

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

HIV POZİTİF BİREYLERİN DİŞKİ ÖRNEKLERİNDE
CRYPTOSPORİDİUM SP'NİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

KEVSER ATALIK

DANIŞMAN
PROF. DR. YAŞAR ALİ ÖNER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

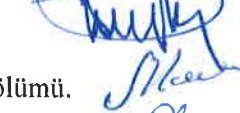
İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Kevser Atalık tarafından hazırlanan HIV Pozitif Bireylerin Dışkı Örneklerinde Cryptosporidium Sp'nin Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

02 / 09 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr Y.Ali Öner (Danışman)	İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	
2.Prof Dr Bekir Kocazeybek	Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	
3.Prof Dr Adil Allahverdiyev	Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü.	
4.Prof Dr Özgür Kurt	Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
5.Prof Dr Hrisi Bahar Tokman	Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Kevser Atalık

Anneciġime ithafen...



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezimin tüm aşamaları süresince değerli bilimsel ve mesleki tecrübesinden yararlandığım, sevgili hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Yaşar Ali Öner'e değerli yardımları, önerileri, katkıları ve bana her zaman göstermiş olduğu anlayış, hoşgörü ve desteğinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İhtiyaç duyduğum anlarda ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfıdana'a içtenlikle teşekkür ederim. Yetişmemde emekleri geçen ve doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimlerinden faydalanma olanağı bulduğum İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri ve yardımcılarına teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin her aşamasında deneyimlerini benimle paylaşan ve her zaman öneri ve yardımlarıyla yanımda olan Dr. Hayriye Kırkoyun Uysal'a, örnek toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nden Sayın Dr. Taner Yıldırım, Sayın Dr. Funda Şimşek ve Sayın Dr. Arzu Kantürk'e, tezimin istatistik analizleri konusunda yardımlarını esirgemeyen ve bana destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Halim İşsever'e, bilimsel birikimi ve önerileri ile bana rehberlik eden, desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bekir Kocazeybek'e ve her zaman, her durumda bana gösterdiği olağanüstü anlayış, yardım ve fedakarlık ile "böyle insanlar da varmış" dedirten Dr. Timur Koloğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca beni her zaman her konuda destekleyen, sevgisiyle sarmalayan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve sayesinde bugün olduğum kişi olduğum biricik annem Türkan Karaman'a; beni hayata sıkı sıkı hazırlayıp gücüne güç katan, beni bugünlere getiren sevgili babam Fuat Karaman'a; zor zamanlarda gösterdiği anlayışla beni şaşırtan ve rahatlatan, bana her zaman destek olan, olmazsa olmazım, canım kardeşim Emel Sefayi'ye; gösterdiği anlayış ve yardımlar için üç sene önce karşıma çıkıp hayatımın neşesi olan sevgili eşim Koray Atalık'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 16121

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. TARİHÇE.....	2
2.2. TAKSONOMİ	3
2.3. MORFOLOJİ	5
2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ	6
2.4.1. EKSKİSTASYON DÖNEMİ:	6
2.4.2. MEROGONİ DÖNEMİ:	7
2.4.3. GAMETOGONİ DÖNEMİ:	9
2.4.4. DÖLLENME DÖNEMİ:.....	10
2.4.5. OOKİST DÖNEMİ:.....	10
2.4.6. SPOROGONİ DÖNEMİ:.....	11
2.5. BULAŞ YOLLARI VE KORUNMA	11
2.6. PATOJENİTE	12
2.7. İMMÜNİTE	13
2.8. EPİDEMİYOLOJİ.....	15
2.8.1. ÜLKEMİZDEKİ DAĞILIŞI.....	18
2.8.2. DÜNYADAKİ DAĞILIŞI	18
2.9. KLİNİK	20
2.10. TANI	22

