve ark 2003).

Hastalıkta belli bir cinsiyet veya ırk yatkınlığı ortaya konamamıştır ancak insidensin kadınlara kıyasla homoseksüellerde daha fazla olduğu bildirilmiştir (Fahey 2003). Çocuklarda özellikle 1-5 yaş grubunun önemli olduğu belirtilmiştir (Sears ve Kirkpatrick 2001). Hastalığın özellikle HIV-pozitif bireylerde önem taşıması epidemiyolojik verilerin de yine bu insanlar üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. AIDS'li bireylerde yapılan taramalarda insidens Amerika'da %15-16, gelişmekte olan ülkelerdeki hastalarda ise %30-50 düzeyinde bulunmuştur (Fahey 2003).

1.7. Patojenite

Cryptosporidiosis ile ilgili patolojik bilgiler, canlılarda biyopsi ve ölenlerde otopsi bulguları şeklindedir. Yapılan histopatolojik çalışmalar etkenin gastrointestinal sistemde özefagustan rektuma kadar olan bölgenin herhangi bir yerinde yerleşebileceğini ancak en ağır enfeksiyonun jejunum bölgesinde olabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmalarda enfekte bağırsak epitel hücrelerinde absorpsiyon işlevinin sekteye uğradığı ve sekresyon salınımının arttığı gözlenmiştir. Etkenin özellikle immun yetmezliği olan şahıslarda solunum sisteminde, hepatobiliyer sistemde ve pankreas kanalında da hastalığa neden olabileceği tespit edilmiştir (Fayer ve Ungar 1986, Ungar 1995, Topçu ve ark 2002).

Hastalık bağırsaklarda ishal, akciğerlerde ise solunum sistemi bozuklukları halinde şekillenir. Ağır enfeksiyona tutulan hastaların ince bağırsak villuslarında atrofi ve körleşme,

kriptlerin boyunda uzama gözlenirken, plazma hücrelerinin ve lenfositlerin lamina propriada infiltrasyonu söz konusudur (Clayton ve ark 1994, Graaf ve ark 1999).

Cryptosporidium enfeksiyonlarında hastalığın oluşum mekanizması tam anlamıyla açıklanabilmiş değildir. Hastalıkta ishalin ortaya çıkışına mukozal yüzeyin azalması ve bütünlüğünün bozulması temel neden olarak gösterilirken parazitten enterotoksin salgılanmasının da etkili olabileceği göz önünde tutulmuştur. Zarar gören absorpsiyon yüzeyinin bütünlüğüne bağlı olarak B12 vitamini, yağ ve D-xylose malabsorpsiyonunun gelişebildiği belirtilmiştir. Mevcut bilgiler ışığında *Cryptosporidium* enfeksiyonunda mukozal bariyer bozukluğu oluşmakta ve bunun sonucunda da makromoleküllerin permabilitesi artmaktadır. Bu artışa bağlı olarak bağırsak epiteli içerisinde bulunan iyonlar ve su tekrar barsak lümenine atılmakta ve lümen içi sıvı miktarında artış yaşanmaktadır. Bazı cryptosporidiosis vakalarında bol miktarda sulu ishal tablosu gözlenmektedir (Clayton ve ark 1994, Yetkin 1998).

1.8. Klinik Tablo

Cryptosporidiosisde intestinal, respiratuar, hepatobiliyer ve pankreatik cryptosporidiosis olmak üzere dört farklı klinik tablo görülür (Griffiths ve ark1998).

1.8.1. İntestinal Cryptosporidiosis

1.8.1.1. Asemptomatik Taşıyıcılar

Hiçbir klinik belirti görülmez. Asemptomatik taşıyıcılık oranı HIV pozitif olgularda sağlıklı bireylerden daha yüksektir. ABD’de yapılan bir çalışmada normal toplumun % 6,4’ünde, HIV pozitif olguların ise % 22’sinde hiçbir klinik belirti gözlenmezken dışkılarında *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır (Pettoello-Mantovani ve ark 1995).

1.8.1.2. Akut Sınırlı Enfeksiyon

Bağıışıklık sistemi sağlam kişilerde daha yaygın görülen bu klinik tablodur. En sık görülen semptom bol ve sulu, mukuslu, çok nadir kanlı ishaldir. Barsak hareketlerinde artış, hızlı kilo kaybı ve dehidratasyona neden olabilmektedir. Karın ağrısı, anoreksia, ateş (<39 °C), bulantı kusma, başağrısı gözlenen belirtilerdir. Bu klinik belirtiler birkaç gün ile birkaç hafta arasında kendiliğinden geçebilmektedir (Ülgen ve Balcıoğlu 2007).

1.8.1.3. Kronik Enfeksiyon

Daha çok malnütrisyonlu çocuklarda ve AIDS olgularında başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış grupta görülen klinik tablodur. Olguların %85'inde dirençli ishal, %100'ünde kilo kaybı ve malnütrisyon gözlenmektedir (Moolasart ve ark 1995).

1.8.1.4. Fulminant Enfeksiyon

AIDS hastalarında ve kemoterapi ile bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. En belirgin özelliği kolera benzeri klinik tablo oluşturması ve çok yüksek mortalite ile karakterize olmasıdır. Hipovolemi ve şoka neden olabilmekte bu nedenle tedavide öncelikle sıvı elektrolit dengesinin sağlanması önerilmektedir (Ülgen ve Balcıoğlu 2007).

1.8.2. Respiratuar Cryptosporidiosis

Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde yaygın olarak görülen bu klinik tablo şiddetli, dirençli öksürük, ses kısıklığı, ateş, trakeal sekresyon ve solunum güçlüğü ile karakterizedir. AIDS olguları başta olmak üzere malign lenfoma ve kemik iliği transplant olguları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde öldürücü solunum sistemi tablosu daha çok görülmektedir (Dupont ve ark 1996).

1.8.3. Hepatobiliyer Cryptosporidiosis

Genellikle AIDS'li ve kronik cryptosporidiosisli hastalarda gelişen safra kesesi ve safra yolları epitelinin tutulumu ve taşsız kolesistit tablosuyla ortaya çıkmaktadır. AIDS olgularında intestinal enfeksiyonların tekrarı (dirençli cryptosporidiosis) veya paramomisin gibi intraluminal ajanlarla sağaltım biliyer enfeksiyon için risk oluşturmaktadır (Ülgen ve Balcıoğlu 2007).

1.8.4. Pankreatik Cryptosporidiosis

Pankreatik kanalların kolonizasyonu ile gelişen ve genellikle AIDS'li hastalar başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde gözlenen bu klinik tablo hepatobiliyer cryptosporidiosis'e eşlik eder (Arrowood 1997).

1.9.Tanı

Cryptosporidiosis tanısı önceleri barsak biyopsilerinde *C. parvum*'un çeşitli gelişim evrelerinin gösterilmesiyle konmuş ve parazitlerin hücre içi, sitoplazma dışı olarak yerleştiği ortaya çıkmıştır (Topçu ve ark 2002).

Cryptosporidium enfeksiyonunun tanısı genellikle dışkı örneklerinde ookistlerin görülmesiyle yapılmaktadır. Dışkı dışında balgam, duodenum sıvısı ve barsak biyopsi örneklerinden de etkenin tanısı yapılmaktadır. *Cryptosporidium*'ların tanısı için dışkı ve balgam ya da safra örnekleri gibi vücut sıvı örnekleri taze olarak incelendiği gibi %10 formalin ya da sodyum asetat-asetik asit-formalin içinde tespit edildikten sonra da incelenebilmektedir (Guerrant 1995).

Cryptosporidium spp.'nin tespitinde en kolay ve kesin tanı dışkıyla atılan ookistlerin görülmesiyle konmaktadır. Bu yüzden bazı boyama yöntemlerinin kullanılması gerekir. Bu yöntemler arasında Asit fast, Auramin-rhodamine ve Acridine orange gibi boyama yöntemleri sayılabilir. Ookistler, hacim ve morfolojik olarak maya hücreleri, fungal ve yağ globüllerine benzer. Bu yapıları ookistlerden ayırmak amacıyla güvenilir, spesifik ve tanısal değeri en yüksek olan metot asit fast boyalarıdır (Çiçek ve Yılmaz 2011).

Hastalıkta ookist atılımı çoğunlukla intermitant bir özellik taşıdığından teşhis için farklı zamanlarda çok sayıda dışkı örneği almak gerekebilir (Sears ve Kirkpatrick 2001). Ayrıca etken atılımının bol olduğu sulu dışkılarda ookistlerin çoğu mukus içinde saklı kalabilmekte, şekilli ve az mukuslu dışkılarda ise etken atımı düzensiz veya yetersiz olmaktadır. Genel tanı kuralları açısından alınan materyalin taze olması gerekir (Sears ve Kirkpatrick 2001).

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

1.9.1. Direkt Mikroskopi Yöntemi

1.9.1.1. Boyasız Direkt Mikroskopi Yöntemi

Cryptosporidium ooksitlerinin yapısal özellikleri ve iç yapıları görülmekte ve ayrıca morfolojik yönden mayalarla karışabilmektedirler. Boyasız preparatların hazırlanması için çöktürme ve yüzdürme tekniklerinden yararlanılır. Yoğunlaştırma için Sheather'ın şeker çözeltisi, çinko sülfat (%33) ve sodyum klorür (%36) kullanılmaktadır. Eğer sadece *Cryptosporidium* ookistleri araştırılacaksa en az 500 rpm'de ve 10 dakika süre ile santrifüj edilmesi gerekmektedir (Current ve Garcia 1991, Garcia 1992, Baron ve ark 1994).

1.9.1.2. Boyalı Direkt Mikroskopi Yöntemi

Cryptosporidium ookistlerinin aside dirençli boyama ve konsantrasyon yöntemleri sonrasında özel mikroskoplarda incelenmesi gerekmektedir. Konsantrasyon yöntemi zaman alıcıdır ve yoğun iş gücüne gereksinim duyulur. Ayrıca boyama esnasında kullanılan maddelerin bazıları da oldukça toksik ve tehlikelidir. Boyalı direkt mikroskopik incelemede kullanılan boyama yöntemleri şöyledir; Modifiye kinyoun'un asit-fast, ziehl-neelsen, giemsa, acridine-orange, auramine-rhodamine safranin, dimethyl-sulfoksid ve karbol fuksin sayılabilir.

Modifiye kinyoun'un asit-fast boyama yöntemi rutin laboratuvarlarda preparatların istenilen zamanda değerlendirilebilmesi, ucuz olması, ookistlerin içyapısını diğer yöntemlerden daha ayrıntılı gösterebilmesi ve kırmızı boyanan ookistlerin mavi zeminde kolay ayırt edilmesi nedenlerinden dolayı diğer boyama yöntemlerine göre daha yararlı bulunmuştur. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise özellikle ısıtma işlemi sırasında buharlaşan kimyasal maddelerin ortamda iritan etki yapabilmesidir. Bu nedenle havalandırma sisteminin yeterli olmadığı laboratuvarlarda modifiye aside dirençli boyama yerine Kinyounun aside dirençli yöntemi tavsiye edilmektedir (Current ve Garcia 1991, Unat 1995, Ok ve Yereli 1996).

1.9.2. Serolojik Yöntemler

Serolojik yöntemler çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesine olanak sağlamaktadır. Değerlendirmede deneyim gerektirmemesi, iş yükü çok olan laboratuvarlarda tercih edilmesine neden olur. *Cryptosporidium* türlerinin dışkıda immunolojik olarak araştırılmasında DFA, IFA, ELISA ve hızlı tanı kistleri ticari olarak kullanıma sunulmuştur.

1.9.2.1. DFA (Direkt İmmüfloresan Tekniği)

Dışkı örneklerindeki organizmaların yüzeyindeki antijenlerin immünolojik olarak saptanmasında kullanılan monoklonal antikor temeline dayalı DFA yöntemi cryptosporidiosisin tanısında günümüzde seçkin bir yöntemdir ve modifiye asit-fast boyama tekniğine göre daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Bu yöntemde şüpheli materyaldeki antijenler lam üzerine yayılarak fikse edilir ve antijenin üzerine özel işaretli antikorlar konulur. Şüpheli antijenlerin işaretli özel antikorların oluşmasına neden olmuş olan antijenler olup olmadığı araştırılır (Özcel ve Altıntaş 1997). Bu yöntemde konsantre veya konsantre olmayan dışkı örneklerinde fluorescein isothiocyanate (FITC) bağlı “monoklonal antikorlar” kullanılarak “ookistler” tanımlanmaktadır. Bu testlerin kullanılışı kolaydır ve tecrübeli teknisyen gerektirmezler ve zaman kaybına yol açmazlar. Bireysel laboratuvarlarda da kullanılabilirler. Bazı araştırmacılar cryptosporidiosis’in tanısında en duyarlı (sensitivite: %99) ve özgün (spesifite: %100) yöntem olarak DFA’yı bildirmişlerdir (Uyar ve Özkan 2009).