2.10.1. MİKROSKOPİK İNCELEME.....	25
2.10.2. ANTİJEN-ANTİKOR ARAMA TESTLERİ.....	26
2.10.3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	28
2.10.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	29
2.11. TEDAVİ.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. ÇALIŞMA GRUBU VE ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	32
3.2. OLGU GRUPLARINDA <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> ARAŞTIRILMASINDA KULLANILAN TEST VE YÖNTEMLERİ.....	33
3.2.1. MODİFİYE ZIEHL-NEELSEN BOYAMA YÖNTEMİ.....	33
Kit İçeriği.....	33
Boyama Yönteminin Uygulanması.....	33
3.2.2. ELISA YÖNTEMİ.....	34
Kit İçeriği.....	34
Testin Uygulanması.....	34
Sonuçların Değerlendirilmesi.....	35
3.2.3. PZR YÖNTEMİ.....	35
3.2.3.1. DNA EKSTRAKSİYONU.....	36
Ekstraksiyon Kit İçeriği.....	36
Ekstraksiyon Prosedürü.....	37
3.2.3.2. GERÇEK ZAMANLI PZR UYGULANMASI.....	38
Gerçek Zamanlı PZR Kit İçeriği.....	38
Gerçek Zamanlı PZR Prosedürü.....	39
PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	41
3.3. DİĞER TESTLER VE YÖNTEMLER.....	41
3.3.1. DİĞER İMMÜNOLOJİK TESTLER.....	41
3.3.2. DİĞER VİROLOJİK TESTLER.....	41
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. MİKROSKOPİ SONUÇLARI.....	48
4.2. ELISA SONUÇLARI.....	49
4.3. PZR SONUÇLARI.....	49
5. TARTIŞMA.....	52

KAYNAKLAR	59
HAM VERİLER	Error! Bookmark not defined.
FORMLAR.....	Error! Bookmark not defined.
ETİK KURUL KARARI.....	73
PATENT HAKKI İZNİ.....	Error! Bookmark not defined.
TELİF HAKKI İZNİ	Error! Bookmark not defined.
ÖZGEÇMİŞ	74



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Geçerli ismi olan <i>Cryptosporidium</i> türleri ve konakları	3
Tablo 2-2: 2002-2012 yılları arası farklı ülkelerde görülen <i>Cryptosporidium</i> salgınları ve kaynakları.....	19
Tablo 2-3: Tanı yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	24
Tablo 3-1: Standart dilüsyon serisi	40
Tablo 3-2: Her örnek için kullanılan reaksiyon mix'inin içeriği	40
Tablo 3-3: Amplifikasyon protokolü	40
Tablo 4-1: Hastaların demografik, klinik ve virolojik bilgiler	43
Tablo 4-2: CD4+ sayıları ve dışkı şekillerine göre cinsiyet dağılımı	48
Tablo 4-3: Gerçek zamanlı PZR sonucunda pozitif saptanan örnek ve standartların değerleri	50
Tablo 4-4: <i>Cryptosporidium</i> varlığının üç yöneme göre dağılımı.....	50
Tablo 4-5 : <i>Cryptosporidium</i> varlığının CD4+ sayılarına göre dağılımı	51
Tablo 4-6 : <i>Cryptosporidium</i> varlığının HIV tedavisi bakımından değerlendirilmesi ...	51
Tablo 4-7 : HIV-1 ile enfekte olgularda <i>Cryptosporidium</i> varlığının tanı alma sürelerine göre dağılımı	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Ernest Edward Tyzzer	2
Şekil 2-2: <i>Cryptosporidium</i> 'un yaşam döngüsü	6
Şekil 2-3: Su içinde asılı halde yüzen <i>Cryptosporidium parvum</i> oositleri (x500).....	7
Şekil 2-4: Transmisyon elektron mikroskobu ile (TEM) dört sporozoitin üçü görülmemektedir. Ookist hala parazitofor kaynaklı konak hücre içindedir	7
Şekil 2-5: Transmisyon elektron mikroskobunda (TEM, x5120) görünen epitel hücrelerin mikrovillusları arasındaki tek nükleuslu trofozoit ve ok ile gösterilen bir parazitofor vakuölü	8
Şekil 2-6: Scanning elektron mikroskobunda (SEM, x3500) epitel hücrelerinin yüzeyinde görünen <i>Cryptosporidia</i> , ok ile gösterilen trofozoitler ve ok başı ile gösterilen bozulmuş bir parazitoforus kılıfı	8
Şekil 2-7: Scanning elektron mikroskobunda (SEM, x18000) tip 1 meronttan çıkan merozoitler görülmektedir	9
Şekil 2-8: Transmisyon elektron mikroskobunda (TEM, x5720) dört merozoit içeren bir tip 2 meront görülmektedir	9
Şekil 2-9: Transmisyon elektron mikroskobunda (TEM, x5720) nükleusu ve koyu renkli gövdesiyle bir makrogamont görülmektedir	9
Şekil 2-10: Transmisyon elektron mikroskobunda (TEM, x25250) konak hücreye bağlanmış, döllenmiş bir makrogamet ve parazitofor vakuölü.....	10
Şekil 2-11: Transmisyon elektron mikroskobunda (TEM, x24000) bir mikrogamont içinde beş mikrogamet görülmektedir	10
Şekil 2-12: 1998-2008 yıllarında insanlarda görülen kriptosporidiaz salgın ve sporadik vakalarının bulaş şekillerine göre coğrafik dağılımı.....	20
Şekil 4-1: Hastaların cinsiyete göre yaş dağılımları	47
Şekil 4-2: Çalışmaya alınan örneklerde cinsiyete göre dışkı şekli dağılımları.....	48
Şekil 4-3: Gerçek zamanlı PZR sonucunda pozitif saptanan örnek ve standartların grafik eğrileri.....	49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
AIDS	: Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
SEM	: Scanning Elektron Mikroskobu
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV	: Ultraviyole
CSL	: Circumsporozoite Benzeri Protein
Ig	: İmmünglobulin
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleks
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
CXCL	: CXC Chemokine Ligand
DFA	: Direkt Floresan Antikor
IFA	: İmmün Floresan Antikor
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Testi
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi
NASBA	: Nükleik Asit Dizi Temelli Çoğaltma
H&E	: Hematoksilen & Eozin
EIA	: Enzim İmmün Testi
MAF	: Modifiye Aside Dirençli
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HAV	: Hepatit A Virüsü
TBC	: Tüberküloz
HCV	: Hepatit C Virüsü
HBV	: Hepatit B Virüsü