1.9.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Antikor veya antijen aranmasında kullanılan serolojik testlerden biri olan ELISA yöntemi antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugant ve enzim substratı kullanılarak renk oluşumu esasına dayanan bir testtir. Elimizde neye özgül olduğunu bildiğimiz antijen ile örneklerdeki antikoru, tipini ve miktarını veya elimizde antikor var ise de buna özgü antijeni ve miktarını saptayabiliriz.

Farklı ELISA yöntemleri mevcuttur:

- Kompetitif ve nonkompetitif ELISA
- İndirek ELISA
- Sandwich ELISA
- Makro ve mikro-ELISA

-Avidin ve biyotin ekli ELISA

Serumda antikor aramak için yapılan indirek mikro ELISA testinin basamakları:

1-Katı faz olarak kullanılan 96 çukurlu polistren plaklar üzerine bilinen bir antijen bağlanır.

2-Antijen bağlı çukurlara serum örnekleri eklenerek oda ısısında veya 37°C’de belirli bir süre inkübe edilir. Bu sürenin sonunda çukurlar tamponlanmış sıvı ile yıkanır. Serumda antikor varsa katı fazdaki antijene bağlanarak yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaşmaz. Eğer serumda antikor yok ise antijene bağlanmaz ve yıkama işlemi sonunda tamamen temizlenmiş olur.

3-Katı fazdaki antijene bağlanmış olan IgG yapısındaki antikoru saptamak için çukurlara konjugant olarak tanımlanan Fc kısmı enzim ile işaretli anti-IgG antikoru eklenir. Konjugant yapısında bulunan enzim genellikle peroksidazdır. Bunun dışında kullanılan enzimler; alkalen fosfataz, glukoz oksidaz, β -D-galaktosidazdır. Çukurlara konjugant eklendikten sonra belirli bir süre inkübe edilir. Bu sürenin sonunda tamponlanmış su ile ikinci bir kez yıkanır. Katı fazdaki antijene bağlanmış olan antikora bağlanan konjugat ikinci yıkama işlemi ile çukurdan uzaklaştırılmaz.

4-Ortamda bağlı kalan konjugatın gösterilmesi için ortama konjuganttaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir. Çukurlara eklenmiş renksiz enzim substratı belli bir sonra enzimin etkisi ile renklenir. Enzim aktivitesini durdurmak için ortama asit (H_2SO_4) eklenir ve oluşan rengin koyuluğu (optik dansite) ELISA okuyucusunda okutulur. Çukurlarda oluşan rengin koyuluğu serumdaki antikorum miktarı ile doğru orantılıdır. Plaktaki bazı çukurlara miktarını bildiğimiz antikor eklenirse, bu çukurlarda oluşan optik dansite eğrisi ile serumdaki antikor miktarı saptanabilir (Okay 2006).

ELISA hastalıkların tanısında kullanılan güvenilir bir testtir. Klinik araştırmalar sonucunda elisa immunassay (EIA) kitlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü %93-100 arasında bildirilmiştir. Fakat bu testlerin çapraz reaksiyon göstererek yalancı pozitif sonuçlar vermesi en büyük dezavantajıdır.

1.9.2.3. IFA (İndirekt Floresan Antikor Testi)

İndirekt Floresan Antikor Testi (IFA) ookist yapısında bulunan antijenik yapılara floresan boya ile işaretli monoklonal antikorların bağlanması prensibi esasına dayanır (Carey

ve ark 2004). Bu yöntem diğer protozoon, helmint ve enterik bakterilerle çapraz reaksiyon vermemesi ve parazitin az sayıda ookist içeren dışkı örneklerinde bile teşhis edilebilmesinden dolayı önemlidir. IFA testi hastalığın erken döneminde tanı konulmasında ve asemptomatik taşıyıcıların belirlenmesinde oldukça spesifik bir yöntemdir. IFA testinin özgüllüğü oldukça yüksek olup asit-fast tekniklerinden daha duyarlı özelliktedir. Ancak IFA testi çapraz reaksiyon vermemesi ve dışkının yoğunlaştırmasına gerek duyulmadan uygulanması açısından yarar sağlamakla birlikte aside dirençli boyama yöntemlerinden daha pahalıdır (Korkmaz 2011). Ayrıca; pahalı bir teknik olması ve uygulanması için floresan mikroskoba gereksinimin olması testin dezavantajları arasında sayılabilir (Casemore 1991). Testin sonunda floresan boyama teknikleriyle boyanan preparatların floresan mikroskopunda x1000 objektif taramasında ookistler siyah zemin üzerinde yuvarlak-oval yapıda ve boyaya göre sarımsı elma yeşili veya turuncu renkte kolaylıkla fark edilebilirler. Ancak ookistlerin çoğunun yeteri kadar boya almaması ve yapısının bozulmuş olması gibi nedenlerle iç yapısının seçilememesi ve tekniğin kalite kontrolünün zorluğu yöntemin diğer dezavantajlarındandır (Mtombo ve ark 1992, MacPherson ve McQueen 1993).

1.9.2.4. Hızlı İmmünokromatografik Yöntemler

Entamoeba histolytica, *Cryptosporidium* spp, *G. intestinalis* ve *E. histolytica*'nın ayrı ayrı ya da birlikte EIA yöntemi ile 15 dakikada değerlendirilebildiği hızlı tanı testleri de vardır. Bu testlerin en önemli özellikleri kısa sürede, kolayca uygulanmaları ve yine kısa sürede sonuç vermeleridir. Bu testlerin uygulanmasında herhangi bir araç ya da ekipmana ihtiyaç yoktur ve oda ısısında 1.5-2 yıl saklanabilirler (Garcia ve ark 2000).

Serolojik yöntemler arasında en çok uygulanan IFA ve ELISA testleridir. Özellikle immün sistemi sağlam kişilerde enfeksiyondan 2 hafta sonra ELISA ile %100'e varan oranda IgG ve IgM antikorları saptanmıştır. Bazı epidemiyolojik taramalarda, enfekte olmadığı düşünülen kişilerin %50'sinde spesifik anti- cryptosporidia IgG antikorları bulunmuştur. Bu sonuçlar bu kişilerin hayatlarının bir döneminde bu enfeksiyonu geçirmiş olabileceğini göstermektedir (Yücel 1989). Serolojik testler arasında sayılan monoklonal antikorlarla yapılan IFA testinin sensitivitesi %100 olup, boyama tekniklerinden yaklaşık 20 kez daha duyarlıdır (Gün 1996). Serolojik olarak spesifik IgG ve IgM antikorlarının ve sporozoit antijenlerinin gösterilmesi ile de tanı konulabilir (Lechevallier ve ark 1991, Laberge ve Griffiths 1996).

Heterolog antikorlar ile ELISA kitinin reaksiyon vermesi sonucu yanlış pozitif sonuçlar oluşabileceği bildirilmektedir (Krause ve ark 1995). Son zamanlarda rutin tanı yöntemleri arasına giren ELISA testlerinde *C. parvum* ve diğer *Cryptosporidium* türleri arasında çapraz reaksiyonlar olabileceği bildirilmiştir. Bu çapraz reaksiyonların klinik örnekler için önemi olmamasına karşılık çevre örnekleriyle çalışıldığında sıkıntı yaratabileceği bildirilmektedir (Doung ve ark 1995).

1.9.3. Moleküler Yöntemler

Günümüzde etkenin araştırılmasında ve genetik özelliklerinin belirlenmesinde Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi başta olmak üzere birçok moleküler metodlar kullanılmaktadır (Mülazımoğlu 1993, Oktun ve Yüce 1995). PCR yöntemi sayesinde farklı türleri birbirinden ayırmak ve aralarındaki epidemiyolojik ilişkileri belirlemek mümkün olmaktadır. PCR yönteminin kullanılması, su kaynaklarında bulunan *Cryptosporidium* türlerinin tespit edilmesinde avantaj sağlamaktadır (Saygı 1997). Ancak bu yöntemin henüz tam olarak standardize edilmemiş olması, ekonomik yükü ve özel donanım gerektirmesi başlıca dezavantajlarını oluşturmaktadır (Doung ve ark 1995, Saygı 1997).

Avustralya’da yapılan bir çalışmada *C. parvum* tespitinde farklı olarak PCR ile mikroskopi karşılaştırılmış, PCR analizi ile 36 pozitif sonuç bulunurken modifiye Ziehl-Neelsen yapılan mikroskopik incelemede 29 pozitiflik bulunmuştur (Morgan ve Thompson 1998). 1996 yılında yapılan başka bir çalışmada, PCR ve DNA hibridizasyon yöntemlerinin kombine olarak kullanılmasıyla hızlı ve çok hassas sonuçların alındığı belirtilmiştir (Janoff ve Reler 1987).

İnsanları ve diğer memelileri enfekte eden *Cryptosporidium* türlerinin genetik farklılığını ortaya çıkarmak için birçok çalışma yapılmaktadır (Spano ve ark 1998, Xiao ve ark 1999b). Hali hazırda *C. parvum*’un genom projesi tamamlanmasa da, elde edilen veriler ışığında birçok araştırmacı tarafından bu parazitin genetik gizemleri (virulans ve ilaç duyarlılık genlerinin belirlenmesi vs.) çözülmeye çalışılmaktadır (Abrahamsen ve ark 2004). Avrupa’da özellikle *C.parvum* üzerinde çeşitli moleküler çalışmalar yapılmıştır. Mevcut *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanması için geliştirilen birçok teknik vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir;

1. Plasmid DNA analizi
2. Genomik DNA restriksiyon analizi
3. Prob hibridizasyon teknikleri
4. PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)
5. Gen sekans analizleri
6. PCR'a dayalı tiplendirmeler (PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCRAFLP vb.)
7. Ribotiplendirme

Günümüzde teşhiste kullanılmak üzere seçilebilecek hedef moleküller konusunda ayrıntılı bilgilere ulaşılmıştır. İzole edilen etkenin türünün, canlılığının ve enfektivitesinin tayini amacı ile geliştirilmiş değişik PCR teknikleri bulunmaktadır. Bunlara rRNA veya mRNA bazlı Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) örnek gösterilebilir (Jenkins ve ark 2000). Restriction Fragment Length Polymorphism tekniği (PCR-RFLP PCR), PCR ile üretilen uzun bir genom parçasını uygun enzimlerle parçaladıktan sonra, ayrılan kısımların jelde yürütülerek hangi gen bölgesinin daha uzun olduğunu ortaya koyan dolayısıyla da etkenin ayrıntılı genetik analizinin yapılabilmesini sağlamaktadır (Wu ve ark 2004). PCR-RFLP yönteminden daha etkin olan nested-PCR ise önce PCR ile uzun bir baz bölgesinin üretilip bunu takiben o bölge içindeki küçük belli alanlara yönelik primerler eklenerek tekrar PCR ile o kısımların üretildiği, klasik PCR'a göre 4-5 kat daha etkili olan bir yöntemdir. Üretilen hedef DNA miktarını dolayısıyla ortamdaki etken miktarını ortaya koyabilen, özel işaretli hibridizasyon problemleri kullanılarak yapılan Real-Time PCR (Limor ve ark 2002) ve özel TaqMan PCR (Carey ve ark 2004) örnek olarak gösterilebilir (Awad El Kariem ve ark 1998).

Cryptosporidiosis PCR ile teşhisi için hsp 70 mRNA geni (Di Giovanni ve ark 1999), 18s SSU rRNA geni (Xiao ve ark 1999a), β tubulin kodlayan mRNA geni (Widmer ve ark 1999), amyloglikosidoz enzimini kodlayan mRNA geni (Jenkins ve ark 2000), methionin aminopeptidaz, T-kompleks protein 1 delta (TCP-1) içeren chaperonin kodlayan genler (Wu ve ark 2004), COWP, TRAP-C1 (trombospondin-related adhesive proteins *Cryptosporidium*-1), TRAP-C2 (Pedraza-Diaz ve ark 2001) genleri sık kullanılan gen bölgeleridir. Bu bölgelerden en fazla 18S rRNA dizisi kullanılmaktadır. Bu gen dizisinin *Cryptosporidium*

türleri için kapsamlı bir dizi verisine sahip olmasının yanında beş kopya halinde bulunması da yarar sağlamaktadır. Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) yönteminin kullanılması ise test süresini kısaltması ve klinik örneklerden parazit tanımlanmasının hızlı tanısı için büyük yarar sağlamaktadır (Jiang ve Xiao 2003).