EBV : Epstein Barr Virüsü

CMV : Sitomegalovirüs

HSP70 : 70 kDa Isı Şok Proteini

COWP: *Cryptosporidium* Ookist Duvar Proteinleri



ÖZET

Atalık K. HIV pozitif bireylerin dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* sp'nin çeşitli yöntemlerle araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2015.

Cryptosporidium, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi seyreden tablolara neden olabilmesi sebebiyle önem kazanmış bir fırsatçı protozoondur. *Cryptosporidium* gibi fırsatçı enfeksiyon etkenleri, HIV/AIDS hastalarında önemli morbidite ve mortalite nedenidir.

Bu çalışma izlemlili HIV-1 pozitif hastalarda *Cryptosporidium*, *Cyclospora* ve *Microsporidium* gibi fırsatçı parazitlerin araştırıldığı kombine bir çalışmanın *Cryptosporidium* insidansının araştırıldığı kısmını oluşturmaktadır. İzlemlili HIV-1 pozitif hastalarda *Cryptosporidium* insidansını araştırmak ve bu hastalarda izlemin önemini vurgulamak amacıyla yapılan bu çalışmada, T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü'nde izlemi yapılan 91 HIV-1 pozitif hastanın dışkı örnekleri 31.03.2011-29.12.2011 tarihleri arasında toplanmıştır. Çalışmamızda şekillerine göre sulu, gevşek, yumuşak ve şekilli olmak üzere dört gruba ayrılmış dışkı örneklerinde Modifiye Ziehl-Neelsen boyama, ELISA ve Gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile *Cryptosporidium* ookistleri araştırılmıştır. HIV-1 pozitif bireylerin örneğin alındığı tarihteki yaşı, cinsiyeti, CD4+ ve HIV-RNA düzeyleri, ek bir hastalıklarının olup olmadığı, tanı süreleri kaydedilmiştir.

Doksan bir HIV-1 pozitif izlemlili hastada Modifiye Ziehl-Neelsen boyama, ELISA ve Gerçek zamanlı PZR ile *Cryptosporidium* araştırılması sonucunda mikroskopi ile hiç pozitiflik saptanmazken ELISA ve Gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile sadece bir (%1,1) örnekte pozitiflik saptanmıştır.

HIV/AIDS tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Her ne kadar hasta izlemi zahmetli ve uzun soluklu bir yol olsa da HIV/AIDS'li hastalarda izlem, yaşam süresinin uzatılması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi açısından hayati önem taşımaktadır. İzlemlili HIV-1 pozitif hastalarda yaptığımız bu çalışma sonunda çok düşük oranda *Cryptosporidium* görülmüş olmasının hastaların izlemlili olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*, HIV, izlem, mikroskopi, ELISA, Gerçek zamanlı PZR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 16121

ABSTRACT

Atalik K. Detection of Cryptosporidium in the HIV-positive individuals' stool samples by various methods. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. PhD Thesis. İstanbul. 2015.

Cryptosporidium is an opportunistic protozoan which became important due to causing serious progression tables in individuals whose immune system is suppressed. Opportunistic infection factors such as Cryptosporidium are an important cause of morbidity and mortality in HIV/AIDS patients.

This study constitutes a part, in which Cryptosporidium incidence is examined, of a combined study examining the opportunistic parasites such as Cryptosporidium, Cyclospora and Microsporidium in followed-up HIV-1 positive patients. In this study, which was conducted in order to examine the incidence of Cryptosporidium in followed-up HIV-1 positive patients and to emphasize the importance of the follow-up in these patients, stool samples of 91 HIV-1 positive patients which were followed up in TR Ministry of Health Okmeydanı Training and Research Hospital Department of Infectious Diseases were collected between March 31, 2011 and December 29, 2011. In our study, Cryptosporidium oocysts were examined using Modified Ziehl-Neelsen staining, ELISA and Real-time PCR methods in the samples divided into four groups according to the shapes as watery, loose, soft and shaped. Information such as age of the HIV positive individuals when the sample was taken, sex, CD4+ and HIV-RNA numbers, existence of an additional disease if any, diagnosis durations were recorded.

While no positivity was detected with microscopy as a result of examination of Cryptosporidium in ninety-one followed-up HIV-1 positive patients using Modified Ziehl-Neelsen staining, ELISA and Real-time PCR, positivity was detected in one (1.1%) sample using ELISA and Real-time PCR methods.

HIV/AIDS continues to be an important health problem around the world. Although follow-up of patients is a difficult and long road, follow-up in HIV/AIDS patients is of vital importance in terms of prolonging the life and improving the quality of life. We are of the opinion that observation of Cryptosporidium at a very low rate at the end of this study that we conducted in followed-up HIV-1 positive patients was due to the fact that the patients were followed up.

Key Words: Cryptosporidium, HIV, follow-up, microscopy, ELISA, PCR

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 16121

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cryptosporidium, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi seyreden tablolara neden olabilmesi sebebiyle önem kazanmış hücre içi bir fırsatçı protozoondur. HIV/AIDS tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. *Cryptosporidium* gibi fırsatçı enfeksiyon etkenleri ise HIV/AIDS hastalarında önemli morbidite ve mortalite nedenidir^{1,2}.

Bu çalışma izlemlı HIV pozitif hastalarda *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis* ve *Microsporidium* gibi fırsatçı parazitlerin araştırıldığı kombine bir çalışmanın *Cryptosporidium* insidansı araştırılan bölümüdür³. Bu kombine, kesitsel ve tanımlayıcı çalışma için T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü'nde izlenen 91 HIV-1 pozitif hastandan 31.03.2011 - 29.12.2011 tarihleri arasında dışkı örnekleri toplanmıştır. Çalışmada kullanılan dışkı örnekleri şekillerine göre sulu, gevşek, yumuşak ve şekilli olmak üzere dört gruba ayrılmıştır ve bu örneklerde Modifiye Ziehl-Neelsen boyama, ELISA ve Gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile *Cryptosporidium* ookistleri araştırılmıştır. Klinik örneğin alındığı tarihteki HIV pozitif bireylerin yaşı, cinsiyeti, CD4+ ve HIV-RNA sayıları, ek bir hastalıklarının olup olmadığı, tanı süreleri ve tedavi alıp almadıkları kaydedilmiştir.

Hasta izlemi, her ne kadar zahmetli ve uzun soluklu bir yol olsa da HIV/AIDS ile yaşayan hastalarda yaşam süresinin uzatılması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi açısından hayati önem taşımaktadır. Bu çalışmada izlemlı hastalarda *Cryptosporidium* insidansını mikroskopi, ELISA ve Gerçek zamanlı PZR yöntemlerini kullanarak belirlemeyi ve HIV/AIDS ile yaşayan hastalarda izlemin önemi ile bu hastaların rutin kontrollerinde intestinal parazitlerin unutulmaması gerekliliğini vurgulamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Cryptosporidium, enfekte hayvan veya insan dışkıyla kontamine olmuş besinlerin yenmesi veya kontamine suların içilmesi ile bulaşarak salgın hastalıklara yol açabilen hücre içi bir parazittir. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ciddi seyreden ve uzun süren enfeksiyonlara neden olurken, sağlıklı insanlarda kendiliğinden geçen orta şiddette gastroenterite ve ishale sebep olmaktadır^{4,5}. İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte ve CD4+ sayısı <200 hücre/mm³ olan bireylerde yüksek oranda görülmektedir^{6,7}. Daha önceleri sadece bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülmesiyle önem kazanmışken şimdilerde çocukluk çağı ishallerine sebep olan önemli patojenler arasında olduğu bilinmektedir. Bu patojenin özellikle iki yaşından küçük çocukların büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyeceği düşünülürse önemi daha iyi anlaşılacaktır^{8,9}.