COWP (*Cryptosporidium* oocyt wall protein) geninin çeşitli *Cryptosporidium* türleri (*C. wrairi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. muris* ve *C. serpentis*) ve *C. parvum*'un insan, sığır, maymun, dağ gelinciği, fare domuz ve köpek genotiplerindeki nükleotid dizilerinde primer ve hedef bölgelerinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Bu sonuçlar, *Cryptosporidium* türleri ve genotiplerinin COWP'ye dayalı moleküler farklılaşmasının ortaya konması için faydalı bilgiler sağlamaktadır (Xiao ve ark 2000).

Son çalışmalarda ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan bölge (18S rRNA) taksonomik sınıflandırmalarda kullanılmaya başlamıştır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda inek ve insanlardan izole edilen *C. parvum*'un iki genotipinin olduğu bulunmuştur. Bu iki genotip 18S rRNA kodlayan bölgeleri bakımından oldukça birbirlerinden farklıdır. *Cryptosporidium* genotip I yalnızca insanlara bulaşır ve insanda enfeksiyon oluşturur. Fakat hayvansal olan genotip II hem insanlara hem de inek, koyun, sığır, at vb. çiftlik hayvanlarına bulaşmaktadır. Ayrıca başka hayvanlarda (domuz, fare, kedi ve koala) bulunan yeni *Cryptosporidium* genotipleri de 18S rRNA'yı kodlayan bölgenin sekansı yoluyla tanımlanmıştır (Norman ve ark 1985).

1.9.4. Histopatolojik İnceleme

Histopatoloji özellikle 1980 öncesinde *Cryptosporidium* için kullanılan tek tanı yöntemidir. Barsaklardan biyopsi örneği alınarak mikrovillusların kenarında küçük ve yuvarlak ookistleri aranır. Bu yöntemde hemotoksilen ve eozin gibi boyalarla boyanarak çeşitli gelişim dönemlerindeki *Cryptosporidium*'ların teşhisi yapılabilse de, yöntem tür identifikasyonu için yeterli olmamıştır. Bunun yanında hem invaziv girişim gerektirmesi hem de alınan parça için hızlı fiksasyona ihtiyaç duyulması, pahalı olması ve yapılması için fazla zamana gereksinim duyulması gibi sebeplerle günümüzde pek kullanılmamaktadır (Fayer ve ark 1986, Casemore 1991).

1.9.5. Kültür Yöntemleri

1983 yılında *Cryptosporidium* spp. 'nin in vitro olarak ilk kez aseksüel döngüsü gerçekleştirilmiştir. 1984 yılında, insan ftal akciğer hücrelerinde (HFL: Human fetal lung), primer tavuk böbrek (PCK: Primer chicken kidney) hücrelerinde ve domuz böbrek (PK-10: porcine kidney) hücrelerinde *Cryptosporidium* spp.'un tüm yaşam döngüsünü gerçekleştirmişler ve en başarılı olarak HFL'yı bildirmişlerdir. Daha sonra değişik hücre serilerinde MDBK (Mardin-Darby bovine kidney cells) HCT-8 (Human colonic tumor), Mause L929 fibroblast hücrelerinde ve diğer pek çok hücre serilerinde de denenmiştir (Korkmaz 2011).

Cryptosporidium muris için en ideal kültürün doğal enfeksiyon karakterlerine de uygun olarak insan mide adenokarsinom hücre kültürü olduğu ve bu kültürde *C. parvum*'u da üretebilmenin mümkün olduğu ifade edilmiştir (Choi ve ark 2004).

Kısaca dışkidan elde edilen ookistler %2,5 $Kr_2Cr_2O_7$ (potasyum dikromat) eklenerek 4 °C'de bekletilmiş ve Sheather in flotasyon yöntemi uygulanmıştır. PBS ile yıkanıp antibiyotik karışımında (penicilin, streptomisin, amfoterisin bekletilerek mikrobial flora baskılandıktan sonra 37°C de PBS %0,75 sodyum taurokolat ve %0,25 tripsin içeren ortamda 30-60 dakikada ekskistasyon yapılarak elde edilen sporozoit, ookist ve ookist duvarını içeren karışım PBS ile yıkama önerilmektedir. Daha sonra 1cm² ye 1x10⁴ sporozoit olacak şekilde hücre kültüründe kullanılan besiyeri idame besiyeri olup 96 saat sonra tip 1 merontların gözlemlendiği bildirilmektedir (Arrowood 2002).

Hücre kültürünün en büyük dezavantajı, etkenin doğal biyolojik siklusunda oto-enfeksiyona yol açan ince duvarlı ookistlerin in vitro ortamda oluşmamasıdır. Bu durum, kültürde yoğun bir enfeksiyon tablosunun oluşumunu engellemektedir (Gasser ve O'Danoghue 1999).

Hücre kültürleri etkene karşı ilaç denemelerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, etkenin gerek ekskistasyonu, gerek üreme yetisi ve ilaç duyarlılığı inokulum hazırlama tekniğine, inkübasyon süresi ve şartlarına, etkenin orijinine ve benzer bir takım faktörlere bağımlılık gösterir (Gasser ve O'Danoghue 1999).

1.10. Tedavi

Cryptosporidiosis'te tedavi amacı ile sıvı sağaltımı ve diğer destek tedavi uygulamalarından, kemoterapötik uygulamalarından, antiviral tedaviden ve immunoterapiden faydalanılabilmektedir. Hastalığa karşı pek çok farklı tedavi yaklaşımı söz konusu olsa da henüz cryptosporidiosis'e spesifik belli bir tedavi ortaya konamamıştır (Sears ve Kirkpatrick 2001).

İshal tedavilerinde genel klinik yaklaşım olan oral veya parenteral sıvı sağaltımı cryptosporidiosis' te de önemli bir yere sahiptir (Fahey 2003). Sağaltım amacı ile yapılan etkili bir rehidrasyon uygulamasından başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Başarı özellikle normal immüniteye sahip hastalarda daha da yüksektir. Rehidratasyon amacı ile geliştirilmiş cryptosporidiosis'e spesifik bir preparat yoktur. Fakat sağaltımda elektrolitlerden yararlanılabilmektedir.

Cryptosporidiosis'te farklı farmakokinetik özelliklere sahip çok sayıda kimyasal ajan tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Ancak kesin çözüm olarak bir kematerapödik henüz ortaya konamamıştır. Bunun nedeni olarak *Cryptosporidium* türlerinin antimikrobiyal ajanlara karşı dirençliği gösterilebilir. *Cryptosporidium* türlerinin diğer akrabalarından farklı olan bir özelliği ise konak hücre membranında kendine farklı bir kompartman oluşturmaktır. Denenen bazı kemöterapötikler; Spiramisin, lasalocid, ha1ofuginone lactate, decoquinate ve paromomycine kısmen etkili olan ilaçlardır Bu ilaçlar enfeksiyonu hemen ortadan kaldıramazlar ancak atılan ookist sayısında ve ishalin şiddetinde azalmayı sağlayarak, immunitenin de gelişmesi durumunda hastalığın seyrini iyiye çevirmektedirler. Bu ilaçların maliyeti ve temini birçok ülkede problem teşkil etmektedir. İlaç denemeleri halen devam etmektedir (Lindsay ve ark 2000).

Nitrozoksanid araştırılması günümüzde *C.parvum* ve *C.hominis* enfeksiyonlarında, “Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)” (United States Food & Drug Administration) tarafından kabul görmüş ve umut vaat eden tek ilaçtır (Rossignol 2010).

İmmun sistemi sağlam kişilerde enfeksiyon genellikle ağır seyretmez ve 1-2 hafta içerisinde kendiliğinden geçer. Dehidratasyon tablosu durumunda sıvı ve elektrolit kaybını karşılamak tedavi için yeterlidir. Bu gibi olguların çoğunda başka bir tedaviye gerek yoktur (Akısü ve Korkmaz 2005).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda daha fazla oranda sıvı, elektrolit, kalori, yağ, karbonhidrat ve amino asit replasmin yanı sıra ilaç tedavisine de başlanmalıdır. Ancak İmmunsuprese ilaç uygulanan hastalarda (kanser, transplantasyon tedavileri) bu tedavilere ara

verilmelidir. Özellikle AIDS'li hastalarda CD4 hücre sayısı 200/mm³'ün altına düştüğünde cryptosporidiosis yaşamı tehdit edebilmektedir. Bu gibi durumlarda cryptosporidiosis için tedavi uygulanmadan önce antiretroviral tedavilerle CD4 sayısının yükseltilmesi gereklidir (Akısü ve Korkmaz 2005).

Enfeksiyonun tedavisinde günümüze dek pek çok ilaç denenmiş olup bunlar arasında üzerinde en sık çalışılan ilaç spiramisin'dir. Wittenberg ve ark. (Wittenberg 1989) tarafından *Cryptosporidium* ookistli bebeklere spiramisin verildiğinde atılan dışkı hacminin önemli ölçüde azaldığını ancak yan etkileri nedeniyle ilacın kesilmesiyle ookist atılımının tekrar arttığı belirtilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada cryptosporidiosis'e bağlı ishali olan çocuklara beş gün boyunca iki doza bölünerek 75 mg/kg dozda spiramisin verilmesi halinde ilacın ishal süresini kısalttığı ancak ookist atılımını önleyemediği bildirilmiştir (Saes-Liorens 1989).

Naciri ve ark (1993)'un buzağılar üzerinde yaptığı çalışmada halofuginone lactate'ın 120mg/kg dozda verilmesi durumunda parazite yol açtığı klinik bulguların azaldığı, ilacın kesilmesinden sonra ise hayvanların ookist atılımının devam ettiğini bildirmişlerdir (Naciri ve ark 1993).

Parazitin tedavisinde kullanılan bir diğer ilaç aminoglikozit grubu bir antibiyotik olan paromomisin'dir. Paramomisin oral alınan ve absorbe olmayan bir ilaçtır. *C. parvum* parazite karşı zayıf aktivite gösterir. HIV ile enfekte hastalarla yapılan klinik çalışmalarda paramomisin küratif olamamıştır (Merson ve Piot 2005).

Bir başka antibiyotik olan nitazoxanide geniş antiparaziter etkinliğe sahip olan bir kimyasaldır. Kimyasalın hastalık üzerine ılımlı etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Tzipori ve Ward 2002).

Kronik cryptosporidiosisli AIDS hastalarında efektif antiretroviral tedavi ishalde dramatik bir düzelme sağlayabilir. Antiretroviral tedavi kombinasyonunda reverse transkriptaz inhibitörleri ve bir ya da daha fazla proteaz inhibitörü içermelidir. HIV proteaz inhibitörleri invitro antikryptosporidyal etkinliğe sahiptir ve hayvan modellerinde enfeksiyonu %90 azaltmıştır (Merson ve Piot 2005).

Cryptosporidiosis'te tedavi ve korunma amacı ile değişik pasif veya aktif immunoterapi alternatiflerinden yararlanılabilmektedir. Bu noktada monoklonal veya poliklonal antikordardan yararlanıldığı ve hastalığı baskılayabilecekleri ifade edilmektedir (Mead 2002).

Pasif immunoterapi amacı ile en yaygın olarak denenen uygulamalardan biri immunize edilmiş hayvanlardan elde edilen kolostrumun kullanılmasıdır. İmmun kolostrum elde etmek için, kas içi yağ adjuvant ve takibinde tuz solüsyonlarında muamele edilmiş ookistler kas içi olarak verilebilmekte, hayvanlar oral olarak enfekte edilebilmekte veya meme derisine DNA aşısı tarzında etken uygulamalarından yararlanılabilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, *Escherichia coli* ve rotavirüse karşı doğumdan belli bir süre önce aşılanmış ineklerin kolostrumlarının ilgili etkenlere karşı buzağı ve fare yavrularında koruyucu etkinliğe sahip olduğu ortaya konmuştur. Cryptosporidiosis de benzer şekilde yapılan çalışmalardan sonuç alınmış fakat başarı etkenin eliminasyonundan çok ookist atılımında ve ishal şiddetinde azalma şeklinde gerçekleşmiştir. Ancak spesifik antikor içeren kolostrum ile doğar doğmaz beslenen buzağların etkenden %100 korunmasa da klinik boyutta bir hastalık tablosuna yakalanmayacağı ve gizli seyreden hafif bir reaksiyonunda bir noktada immunitayı sağlayabileceği ifade edilmektedir (Riggs 2002, Harp ve Goff 1998)

Aktif immunizasyon sağlayabilmek için liyofilizasyon ile inaktive edilen ookistler tuz solusyonu ile karıştırılıp oral olarak verilebilmektedir. Bu şekilde hazırlanan ookistlerin kuru olarak oda ısısında (18-30 °C) aylarca saklanabileceği bildirilmiştir (Harp ve Goff 1998).