2.1. TARİHÇE

Yaklaşık bir asır önce, 1907 yılında, Ernest Edward Tyzzer adında bir parazitolog *Cryptosporidium* cinsini keşfetmiştir (Şekil 2-1)¹⁰.



Şekil 2-1: Ernest Edward Tyzzer¹⁰

Tyzzer ookist içindeki sporokistlerin görünmüyor ya da fark edilmiyor olmasından dolayı bu parazite gizli spor anlamına gelen *Cryptosporidium* adını

vermiştir¹¹. *Cryptosporidium*'un keşfinden sonraki 70 yıl içinde, dört omurgalı grubundan yaklaşık 20 hayvan türünün mide-bağırsak sisteminde sık sık *Cryptosporidium*'a rastlanmıştır¹². İlk insan olgusu ise 1976 yılında üç yaşındaki bir çocukta görülmüştür¹³. *Cryptosporidium*'un 1907 yılında keşfedilmesine rağmen klinik önemi ve yaygınlığı 1980'lerin başına kadar fark edilememiştir. 1980'lerin başında HIV/AIDS'li bireylerde, kronik ve hayatı tehdit eden kriptosporidiaz olgularının ortaya çıkışı önemli bir dönüm noktası olmuştur¹⁰.

2.2. TAKSONOMİ

Cryptosporidium, Apikompleksa şubesinin Cryptosporidiidae ailesinde yer almaktadır. Uzun zamandır yaşam döngüsündeki benzerlikler nedeniyle bu ailenin Eimeriidae takımı, Coccidea sınıfına ait olduğu düşünülmüşse de son zamanlarda taksonomisi tartışmalıdır. Tartışmaların sebebi diğer Eimeriidae takımı üyeleriyle (*Cyclospora*, *Cystoisospora* ve *Eimeria*) karşılaştırıldığında yaşam döngüsünde, filogenetiğinde ve biyolojisinde farklılıkların olmasıdır¹⁴. Yapılan filogenetik araştırmalar, üreme safhalarındaki benzerlik dolayısı ile *Cryptosporidium*'ların, Gregarinlere Coccidia'lardan daha yakın olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *Cryptosporidium*'un Coccidea sınıfına ait olduğu söylenememektedir¹⁵⁻¹⁷.

Morfolojik olarak ayırlamayan *Cryptosporidium* türleri başlangıçta genotip olarak tanımlanmış daha sonra tür isimleri almıştır. Şu anda geçerli ismi olan toplam 30 *Cryptosporidium* türü bulunmaktadır¹⁸. Bunlar Tablo 2-1'de gösterilmiştir^{14,19-22}.

Tablo 2-1: Geçerli ismi olan *Cryptosporidium* türleri ve konakları^{14,19-22}

<i>Cryptosporidium</i> türleri	Yaklaşık ookist boyutu (µm)	Başlıca konaklar
<i>C. andersoni</i>	7,4 x 5,5	Sığırlar
<i>C. agni</i> *		Memeliler
<i>C. baileyi</i>	6,2 x 4,6	Tavuklar, diğer kuşlar

<i>C. bovis</i>	4,9 x 4,6	Sığırlar
<i>C. canis</i>	5,0 x 4,7	Köpekler
<i>C. cuniculus</i>	5,6 x 5,4	Tavşanlar, insanlar
<i>C. erinacei</i>	4,9 x 4,4	Memeliler
<i>C. fayeri</i>	4,9 x 4,3	Keseli hayvanlar
<i>C. felis</i>	4,6 x 4,0	Kediler
<i>C. fragile</i>	6,2 x 5,5	Kurbağalar
<i>C. galli</i>	8,3 x 6,3	Tavuklar
<i>C. hominis</i>	4,9 x 5,2	İnsanlar
<i>C. huwi</i>	4,6 x 4,4	Balıklar
<i>C. macropodum</i>	5,4 x 4,9	Kangurular
<i>C. meleagridis</i>	5,2 x 4,6	Kuşlar, memeliler
<i>C. molnari</i>	4,7 x 4,5	Karagöz balığı
<i>C. muris</i>	7,0 x 5,0	Kemirgenler
<i>C. nasoris</i>	4,4 x 3,3	Balıklar
<i>C. parvum</i>	5,0 x 4,5	İnsan, memeliler
<i>C. ryanae</i>	3,7 x 3,2	Sığırlar
<i>C. scophthalmi</i>	4,4 x 3,9	Kalkan
<i>C. scrofarum</i>	5,2 x 4,8	Domuzlar
<i>C. serpentis</i>	6,2 x 5,3	Sürüngenler

<i>C. suis</i>	4,6 x 4,2	Domuzlar
<i>C. tyzzeri</i>	4,6 x 4,2	Fareler
<i>C. ubiquitum</i>	5,0 x 4,7	Memeliler
<i>C. viatorum</i>	5,4 x 4,7	İnsanlar
<i>C. varanii</i>	4,8 x 4,7	Sürüngenler
<i>C. wrairi</i>	5,4 x 4,6	Domuzlar
<i>C. xiaoi</i>	3,9 x 3,4	Koyunlar

*: Boyutu ile ilgili net bir veriye rastlanmamıştır. *C. wrairi* ile morfolojik olarak benzerlikleri olduğu bildirilmiştir.

2.3. MORFOLOJİ

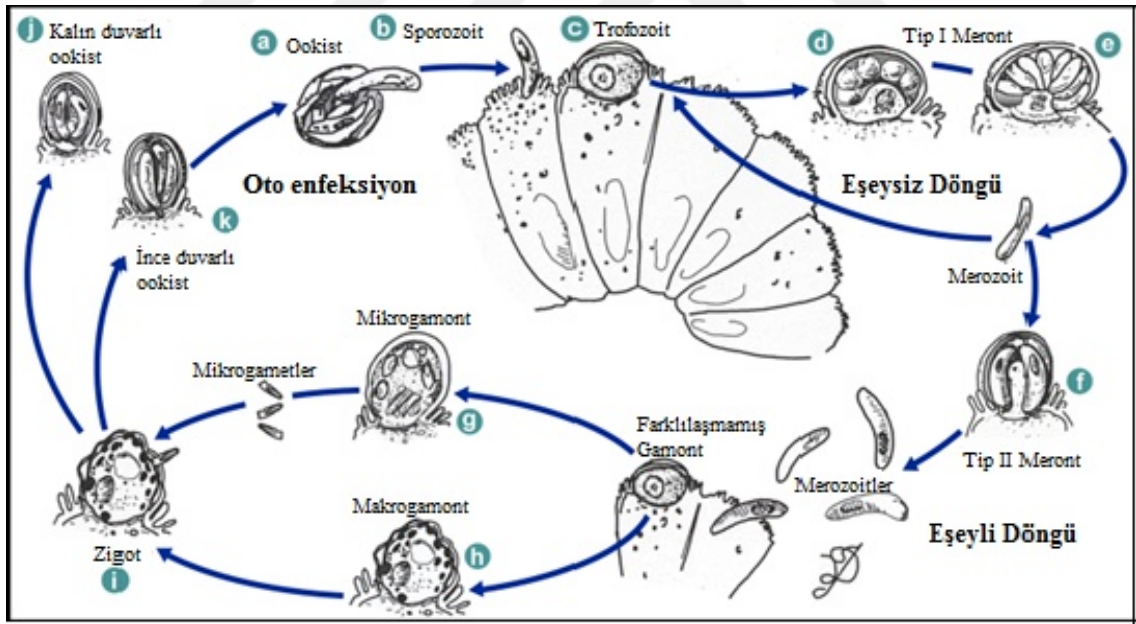
Cryptosporidium'un tüm formları (trofozoit / tip 1 meront, tip 2 meront, mikrogamont ve makrogamont / ookist) ya küre ya da koni şeklindedir ve konak sindirim sistemi boyunca devam eden epiteliyal hücrelerin içine yerleşir. Ookistleri 4-5 µm çapında olan hücre içi bir parazittir. Trofozoitler 1-2,5 µm çapındadır. Tip 1 merontlar 1,5-2,5 µm, tip 2 merontlar 3,5 µm, mikrogametositler 2 µm, makrogametositler 4x5 µm çapında, olgun ookistler ise 5x7 µm çapındadır. Merozoitler 0,4x1 µm çapındadır. Mikrogametler mermi ya da çomak şeklinde ve 1-2 µm arasında değişen uzunluktadır. Ayrıca içinde bulundukları şubenin diğer üyelerinden farklı olarak *Cryptosporidium*'ların mikrogametlerinde flagellum yoktur²³.