Cryptosporidiosis ile mücadele amacı ile *E. coli* K99 aşılara benzer şekilde hazırlanmış rekombinant protein aşıları da denenmektedir (Nydam 2003). Ayrıca karbonhidrat bağlı bir bitkisel protein olan ve hücreler arası bağlantılarda görev alan lektin'in konak-parazit arası etkileşimde de rol alabileceği ortaya konmuş, sporozoit spesifik etkenin konak hücrelere bağlanmasını sağlayan lektin aderens faktörü saptanmıştır. Sporozoitlerin galaktosil-n-asetilgalaktozamin ve sığır müsinine maruz bırakıldığında hücrelere tutunma yetilerinin %70 azaldığı anlaşılmıştır. Aynı şekilde lektin spesifik galaktosil-n-asetilgalaktozamin veya oligosakkaritlerden bu molekülün ortaya çıkmasını sağlayan glikosidaz kullanılıncı etkenin tutunma gücü % 80 oranında azaltılabilmektedir (Carey ve ark 2004).

Bu patojenin genom yapısı, gen ekspresyonu ve regülasyonu, konakçı spesifitesi ve virülans mekanizması tam anlamıyla anlaşılmadığından yeni tedavi yöntemleri de (aşı ve yeni kemoterapiler) etkili olmamıştır. İnsanlarda hastalığa neden olan *C. parvum* tip 2 nin genom dizisi tamamlanırken tip 1 in henüz bir kısmı tamamlanmıştır. Bu iki genomun kıyaslanması mümkün olduğunda konakçı spesifitesinin ve virülans mekanizmasının da anlaşılmasının kolay olacağı düşünülmektedir (Widmer ve ark 2002).

1.11. Korunma

Cryptosporidiosis'in bulaşında önem taşımasından dolayı enfekte hayvan veya insan dışkısı ile kontamine olmuş veya olma ihtimali yüksek olan gıdaların tüketiminden ve yakın temasından kaçınmak, enfekte olma olasılığı yüksek olan havuz ve su kaynaklarına girmemek, düzenli el yıkamak ve genel hijyen kurallarına uymak hastalıktan korunma adına alınabilecek başlıca önlemlerdir.

Enfeksiyonun kontrolü yaygın olarak kullanılan amonyak, sodyum hipoklorid ve formalin gibi dezenfektanlara karşı ookistlerin dirençli olması nedeniyle kısıtlıdır. *Cryptosporidium* ookistleri canlılıklarını uzun süre dış ortamlarda devam ettirirler. Bu nedenle *Cryptosporidium* enfeksiyonlarını kontrol altına almak için çevreden ookistlerin elimine edilmesi gerekmektedir. Ookistler çevre koşullarına ve dezenfeksiyona oldukça dirençlidir. Ookistleri -20°C de 72 saat dondurmak, 45°C- 55°C de 20 dakika ısıtmak enfektivitelerini azaltır veya yok eder (Unat ve ark. 1995).

Parazit ookistlerine uygulanan dezenfeksiyon işleminde, dezenfektan maddenin çeşidi ile hazırlanan solüsyonun konsantrasyonu ve ookistlerle temas süresi önemlidir. Ookistlerin dezenfeksiyonunda en çok önerilen dezenfektan, sodyum hipokloridin %2.5'lük solüsyonudur. Ayrıca %5'lik amonyum ve %10'luk formol solüsyonunda 4°C'de 18 saat tutulduğunda ookistlerin enfeksiyon yeteneğinin kaybolduğu gözlenmiştir (Ungar 1995, Unat ve ark.1995). Kimyasallar 1 °C ve 20 °C 'de ayrı ayrı uygulandıklarında ise etkilerinin yüksek ısılarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle su ısının düşük olduğu yerlerde dezenfeksiyon amacı ile kombine uygulamaların tercih edilmesinin daha doğru olacağı bildirilmiştir. Ancak düşük ısıda bile etki edebilen, yüksek oksidatif özellikteki ozon da normal kullanım konsantrasyonunda etkisiz olup suda bromit var ise etkileşime girip kanserojen nitelikteki bromata dönüştürebilmektedir (Carey ve ark 2004).

Su arıtımında etkili olan ve herhangi bir olumsuz yönü bulunmayan filtre uygulaması, cryptosporidiosis ile mücadelede önerilen bir diğer yöntemdir. Bir mikrometre ve daha küçük genişlikte gözenekleri bulunan filtreler su arıtımında uygundur. Yapılan araştırmalar salgınlar sırasında kullanılan ev tipi filtrelerin bile belli oranda etkili olabildiğini göstermiştir (Carey ve ark 2004).

Cryptosporidiosis'den korunmada en önemli faktör immunitedir. İmmün annelerin ko1ostrumu ile beslenen yeni doğanlar enfeksiyondan korunabilmektedirler. Cryptosporidiosis'in en iyi kontrolü yeni doğanların doğumdan hemen sonra yeterince kolostrum alması

ile sağlanabilir. Hastalığa maruz kalanlar yeterli bağışıklığa sahip değilse ölüm ihtimali fazladır. Yeni doğanlar kanlarında antikor olmadan doğdukları için kendi immun sistemleri gelişinceye kadar ağızdan yeterli miktarda kolostrum almaları gereklidir. Buzağılarda yapılan bir araştırma kolostrum almayan buzağuların kolostrum alan buzağılara göre 2-4 kat daha fazla ölüm ve hastalık riski taşıdığını göstermiştir. Doğumdan sonra geçen sürenin uzamasıyla yavrunun antikorları absorbe etme yeteneği de azalmaktadır. Kolostrum almak için uzun süre beklemek daha az antikor emilimi ile sonuçlanır. Yine buzağılarda yapılan bir çalışmada doğumdan 6 saat sonra alınan kolostrumun yalnızca % 65'inin absorbe edildiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra doğumdan sonra geçen süre ile birlikte annenin kolostrumundaki antikor konsantrasyonu da azalmaktadır. Çalışmalar doğumdan kısa süre sonra annenin antikorları reabsorbe ettiğini göstermektedir. Kolostrumun memede uzun süre kalması daha az konsantrasyonda kolostrum antikor ihtiva etmesi anlamına gelmektedir. Doğumdan 16 saat sonra annenin kolostrumundaki antikor konsantrasyonu, doğumda hemen sonra mevcut olan antikor konsantrasyonunun %10'undan daha azdır. Bu sebeplerden dolayı yeni doğanların doğumdan hemen sonra mümkün olduğu kadar kısa sürede (ilk 12-24 saat) kolostrum alması gereklidir (Anderson 1982).

Cryptosporidiosis'e yakalanmaktan kaçınmak için dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda bildirilmiştir (Rennecher ve ark 2000, Robertson ve ark 2000).

- 1- İçme sularına kanalizasyon sularının karışması engellenmelidir.
- 2- Çiftlik hayvanları içme suyu kaynaklarından uzak tutulmalıdır.
- 3- Suların dezenfeksiyonu yapılırken dezenfektanlar kombinasyon şeklinde kullanılmalıdır.
- 4- Tuvaletten sonra, çocuk bezi değiştirdikten sonra veya dışkı materyali ile her ne şekilde olursa olsun eller kirlendiğinde ellerin çok iyi yıkanması gerekir.
- 5- Ağız ve ellerin dışkıyla temasından kaçınılmalıdır.
- 6- Eğer çiftlik hayvanlarıyla çalışmak zorunluluğu varsa eldiven kullanılmalı veya iş bitince eller iyice yıkanmalıdır.

7- Temizliğinden kesin olarak emin olunmayan, evsel atıkların atıldığı nehir ve göllerde yüzülmemelidir.

8- Tüm sebze ve meyveler yenmeden önce iyice yıkanmalıdır.

9- Pastörize edilmemiş içecekler ve yiyecekler tüketilmemelidir.

10- Gıdaların pastörizasyonunda ısı ve zaman parametrelerine dikkat edilmelidir.

11- Seyahat sırasında işlenmemiş ya da tam olarak filtre edilmemiş yüzey suları içilmemelidir.

12- Damıtılmamış veya pastörize edilmemiş şişe suları kullanılmamalıdır. Şişe sularının sağlık kuruluşlarınca onaylanmış olanları tercih edilmelidir.

13- İçme sularını arıtmak için polikarbon filtre kullanılmalıdır. Filtrenin tıkanmaması için belli periyotlarla bakımı yaptırılmalıdır.

14- Kaynak sularının dezenfektanı için UV ve gamma ışını uygulanmalıdır.

15- Çeşme suyunda dezenfeksiyon işleminde klor yerine ondan daha etkili ozon gibi dezenfektanlar kullanılmalıdır.

16- Gıda sektöründe çalışanlar düzenli sağlık kontrolünden geçmelidir.

17- Hastane, kreş, yurt gibi bulaşma riskinin olduğu yerlerde gerekli hijyen kurallarına mutlaka uyulmalıdır.

ABD’de bir kaynak suyundan 400.000 kişi enfekte olmuştur. Su kaynaklı epidemi nedenleri arasında parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, klora dirençli olması ve çok az sayıda parazitin dahi enfeksiyona neden olabilmesi gösterilmektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan su arıtma tekniklerinin yetersiz olduğu ve cryptosporidiosis vakalarının içme suyu ve yüzme havuzu sularından salgın şeklinde geliştiği bildirilmiştir (Ungar 1995, Topçu ve ark 2002).

Yapılan çalışmalar sonucunda *Cryptosporidium* ookistlerinin 180 ppm klor konsantrasyonunda, 25°C ve pH 7.0’de iki saat içinde öldüğü kanıtlanmıştır. Su dezenfeksiyonunda kullanılan diğer bir yöntem olan ozonlama işleminin *Cryptosporidium*

ookistleri üzerine etkisi araştırılmış, enfektivitelerinin 1ppm konsantrasyonda 10 dakika sonra ortadan kalktığı gözlenmiştir. *Cryptosporidium* ookistlerinin aynı şartlarda *Giardia* kistlerine göre ozona 30 kat, klora ise 14 kat daha fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dezenfektanlarla yapılan çalışmalar sonucunda, sulardaki parazitlerin inaktivasyonunda ozonun, klor ya da klordioksitten daha etkili bir dezenfaktan olduğu bildirilmiştir (Erickson ve Ortega 2006).

Enfeksiyondan korunmada çiftlikteki uygun bir işletim ve hijyen durumu da önemlidir. Doğum ortamı ve barınak temiz ve kuru olmalı, hayvanlar hava akımının olmadığı ancak yeterli havalandırmanın olduğu bir yerde barındırılmalı, kullanılan malzemeler sık sık temizlenmelidir. Hastalar ılık bir ortamda muhafaza edilmeli, bulaşmayı önlemek için diğer hayvanlardan ayrı bir yerde barındırılmalıdır. Semptomatik tedavi uygulanan hasta hayvanlar eğer 10 gün içinde ölmezse genellikle iyileşmekte, ancak enfeksiyon kaynağı olmaya devam etmektedirler (Sevinç 2004).

2. GEREÇ-YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İnsan dışkısı

Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji laboratuvarına gelen genellikle ishalleri 184 dışkı örnekleri toplanmıştır.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

- Dondurucu (Bosh) Toplanan dışkı örneklerinin preparatları hazırlandıktan sonra - 20 °C de saklandı.
- Mikroskop (Olympus CH40)
- Buzdolabı (Vestel BZP-L1303 W)
- 37°C su banyosu (Memmert)
- Çalkalayıcı
- Vorteks (Dragon lab MX-S)
- Santrifüj (Hettich rotina 38R)
- Elisa reader (İvymen optic system 2100-C)

2.1.3. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

- Plastik dışkı kapları
- Lam-lamel
- Rodajlı lam
- Falkon tüpü
- Otomatik pipetler
- Multipipet
- Pastör pipeti
- Sarı ve mavi pipet ucu
- Eldiven
- Gazlı bez
- Plastik Süzgeç
- Elisa kiti (IDEXX *Cryptosporidium parvum* Elisa kiti)

- Cam boncuk
- Boş küvet
- Kurutma kağıtları
- Şaleler

2.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

- Fenol Kristal (Merck)
- Karbol Fuksin (Merck)
- Metilen mavisi (Merck)
- dH₂O
- Etanol:%70 lik (Sigma Aldrich)
- Metanol (Sigma Aldrich)
- Sülfirik asit (H₂SO₄) (Fluka)
- KOH (Merck)
- İmmersiyon yağı (Merck)

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan örnekler Eylül 2012-Eylül 2013 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Hastaneye gelen ishalli dışkı örnekleri ağzı kapalı, tek kullanımlık dışkı kaplarına alınmıştır. Dışkı örnekleri 0-90 yaş aralığındaki kadın ve erkek hastalardan elde edildi. Örnekler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına getirilerek laboratuvarında makroskopik inceleme yapıldı. Dışkıların mikroskopik incelemesi yayma preparat hazırlanarak metil alkol ile tespit edildi ve Kinyonun asit-fast boyası ile boyandıktan sonra mikroskopta incelendi.