Ookistleri küre şeklinde, kalın bir duvarla çevrili yapılardır ve içlerinde dört sporozoit bulunan, sporokistleri bulunmayan yapılardır. Sporozoitleri ise içlerinde rhoptri, mikronem ve konak hücreye invazyonu sağlayan apikal kompleks denilen bir organelle sahiptir. Hareketli sporozoitler ince bağırsak epitel hücrelerinin yüzey reseptörlerine bağlanarak aktin polimerizasyonuna neden olurlar. Böylece ince bağırsak epitel hücre membranında bir çıkıntı oluşur, membran sporozoiti sarar ve epitel hücresinin mikrovillus tabakasında parazitöfor vakuol oluşur²⁴.

2.4. YAŞAM DÖNGÜSÜ

Cryptosporidium insan ve çiftlik hayvanları başta olmak üzere pek çok memeli türünü enfekte edebilmektedir. Tüm dünyada hemen hemen her çevrede görülebilen bir parazittir. İnsanlara bulaşması, kontamine besinlerin yenmesi ve kontamine suların içilmesi ile olabildiği gibi inhalasyonla da olabilmektedir^{4,25}.

Cryptosporidium, eşeyli ve eşeysiz üremenin beraber görüldüğü bir yaşam döngüsüne sahiptir ve bu döngü tek bir konakta tamamlanır. Enfektif ookistin vücuda girmesinden vücuttaki tüm safhaların tamamlanmasına kadar geçen süre, konağa ve enfeksiyon dozuna bağlı olarak değişebilmekteyse de genellikle 4-14 gün arasındadır⁴. *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü, başlıca altı dönemden oluşmaktadır. Bunlar ekskistasyon, merogoni, gametogoni, döllenme, ookist ve sporogoni dönemleridir (Şekil 2-2)²⁶.

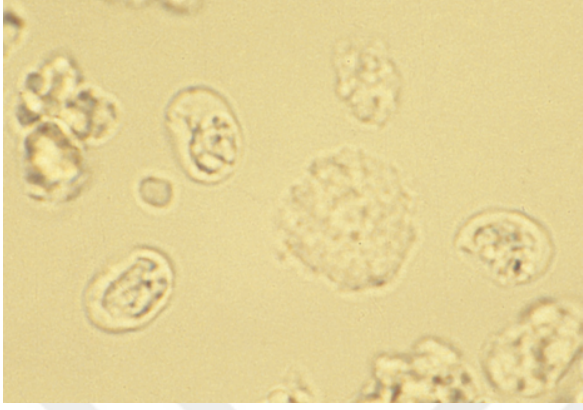


Şekil 2-2: *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü²⁶

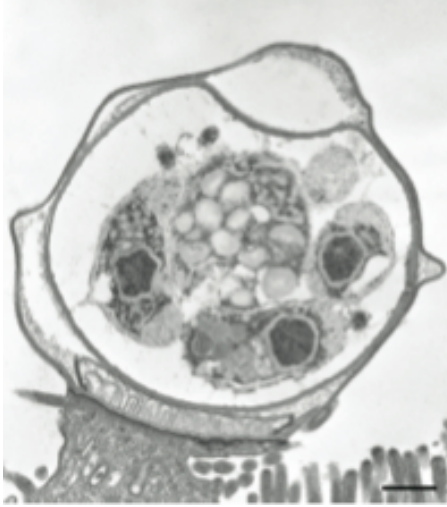
2.4.1. Ekskistasyon dönemi:

Ağızdan alınan kalın duvarlı ookistler (Şekil 2-3), ince bağırsakta safra tuzları ve pankreatik enzimlerin yardımıyla parçalanır; böylece ookist içindeki sporozoitler

serbest kalır. Bu olaya ekskistasyon denir. Ekskistasyon sonucu ookistten dört sporozoit serbest kalır (Şekil 2-4)²⁴.



Şekil 2-3: Su içinde asılı halde yüzen *Cryptosporidium parvum* oositleri (x500)²³



Şekil 2-4: Transmisyon elektron mikroskobu ile (TEM) dört sporozoitin üçü görülmektedir. Ookist hala parazitofor kaynaklı konak hücre içindedir²³