2.2.2. Kinyonun Asit-Fast Boyama Yöntemi

Cryptosporidium ookistlerini görebilmek için hazırlanan özel bir boyama yöntemidir.

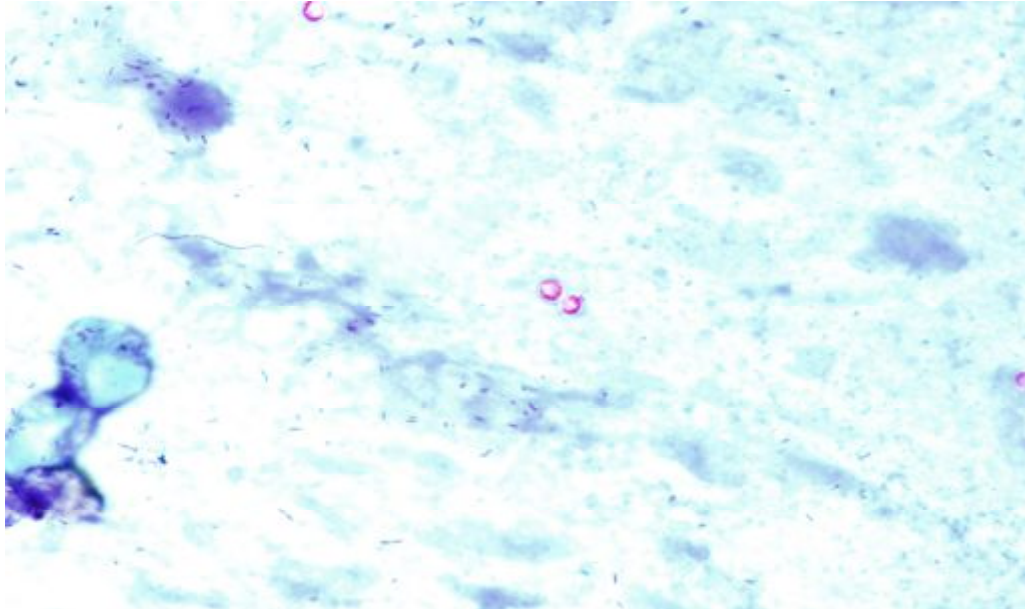
2.2.2.1. Kinyonun Carbol-Fuchsine Hazırlanması

Kinyonun carbol-fuchsine hazırlanması için 4 g Fuchsin 20 ml (%95) etil alkolde karıştırıldı. Fenol kristallerinin 56 °C’de sıcak su banyosunda erimesi sağlandı. 8 ml Fenol ile alkol-fuchsin karışımı 100 ml distile su ile tamamlayıp güneş almayan ortamda 1-2 gün bekletildi. Solüsyon süzüldü ve ihtiyaca göre saklandı.

2.2.2.2. Loeffler in Metilen Mavisini Hazırlanması

Loeffler in metilen mavisini hazırlanması için 0.3 g metilen mavisini 30 ml etil alkolde eritildi. 100 ml (%0.01)’lik KOH solüsyonu bu karışıma eklendi. Hazırlanan solüsyon ihtiyaç duyulana dek saklandı.

Laboratuvara getirilen taze dışkı örneklerinden yaymalar hazırlanıp kurutuluktan sonra hazırlanan yayma preparatlar, saf metanol içerisinde 1dakika süreyle fiske edildi. Lamlar Kinyonun Karbol-fuksin içeren şalelede 3 dakika bekletilerek boyandı. Boyanan lamalar %70 etanol içine batırılıp musluk suyunda yıkandı. Lamlar %1 lik sülfirik asit (H₂SO₄) içeren şalelede 3 dakika bekletildi. Sonrasında tekrar musluk suyunda yıkandı. Loeffler’in metilen mavisinde 5 dakika bekletilip musluk suyunda yıkandı ve kurutuldu. Kuruyan preparatlara immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta (x40, x100 büyütme objektiflerinde) incelendi. *Cryptosporidium* ookistleri mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı renkte görüldü.



Resim 2.1. Kinyonun asit-fast boyası ile *Cryptosporidium* ookistlerin x100 mikroskop görüntüsü

2.2.3. ELISA Yöntemi

Örneklerin değerlendirilmesinde *Cryptosporidium parvum* antijenlerini belirlemeye yönelik IDEXX *Cryptosporidium* ELISA kiti kullanıldı. ELISA uygulaması üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.



Resim 2.2. IDEXX *Cryptosporidium parvum* ELISA kiti

2.2.3.1. Örneğin Hazırlanması

ELISA yöntemi için -20°C’de muafaza edilen dışkı örnekleri oda ısısına getirildi. Yöntemde belirtildiği şekilde 1’er gram (veya bezelye büyüklüğünde dışkı örneği) dışkı örnekleri (184 örnek için) ayrıldı. Sonrasında 1 gram büyüklüğündeki dışkı örneklerine 1:4 (3 ml dilusyon solüsyonu) oranında dilusyon solüsyonu eklendi. Sulandırılmış örnekler vorteksenerek üstte toplanan sıvı kısım alındı ve ELISA testinde kullanılmak üzere falkon tüplere aktarıldı.

2.2.3.2. Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

20 ml konsantre yıkama solüsyonu, 380 ml deiyonize su bulunan şişeye eklendi.

2.2.3.3. Konjugat Solüsyonun Hazırlanması

1050 µl konjugat (10X), 9450 µl konjugat dilisyon buffer N.8 üzerine eklendi ve içinde partikül kalmayacak şekilde çalkalandı.

Tüm belirteçler kullanılmadan önce 18-26 °C ye getirildi ve vortekslendi. Kaplanmış plak gözlemlendi. İstenilen sayıda kuyucuk hazırlandı (pozitif ve negatif kuyucuklar için fazladan iki kuyucuk) ve plağa yerleştirildi. birinci kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, 2. kuyucuğa 100 µl negatif kontrol eklendi. Her test kuyucuğuna 100 µl hazırlanan dışkı örneğinden eklendikten sonra mikropate çalkalayıcıyla tüm kuyucuklar homojenize edilip mikropak kaplandı. 18-26°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı. Her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı. Son yıkamadan sonra kalan sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Sonrasında her kuyucuğa 100 µl konjugat solüsyonu (1/10 sulandırılmış konjugat) konuldu ve mikropak ile kaplanıp tekrar 18-26°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı. Her kuyucuğa 100 µl TMB substrat eklendi. 18-26°C de karanlık ortamda 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda çıplak gözle okuma yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Her bir kuyucuğa 100 µl stop (durdurma) solüsyonu eklendi. Mikropak hafifçe çalkalandı. Havaya karşı optik dansite 450 nm'de ELISA okuyucusunda okundu ve sonuçlar hesaplandı.



Resim 2.3. ELISA yönteminin yapılış aşaması



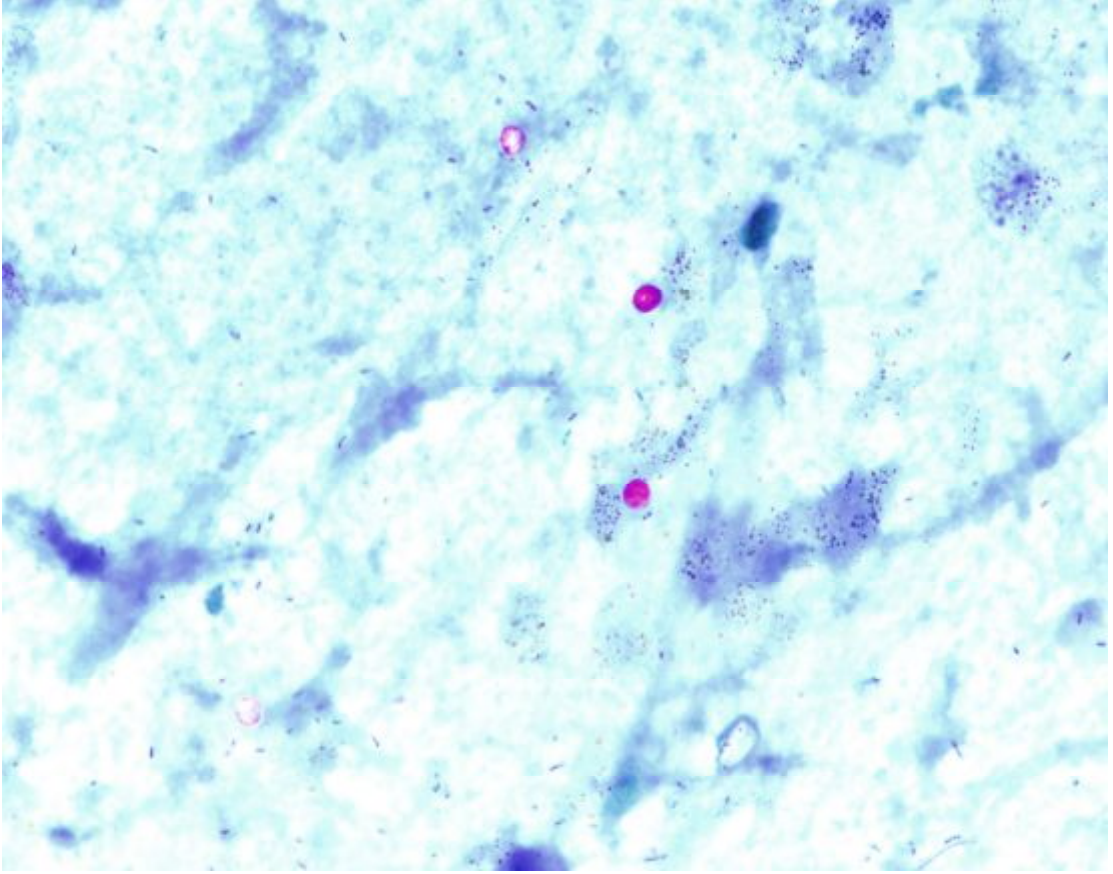
Resim 2.4. ELISA reader ile optik dansite 450 nm’de ELISA okuyucusunda okutulması

3. BULGULAR

Toplam 184 dışkı örneğinin birinde (%0.54) modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookistleri, 10'unda (%5.43) ise ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium parvum* antijenleri tespit edildi. Çalışmamızda modifiye asit-fast boyama yöntemi ile tespit edilen *Cryptosporidium* ookistleri 0-15 yaş arasında bir çocuğa aittir. Çizelge 3.1.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp.

Mikroskop inceleme	yaş aralığı	pozitif sonuç	%
Modifiye Asit-Fast Boyama (+)	0-15	1	0.54
	16-35	0	0
	36-90	0	0
	TOPLAM	1	0.54



Resim 3.1. Kinyonun asit-fast boyaması ile *Cryptosporidium* ookistleri

ELISA yöntemi ile toplam 184 dışkı örneğinin 10'unda (%5.43) *Cryptosporidium parvum* antijeni tespit edildi. ELISA test kiti prosedürüne göre pozitif ve negatif kontrol kullanılarak uygulanan yöntem ile çalışılan örneklerin bulunduğu plak ELISA okuyucusunda havaya karşı 450 nm'de okunduktan sonra elde edilen değerlerden 0.500 OD ve bu değer üstü pozitif olarak değerlendirildi. Bu pozitif olguların 6'sı 0-15 yaş grubunda, 1'i 16-35 yaş grubunda ve 3'ü de 36 yaş üstündeki grupta olduğu tespit edildi. *Cryptosporidium parvum* antijenlerinin dağılımı yaş gruplarına göre sırasıyla %3.26, %0.54 ve %1.63 olarak belirlendi (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. ELISA Yöntemi ile tespit edilen *Cryptosporidium parvum*'lu hastaların yaşlara göre dağılımı

ELISA yöntemi	yaş aralığı	pozitif sonuç	%
IDEXX <i>Cryptosporidium</i> ELISA kiti	0-15	6	3.26
	16-35	1	0.54
	36-90	3	1.63
	TOPLAM	10	5.43

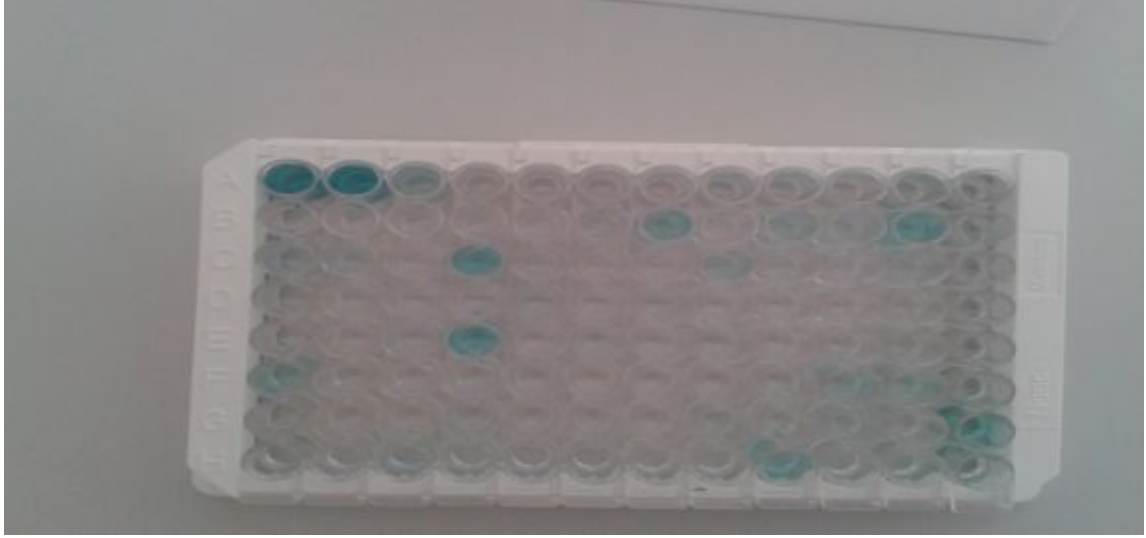


Resim 3.2. ELISA plağında pozitif ve negatif kuyuların görünümü (ilk 92 hasta)

Mikroskopik inceleme ile ELISA yöntemi karşılaştırıldığında ELISA yönteminin duyarlılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

ELISA yönteminde çıplak gözle okuma yapıldığında plaktaki pozitif kontrollere dayanarak örneklerinde mavi renklenmesini bekleriz. Negatif kontrol ise ya renksiz ya da açık

mavi şeklinde olmalıdır. Resim 3.3’de ELISA plağındaki pozitif ve negatif kuyular ve dışkı örneklerinin çıplak gözle görünümü gösterilmiştir.



Resim 3.3. ELISA plağında pozitif ve negatif kuyuların çıplak gözle görünümü

Çıplak gözle değerlendirilen sonuçlar ELISA READER ile okutuldu ve $PCX \geq 0.500$ OD pozitif sonuç olarak tespit edildi.

Hesaplamalar

PCX : Pozitif kontrol ortalaması

NCA_{450} :Negatif kontrol

S/P :Örneklerin hesaplanması

$$PCX = \frac{PC1_{450} - PC2_{450}}{2} \rightarrow \frac{PCX}{NCA_{450}} \geq 5$$
$$S/P = \frac{\text{Örnek-NC}}{PCX - NC_{450}} * 100$$

ELISA READER’da okutulan her bir örnek için yukarıdaki hesaplama ile sonuçları tespit edildi. S/P değeri %20 den küçük veya eşitse sonuç negatif, büyük ise pozitif olarak değerlendirildi.

Çizelge 3.3. *Cryptosporidium parvum*’ lu şüpheli hastalara ait bilgiler ve mikroskobi-ELISA sonuçları

HASTA	YAŞ	CİNSİYET	MİKROSKOP	ELISA
1.HASTA	7	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
2.HASTA	68	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
3.HASTA	80	KADIN	NEGATİF	POZİTİF
4.HASTA	11	KADIN	POZİTİF	POZİTİF
5.HASTA	6	ERKEK	NEGATİF	NEGATİF
6.HASTA	14	KADIN	NEGATİF	POZİTİF
7.HASTA	5	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
8.HASTA	22	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
9.HASTA	37	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
10.HASTA	13	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
11.HASTA	10	ERKEK	NEGATİF	POZİTİF
12.HASTA	24	KADIN	NEGATİF	NEGATİF

4. TARTIŞMA

Günümüzde paraziter enfeksiyonların artması kalıtsal veya AIDS, organ nakli, kanser gibi sonradan kazanılan hastalıklar ve diğer bazı sistemik hastalıklara bağlı olarak ilaç kullanımı sonunda immun yetmezlikten dolayı konağın paraziter enfeksiyonlara yakalanma ihtimali artmaktadır.

Ülkelerin gelişmişlik düzeyleri, immun sistem, kalabalık ortamlarda yaşam, hayvanlarla yakın temas, sıcak ve nemli iklim gibi faktörler *Cryptosporidium* spp. prevalansını etkilemektedir (Hunter ve Nichols 2002).

Çalışmamızda yapılan mikroskopik ve serolojik inceleme sonucunda çocuklarda cryptosporidiosis oranının daha yüksek olduğu (%3.26) tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda çocuklarda cryptosporidiosis prevalansının yetişkinlere göre yüksek olduğu ve semptomların daha şiddetli seyrettiği belirtilmektedir (Fayer 1986, Ungar 1995). Çocukluk çağında prevalansın yüksek çıkmasına, bu yaş grubunda fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması, temizlik kurallarına yeterli özenin gösterilmemesi ve immun sistemlerinin tam gelişmemiş olması en önemli nedenler olarak gösterilmiştir (Current ve Bick 1989).

Türkiye'nin değişik bölgelerinde insanlar üzerinde yapılan araştırmalarda farklı sonuçlara rastlanmaktadır. İzmir'de 0-6 yaş grubunda 600 çocuğa ait dışkı örnekleri Modifiye Ritchie yöntemi ile hazırlanarak Auramine ve Ziehl-Neelsen yöntemleriyle boyanmış ve çocukların %0,1'inde ookist saptandığı bildirilmiştir (Üner ve ark. 1991). Ankara'da neoplastik 106 hastaya ait dışkı örnekleri Ziehl-Neelsen ve Giemsa ile boyanmış ve hastaların %16,9'unda *Cryptosporidium* ookistleri görüldüğü belirtilmiştir (Tanyüksel ve ark. 1995). Eskişehir'de 0-6 yaş grubu ishalleri 607 çocuğa ait dışkı örneği nativ inceleme, gram, giemsa, Ziehl-Nelsen, modifiye kinyon yöntemleri kullanılarak incelendiğinde çocukların %3,6'sında *Cryptosporidium* ookistleri teşhis edildiği bildirilmiştir (Doğan ve Akgün 1998). Elazığ'da 0-5 yaş grubu ishalleri 417 çocuğa ait dışkı örnekleri modifiye Ziehl-Neelsen yöntemiyle (sıcak metod) boyanarak hastaların %4,55' inde *Cryptosporidium* sp. ookistlerinin saptandığı bildirilmiştir (Gödekmerdan ve ark. 1999). Bizim yaptığımız çalışmada da mikroskopik bakı ile bulunan pozitiflik onbir yaşındaki bir çocuğa aittir.

Van belediye mezbahasında 2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise 87 mezbaha işçisinde modifiye asit fast yöntemi ve quick *Cryptosporidium parvum* strip testi

(RIDA®RBIopharm, Almanya) kullanılarak *Cryptosporidium* spp. ookistleri araştırılmıştır. İşçilerin %1,14'ünde *Crptosporidium* spp. ookisti tespit edilmiştir. Çalışmalarda boyama yöntemi olarak *Crytosporidium* için spesifik olan modifiye Ziehl-Neelsen kullanılmıştır. Çıkan sonuçlar doğrultusunda cryptosporidiosis'in, bir meslek hastalığı olarak veteriner hekimlerde, Veteriner Fakültesi öğrencilerinde, çiftçilerde tekrarlayan hafif veya asemptomatik enfeksiyonlar şeklinde görülebileceği bildirilmiştir (Çiçek ve ark. 2008). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda 2011 yılında yapılan çalışmada, yaşları 0-15 arasında olan ishalleri 450 hastaya ait dışkı örnekleri modifiye asit fast boyama yöntemi ile parazitolojik yönden incelenmiştir. Dışkı örneği incelenen 450 çocuğun 10 (%2,2)'unda *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada dışkı örneklerine sırasıyla nativ-lugol, formol-etil asetat ile sedimantasyon yöntemleri ve trichrome boyama yöntemi uygulanmış ve çocukların 154 (%34,2)'ünde bir veya daha fazla, 34 (%7,5)'ünde ise birden fazla parazit türüne rastlandığı belirtilmiştir (Çiçek ve Yılmaz 2011).

Kütahya'da Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne karın ağrısı, mide bulantısı, kusma ve ishal gibi çeşitli gastrointestinal sistem şikâyetlerle müracaat eden hastalarda cryptosporidiosis araştırılmıştır. Araştırma süresince evlerden ve şehirdeki çeşmelerden alınan su örnekleri *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden incelenmiştir. Cryptosporidiosis mikroskopik yöntemle %2.7, spesifik antijen aranmasıyla %3.4 oranında saptanmıştır. Araştırmacıların bildirdiklerine paralel olarak ELISA testinin duyarlılığının yüksek olması bir olgunun fark edilmesini sağlamıştır (Akdemir 2012). Yaptığımız bu çalışmamızda mikroskopik bakıda 184 hastadan alınan dışkı örneklerinde boyamada bir pozitif saptanırken, ELISA ile yapılan analizler sonucunda 10 pozitif bulunmuştur. Dolayısıyla *Cryptosporidium* ookistlerinin saptanmasında ELISA testinin daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda karasal iklim özelliklerinin etkenin canlılığını sürdürebilecek şartları kısıtladığı ve yayılımı azaltan bir bariyer oluşturduğu görülmüştür. Şehir şebekesinden alınan örneklerde ookist tespit edilmemiş ancak halkın kullanımına açık çeşmelerden temin edilen örneklerin bir tanesinde (%10) ookist saptanmış olmasının alt yapı imkânlarının nispeten iyi olduğunu, hastalığın epidemiyolojisinde şehir merkezindeki muhtelif yerlerde bulunan halk çeşmelerinin rolü olabileceği ve içme suyu dışında başka faktörlerin de olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmada erkek ve kadın dışkılarının cryptosporidium ookistleri bulundurma oranları arasında bir fark olup olmadığını belirlemek

için ki-kare analizi yapılmıştır. Elde edilen bulgular araştırmacıların bildirdiklerine benzer değerlendirilmiş, olgulardaki yaş ve cinsiyet farklılıkları anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Mikroskopik incelemede etkenlerin gözden kaçabilme ihtimaline karşın, laboratuvar imkânlarının elverdiği ölçüde cryptosporidiosis'i düşündüren vakalarda dışkının serolojik yöntemle incelenmesinin uygun olacağı ve il genelinde bütün su kaynak/atıklarında, tüketilen yaş sebze/meyvelerin yıkama sularında moleküler tabanlı tanı yöntemleriyle ookist saptayacak çalışmaların planlanması gerektiği düşünülmektedir (Akdemir 2012). Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise 184 dışkıda yapılan incelemelerde cinsiyet farklılığı anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Ankara'da yapılan başka bir çalışmada ise 345 ishali hastada çeşitli yöntemler (modifiye asit-fast, kinyoun asit-fast, asit-fast trichrome) kullanılarak *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin arandığı fakat hiçbir örnekte ilgili etkene rastlanmadığı tespit edilmiştir. Toplanan dışkı örneklerinden etkeni bulundurma ihtimali yüksek olan 159 tanesi seçilip ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin varlığı araştırılmış ve 6 tanesinde (%3.8) pozitif olarak bulunmuştur. ELISA yönteminin özel eğitim görmüş personele ihtiyaç göstermemesi, kolay ve hızlı uygulanabilmesi ile mikroskopik yöntemlere göre daha duyarlı ve spesifik olduğunu görülmüş olup mikroskopik yöntemlere iyi bir alternatif olduğu düşünülmüştür (Okay 2006). Benzer şekilde de bizim çalışmamızda 184 dışkı örneğine ELISA yöntemi uygulanmış ve sonuç olarak 10 (%5.43)'unda *Cryptosporidium parvum* varlığı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak Adnan Menderes Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalına dışkısı gelen hastaların bu bölgede *Cryptosporidium parvum* araştırılması amacıyla yaptığımız bu çalışmada 184 kişiye ait dışkı örneğinden mikroskopik bakı sonucunda onbir yaşındaki çocuğa ait bir tane pozitif sonuç tespit edildi. Daha duyarlı olan Serolojik yöntem olarak ELISA testi yapıldı. Hastaların 10 'unda *C. parvum* türü saptanmış olup, elde ettiğimiz *Cryptosporidium* ookist oranı %18.4 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu oran, yöremizdeki parazitoz sorununu bir kez daha göstermektedir. Bu çalışma, çocuklarda ve diğer risk grupları için, ishale seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium* spp.'nin enterik patojen olarak önemsinmesi ve ayırt edici tanıya gidilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Dışkıda özgül antijen arayan ELISA yönteminin maliyeti yüksek olmasına rağmen etkensel tanı yöntemlerindeki zorluklara yardımcı olacağı sonucu çalışmamızda elde edilmiştir. Günümüz koşullarında tek başına mikroskopik bakı tanı için yetersiz kalmakta, ikinci bir doğrulama testi olarak ELISA yönteminin rutinde kullanılmasının daha uygun olacağı kanısına varılmıştır ve bölgemizde fazla örnek sayısı ile daha kapsamlı çalışma yapılması gerektiği önerilmektedir.

ÖZET

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ'NE GELEN HASTALARDAN ALINAN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. VARLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI VE ELISA İLE ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'na gelen dışkılarda *Cryptosporidium* ookistleri araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda Eylül 2012 - Eylül 2013 tarihleri arasında yapılmıştır.

Çalışmada, ADÜ Parazitoloji Laboratuvarı'na hastanenin farklı birimlerinden gelen ishalleri dışkı örneklerinden 184 adet dışkı ağzı kapalı tek kullanımlık dışkı kaplarına alındı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na getirilen dışkıların laboratuvarında parazitolojik incelemesi yapıldı. Daha sonra *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisi için, Kinyonun asit-fast boyası ile boyandı ve mikroskopta incelendi. Örnekler mikroskopta incelendikten sonra ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium parvum* antijeni tespit edildi. ELISA yöntemiyle incelenen dışkı örneklerinin 10'unda (%5.43) *C. parvum* ookistleri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, *C. parvum* semptomatik ishal olgularında önemli bir etkidir. Bu yüzden risk grupları bu parazit yönünden dikkatle incelenmelidir. Asit-fast boyama tanı için yeterli olmayabilir. Çalışmalar eğitimli personelle dikkatle yapılmalıdır. Bunun yanında ELISA yöntemi kolay ve hızlı uygulanabilmesi ile mikroskopik yöntemlere göre daha duyarlı ve spesifik olduğu görülmüş olup, mikroskopik yöntemlere iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler; *C. parvum*, Elisa, Cryptosporidiosis

SUMMARY

RESEARCHING THE PRESENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP BY MICROSCOPICAL INSPECTION AND ELISA AT THE FAECES SAMPLES GOTTEN FROM THE PATIENTS AT ADNAN MENDERES UNIVERSITY APPLICATION AND RESEARCH HOSPITAL

In this study, investigation of *Cryptosporidium* oocysts at the patients came to Adnan Menderes University Application and Research Hospital was aimed. Study has been achieved at Parasitology Laboratory of Adnan Menderes University Application and Research Hospital between September 2012-September 2013.

In this study 184 of all faeces samples with diarrhea came from different units of hospital to ADU Parasitology laboratory were put in disposable faeces cups. These samples belong to 0-90 ages of male and female patients. The parasitological investigation of the samples brought to laboratory of Department of Parasitology in ADU Veterinary Medicine School has been done at the parasitology laboratory. Then to diagnose the cryptosporidium oocysts stained with Kinyoun acid-fast stain and examined by microscope. After microscope examining *Cryptosporidium parvum* antigens were determined with ELISA method. *C. parvum* examination oocysts were found at 10 of the samples (18.4%).

As the result, *C. parvum* is an important factor at the symptomatic diarrhea cases. For this reason the risk groups must be examined with regards to parasite conscientiously. Acid-fast paint may be obviation for diagnosis. Exercises may carry out conscientiously with trained staff. Beside this its shown that ELISA method is more sensitive and specific than microscopic methods with easy and fast application and had been thought that its an alternative to microscopic methods.

Keywords; *C. parvum*, ELISA, Cryptosporidiosis

KAYNAKLAR

- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V, Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science, Apr 2004; 16, 304 (5669), 441-5
- Akdemir C. Türkiye cryptosporidiosis' in serolojik ve mikroskopik tespiti ve içme sularının ookist yönünden incelenmesi. Dumlupınar Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Kütahya, 2012.
- Akısü Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Ed Özcel MA. Tıbbi Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi, Yayın No:20. İzmir, 2005; 40-41
- Alpert G, Bell LM, Kirkpatrick CE, Budnick LD, Campos JM, Friedman HM, Plotkin SA. Outbreak of Cryptosporidiosis in day care center, *Pediatrics* 1986; 77 152-157.
- Altıntaş K. Tıbbi Genel Parazitoloji ve Protozooloji; 1997. s. 167-170.
- Altıntaş, K. Tıbbi Parazitoloji, Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları; 2002. s. 170- 172.
- Al-Braiken FA, Amin A, Beeching NJ, Hommel M, Hart CA. Detection of *Cryptosporidium* among diarrhoeic and asymptomatic children in Jeddah, Suudi Arabia. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 505-510.
- Al-Qubaji M. İshalli çocuk dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookist'lerinin araştırılması. Ankara Üniv. Sağ. Bil. Enst. Doktora tezi. 2005.
- Anderson BC. Cryptosporidiosis: A Review *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 1982; 180: 1455-1457.
- Arrowood MJ. Diagnosis. İn: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer (ed). Crc press-us; 1997. s. 43-64.
- Arrowood MJ. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* spp. *Clin mikrob rev* 2002; 15 (3)390-400.
- Ash LR, Orihel TC. *Atlas of Human Parasitology*. Third Edition, Chicago: ASCP Pres; 1990. s. 94-95
- 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. *Parasitol. Res*, 1998; 84: 297-301.
- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Methods for idenfication of etiological agents of infectious disease. İn: *Diagnostic Microbiology* 9 th ed. London: Mosby Year Book, 1994, 792.

- Berger SA. Human Parasitic Diseases Sourcebook. Jones and Bartlett Publishers; 2006. s.116-121.
- Bonilla LC, Gzanpa N, Cano G, Raleigh X, Quijada L. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulia State, Venezuela, *J. Trop. Med. Hyg.* 1992; 47(5) 582-586.
- Butler BJ, Mayfield CI. *Cryptosporidium* spp. - A Review of the Organism, the Disease, and Implications for Managing Water Resources, Waterloo Centre for Groundwater Research, Waterloo, Ontario, Canada. 1996.
- Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 2005; 21: 430-437.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.*, 2004; 38:818-862.
- Casemore DP. Epidemiological aspects of human Cryptosporidiosis. *Epidemiol Infect Dis.* 1991; 104: 1-28.
- Current WL, Bick PH. Immunology of *Cryptosporidium* sp. *Pathol Immunopathol Res* 1989; 8: 141-160.
- Current WL. Human *Cryptosporidiosis*, *N. Engl. J. Med.* 1983; 309: 1326-1327.
- Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 325-58.
- Choi MH, Hong ST, Park WY, Yu JR. In vitro culture of *Cryptosporidium muris* in human stomach adenocarcinoma cell line. *Korean J.Parasitol.* 2004; 42(1):27-34.
- Clayton F, Heller T, Kotler DP. Variation in the enteric distribution of *Cryptosporidia* in acquired immunodeficiency syndrome, *J. Clin. Pathol.* 1994; 102: 420-425.
- Çetinkaya F. *Cryptosporidium parvum*'un Bulaşmasında Su ve Gıdaların Rolü. *Uludağ Üniversitesi Vet. Fak. Der.*, 2004; 23(1-2-3) 103-109.
- Çiçek M, Körkoca H, Gül A. Van Belediye Mezbahasında Çalışan İşçilerde ve Kesimi Yapılan Hayvanlarda *Cryptosporidium* sp.'nin Araştırılması *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2008; 32 (1): 8-11.
- Çiçek M, Yılmaz H. İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve diğer barsak parazitlerinin yaygınlığı. *Dicle Tıp Dergisi.* 2011;38(1): 70-75.
- Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection.* 2002; 4: 1059-1066.

Direkel Ş, Özerol İ, Durmaz R. İshalli Hastalarda *Cryptosporidium parvum*' un ELISA Ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemleriyle Araştırılması-Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya 2011; 38 (1) 70-75.

Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, Lechevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(8):3427-3432.

Doğan N, Akgün Y, İshalli olgularda *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 1998; 22: 243-246.

Doung TH, Dufillot D, Koko J, Nze Eyo's R, Thulliez V, Richard LD, Kombila M. Digestive Cryptosporidiosis in young children in an urban area in Gabon Sanre, 1995; 5(3), 185-8

Döşkaya M. Dayangaç N. Kuman HA. *Cryptosporidium parvum*. *T Parazitol Derg* 2003; 27: 64-70.

Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, Boca Raton, 1990. s. 199.

Dupont C, Bounoux ME, Turner L, Rouveix E, Dorra M. Microbiological findings about pulmonary cryptosporidiosis in two AIDS patients. *J. Clinical Microbiol.* 1996; 34(1): 227-229.

Erickson MC, Ortega YR. Inactivation of protozoan parasites in food, water and environmental systems, *J. Food Prot. Rev.* 2006; 69(11), 2786-808.

Fahey TMD. Cryptosporidiosis. *Infectious Disease Update*, 2003; 10(2) 75-80.

Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *App. and Env. Microbiol* 1997; s.1076-1074.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol*, 2000; 30: 1305-1322.

Fayer R, Ungar BLP. *Cryptosporidium* sp. And Cryptosporidiosis. *Microbiol Reviews* 1986; 50: 458-483.

Garcia LS, Special stains for Coccidia and Cyanobacterium-Like bodies: Modified Ziehl-Neelsen acid-fast stain (Hot).In. Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Washington DC, 1992, 7.4.2.1.

Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3337-3340.

Gasser RB, O'Donoghue P. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29:1379-1413.

Goldoft MJ, Todd D. Cryptosporidiosis. *Epitrens*, 2008; 13(7): 1-4.

Gödekmerdan A, Kalkan A, Özkeklikçi A, Erensoy A, Kılıç SS, İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* görülme sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg*, 1999; 23: 122-125.

Guerrant RL, Principles and syndromes of enteric infections. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed, Churchill Livingstone Inc., New York, 1995; 945- 962

Graaf CD, Vonopdenbosch E, Ortaga-More LM, Abbasi H, Peters J. A review of the importance of Cryptosporidiosis in farm animals, *Int. J. Prasitol* 1999; 29: 1269-1287.

Griffiths KJ, Balakishnan R, Widmer G, And Tzipori S. Paromomycin and Geneticin Inhibit Intracellular *Cryptosporidium parvum* without Trafficking through the Host Cell Cytoplasm: Implications for Drug Delivery. *Infection and Immunity*. 1998; s. 3874-3883.

Gün H. İntestinal parazitozlar. Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, ed. *İnfeksiyon Hastalıkları*'nda. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996; s: 630-40.

Gün H, Tanyüksel M, Haznedaroğlu T. Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması. *T. Mikrobiyol. Cem. Derg.* 1994; 24, 116-119.

Harp JA, Goff JP. "Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves", *J. Dairy Sci.* 1998; 81, 289-294

Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 145-154.

Janoff NE, Reler BL. *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25 (6), 967- 975

Jenkins MC, Trout J, Abrahamsen MS, Lancto CA, Higgins J, Fayer R. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *J. Microbiol. Methods.* 2000; 43:97-106.

- Jiang J, Xiao L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *Eukaryot mikrobiol* 2003; 50 s.542-7.
- Jokipii L, S Pohjola, Valle SL, Jokipii AM. Cryptosporidiosis associated with traveling and giardiasis, *Gastroenterology* 1985; 89: 838-842.
- Kar S. *Cryptosporidium parvum*'un hücre kültüründe üretilmesi ve üremenin farklı yöntemlerle belirlenmesi. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri enstitüsü, 2007.
- Korkmaz M, Ok Ü. Parazitolojide laboratuvar, yayın no:23 Meta basım İzmir, 2011.
- Köktürk O. Parazit Hastalıkları Grup Bask. Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, *Toraks Derg*, Cilt 3, Ek 5. 2002.
- Köse M, Alcantara C, Lima AAM, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an update. *Lancet* 2001; 1: 262-269.
- Krause W, Abraham A, Lehman D. Evidence of *Cryptosporidium* in children with symptomatic enteritis from the Leipzig. *Appl Parazitol*, Feb. 1995; 36(1), 66-71
- Laberge L, Griffiths MW. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *Int J Food Microbiol*. 1996; 32 (1-2), 1-26
- Leav BA, Mackam, Ward HD. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clin infect Dis*, 2003; 36(7) 903-8.
- Lechevallier MW, Norton WD, Lee RG. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. In Surface Water Supplies. *Appl. Environ. Microbiol*. 1991; 57,2610-2616
- Levine ND. *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, USA. 1985. s. 413.
- Limor JR, LAL AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40(7):2335-2338.
- Lindsay ME, Holaska JM, Welch K, Paschal BM. And Macara IG. Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol* 2000; 153, 1391-1402.
- Mackenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply, *N Engl J Med*. 1994; 331: 161-167.
- Macpherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol*. 1993; 31(2):198-202.

Martino P, G. Gentile, A. Caprioli, L. Baldassori, G. Doneli, W. Arcese, S. Fenu, A. Micozzi, M. Venditti, F. Mandelli Hospital-acquired Cryptosporidiosis in a bone marrow transplasion unit, *J. infect. Dis.* 1998; 158: 647-648.

Mead JR. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2002; 5: 47-57.

Mehlhorn H, Piekarski G. *Grundriss der Parasitenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 6. Auflage, 2002; s.516.

Merson MH, Piot P. " Acquired Immünodeficiency Syndrome" .Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (eds.). " *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases* " kitabında.New York, Livingstone; 6. baskı. 2005; s.1465-1720.

Miller DL, Liggett A, Radı ZA, Branch LO. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Vet. Parasitol.* 2003a; 115: 199-204.

Miller SA, Rosaria CL, Rojas E, Scorza KV. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health* 2003b; 8: 342-347.

Moolasart P, Eampokalap B, Ratanasrithong MM, Kanthasing P, Tansupaswaskul S, Tanchanpong C. CRYPTOSPORİDİOSİS in HIV infected patients in Thailand. *Southern J Trop Med Pub Healty*, 1995; 26: 335-338.

Morgan UM, Thompson RCA. PCR detection of *Cryptosporidium*: The way forward?. *Parasitol. Today*. 1998; 14:s. 469.

Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA. *Cryptosporidium hominis* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *J Eukaryot Microbiol* 2002; 49: 433-440.

Mülazımoğlu L, Vahapoğlu H, Gürgün Ö, Yıldırım, Semerci, Taşer B. Beş yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı. *Tıbbi Mikrobiyal. Cem. Derg.* 1993; 23:113-115.

Mtombo MMA, Nash AS, Blewett DA, Wright S. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. *Vet. Parasitol.* 1992; 45:49-57.

Naciri M, Mancassole R, Yvore P, Peeters JE. The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves, *Vet. Parasitol.* 1993; 45, 199-207.

Norman JP, Fernando JB, Slemenda SB, Silva A, Moura NS, Arrowood M, Ditrich O and Addiss D. New *Cryptosporidium* Genotypes in HIVInfected Persons. *Emerging Infectious Diseases*. 1990;5, 3, 1-6. Odonoghue, PJ. *Cryptosporidium* Infections in Man, Animals, Birds and Fish. *Aust Vet. J.* 1985; 62, 253-258.

- Nydam D. Calves with cryptosporidiosis can be frustrating: Is there a treatment? Ministry of Agriculture and Food. Correll Univ, 2003 s:1-2.
- Ok Ü, Yereli K. Parazitoloji laboratuvarlarında sık kullanılan dışkı inceleme yöntemlerinin değerlendirilmesi. Türk Parazit Derg, 1996; 20, 285-292.
- Okay GE. HIV/AIDS Hastalarında ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* türlerinin sıklığının araştırılması. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık tezi, İstanbul, Türkiye, 2006.
- Oktun M, Yüce K. İzmir bölgesinde ishallerde dört bakteriyel etken:Salmonella türleri, Shigella türleri, Enteropatojen E .coli ve ısıya duyarlı toksin üreten enterotoksinojen E.coli Inf. Gerg., 1995; 9(4), 357-360
- O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int J Parasitol 1995; 25: 139-195.
- Over U. İshalle seyreden hastalıklarda *Cryptosporidium*'un rolü ve sağlıklı populusyonda seroprevalansı. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. 1996.
- Özcel MA, Altıntaş N. Parazit hastalıklarında tanı, Türkiye Parazitoloji Derneği, yayın no,15, 1997.
- Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22. İzmir: 2007; s.363-376.
- Özçelik S, Dökmetaş S, Sümer Z, İçağasıoğlu D, Dökmetaş İ. Gastroenteritlerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı, T. Parazit Derg. 1996; 20(3) 333-33.
- Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg. Inf. Dis.* 2001; 7(1):49-56.
- Pettoello- Mantovani M, Di Martino L, Dettori G, Vajro P, Scotti S, Guandalini S. Asymptomatic Carriage of Intestinal *Cryptosporidium* in Immunocompetent and Immunodeficient Children: A Prospective Study, *Pediatric Infectious Disease.* 1995; 14(12),1042 -1047
- Plorde JJ. Cryptosporidiosis. İn: medical microbiology. An introduction to infectious diseases, sherris JC (ed). Elsevier. New york, 1990; s: 717-720.
- Rennecher JL, Driedger AM, Rubin SA, Marinas BJ. Synergy in sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* with ozone / monochloramine. *Wat. Res.* 2000; 34(17), 4121- 4130

- Riggs MW. Recent advances in cryptosporidiosis: the immun response. *Microbes Infect* 2002; 4: 1067-1080.
- Robertson LJ, Paton CA, Campbell AT, Smith PG, Jackson MH, Gilmour RA, Black SE, Stevenson DA, Smith HV. Giardia cycts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment Works Scotland, UK.Wat.Res., 2000; 34 (8), 2310- 2322
- Rossignol JF. Cryptosporidium and Giardia: treatment options and prospects for new drugs, *Exp Parasitol*, 2010; 124(1) 45-53.
- Sarıkaya R. *Cryptosporidium* Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme, *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Yayını*, cilt 5, sayı 2. 2004.
- Saygı G. İnfeksiyöz ishallerde bağırsak parazitolojilerinin önemi ve yurdumuzdaki durumu VIII.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı, 06-10 Ekim 1997, s: 224-271
- Saes-Liorens X. Sipramycin treatment of *Cryptosporidium enteritis*, *J. Infect. Disease* 1989; 160, 342-343.
- Sears CL, Kirkpatrick BD. Cryptosporidiosis and isosporiosis. İn: Principles and Practice of Clinical Parasitology. John Wiley & Sons Ltd. Press. 2001; s.139-164.
- Sevinç F. Ruminantlarda Cryptosporidiosis. *Vet. Bil. Derg.* 2004, 20(4): 79-84
- Soave R, Weikel CS. Cryptosporidium and other protozoa including *Isospora*, *Sarcocystis*, *Balantidium coli* and *Blastocystis*, Principles and practice of infectious diseases, 3rd Edition, Ed. Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, Churchill Livingstone Inc. New York: 1990; s: 2122-2130.
- Smith A, Reacher M, Smerdon W, Adak GK, Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003, *Epidemiol. infect.* 2006; 134(6), 1141-9.
- Spano F, Crisanti A *Cryptosporidium parvum*: The many secrets of a small genome, *Int. J. Parasitol* 2000; 30: 553-565
- Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan UM, Le Blanco SM, Tchack L, Tzipori S. and Widmer G. Multilocus analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36, 3255- 3259.
- Starling CR, Arrowood MJ. *Cryptosporidia*. İn: Parasitic Protozoa, vol.6. Academic Press 1993; 65: 159-224.

- Şener B, Ergüven S, Ercis S. 1980-1996 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi parazitoloji laboratuvarında dışkıının parazitolojik inceleme sonuçları. *Tıbbi parazitoloji Dergisi* 1997; 22(1): 37-40.
- Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H. Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* sp. araştırılması, *Türkiye Parazit Derg*, 1995; 19: 56-63.
- Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi cilt.2, Nobel tıp Kitapevi, 2002; s: 1919-1920.
- Tyzzer EE. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et. Sp. Nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res* 1910; 23: 394-413.
- Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a Coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd* 1912; 26: 394-412.
- Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002; 4: 1047-1058.
- Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samaştı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayın: 15. 1995; s. 595-600.
- Ungar BLP. Infectious Diseases and Their Etiologic Agents, volume 2, section H, in Principle and Practise of infectious Diseases Editors, Mandell GL, Bennet JE. Dolin R, 4 Ed, Churchill livingstone, New York. 1995.
- Uyar Y, Özkan AT. Amebiyazis, Giardiyazis ve Kriptosporidiyazis Tanısında Antijen Tarama Yöntemlerinin Yeri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2009; 33 (2): 140 – 150.
- Ülgen Z, Balcıoğlu İC. CRYPTOSPORİDİOSİS. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. *Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22 İzmir: 2007; s.363-376.*
- Üner A, Daldal N, Özbek Y, Tappeh KH. Çocuklarda *Cryptosporidium* aranması. *Türkiye Parazit Derg*, 1991; 15: 42-48.
- Widmer G, Orbach EA, Tzipori S. β -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *App. And env. Mikrobial* 1999; 65(4): 1584-1588.
- Widmer G, Lin L, Kapur V, Feng X and Abrahamsen SM. Genomics and Genetics of *Cryptosporidium parvum* :the Key to understanding Cryptosporidiosis. *Microbes and infection*, 2002, 4: 1081-1090.
- Wittenberg DF. Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: Results of a double-blind randomized trial, *J. Infect. Disease* 1989;159(1), 131-132.
- Wolfson JS, Richter JM, Waldron MA, Weber DJ, McCarthy DM, Hopkins CC. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients, *N Engl, J Med*. 1985; 312: 1278-1282.

- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct. *Trop. Med. and Health.*, 2004; 32(1):5-14
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaİman I, Escalante AA, Montalı RJ, Fayer R, Lal AA. Polygenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the Small-Subunit rRNA gene locus. *App. Env. Microbiol.* 1999a; 64(4):1578-1583.
- Xiao L, Morgan UM, Lİmor J, Escalante A, Arrowood M, Shulow W, Thompson RCA, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *App. Env. Microbiol.* 1999b; 65(8):3386-3391.
- Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species an sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a Small- Subunit rRNA based diagnostic and genotyping tool. *App. Env. Microbiol* 2000; 66(12) 5492-5498.
- Yetkin M.A. Immun yetmezlikli hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, 1998.
- Yücel A. *Cryptosporidium* spp. ve parazitliğı. Töreci K,ed. Ülkemizde yeterince incelenmeyen enterik patojenler. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 1989; s. 89-102.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında MUĞLA/Milas'ta doğdum. İlk-orta ve lise eğitimlerimi Milas'ta tamamladım. Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2010 yılında mezun oldum. Üniversitenin Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının çeşitli bölümlerinde biyolog olarak çalıştım. ADÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladım. Halen Aydın Ticaret Borsası Özel Gıda Kontrol Laboratuvarında biyolog olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımını esirgemeyen, her konuda destek alabildiğim, hayata yaklaşımıyla bana örnek olan, bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan değerli danışmanım Doç. Dr. Nuran AYSUL' a teşekkür ederim.

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında ELISA yönteminde yardımcı olan ve imkan sağlayan Sayın Yard. Doç. Dr. Nural EROL' a ve Araş. Gör. Gamze Sevri EKREN' e, tez çalışma numunelerinin temininde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sema ERTUĞ'a, laboratuvar arkadaşlarım Hakan ÜNLÜ ve Emrah ŞİMŞEK'e, beni bugünlere getiren, her kararında yanımda olan varlıklarından güç aldığım annem Neşe KARAOĞLAN, babam Namık Mehmet KARAOĞLAN ve kardeşim Pınar İMRAĞ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın en başından beri yardımlarını esirgemeyen, bilimsel duruşu ve becerisiyle beni motive eden eşim Varol DEVECİ ve kızım Almira Beste Deveci'ye hayatımda oldukları için teşekkür ederim.