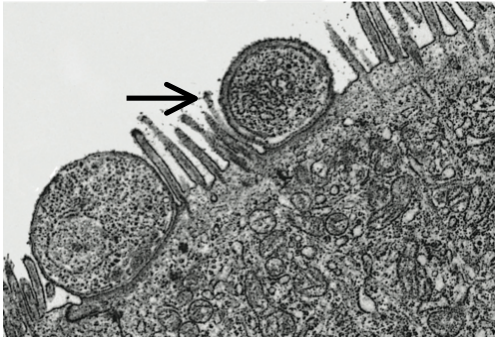
Çubuk: 500 nm

2.4.2. Merogoni dönemi:

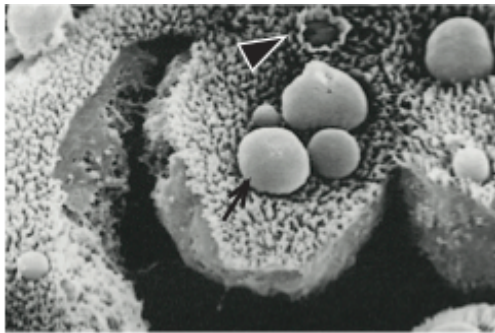
Ookist içinden çıkan sporozoitler iğ şeklindedir. Sporozoitlerin apikal kompleksi, hedef hücreye erişimde, hücreye bağlanmada ve parazitofor vakuolünün kurulmasında önemli rol oynar²⁷. Yaklaşık 47 kDa'luk CP47 denilen bir protein, insan

ve hayvan ileal hücrelerinin yüzeyine bağlanma afinitesi göstermekte ve sporozoit-konak hücre tutunmasında önemli rol oynamaktadır^{27,28}. Sporozoitler, epitel hücrelerini istila eder ve apikal bir vakuolün içinde (parazitofor) (Şekil 2-5) hücre membranı tarafından korunup gelişerek trofozoitlere (tek nükleuslu merontlara) dönüşür (Şekil 2-6)^{4,29}.

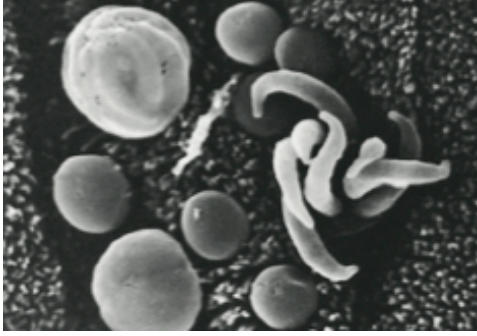
Trofozoitler, 1,5-2,5 µm çapındadır ve merogoni denilen eşeysiz bir çoğalma geçirerek tip 1 merontlara dönüşmektedir²⁷. Tip 1 merontlardan meydana gelen merozoitler (Şekil 2-7), ya yeni hücreleri enfekte ederek trofozoitlere dönüşmekte ve tekrar tip 1 merontları oluşturmakta ya da tip 2 merontlara (Şekil 2-8) dönüşerek eşeyli çoğalmayı başlatmaktadır^{4,29}. Tip 1 merontların, az sayıda ookistle enfekte olmuş bireylerde şiddetli enfeksiyonlara sebep olduğu; bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise uzun süren ve yaşamı tehlikeye sokan tablolardan sorumlu oldukları düşünülmektedir²⁴.



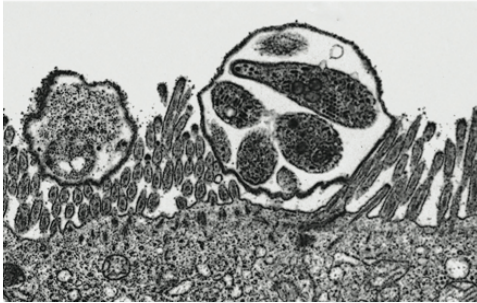
Şekil 2-5: Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM, x 5120) görünen epitel hücrelerin mikrovillusları arasındaki tek nükleuslu trofozoit ve ok ile gösterilen bir parazitofor vakuölü²³



Şekil 2-6: Scanning elektron mikroskopunda (SEM, x 3500) epitel hücrelerinin yüzeyinde görünen *Cryptosporidium*'lar, ok ile gösterilen trofozoitler ve ok başı ile gösterilen bozulmuş bir parazitoforus kılıfı²³



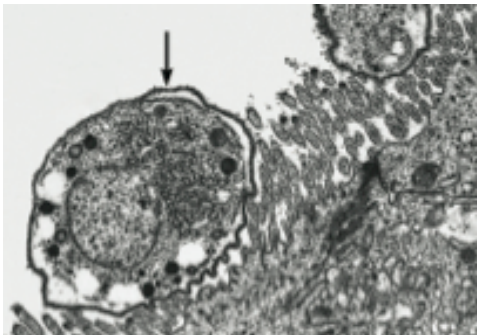
Şekil 2-7: Scanning elektron mikroskopunda (SEM, x 18000) tip 1 meronttan çıkan merozoitler görülmektedir²³



Şekil 2-8: Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM, x 5720) dört merozoit içeren bir tip 2 meront görülmektedir²³

2.4.3. Gametogoni dönemi:

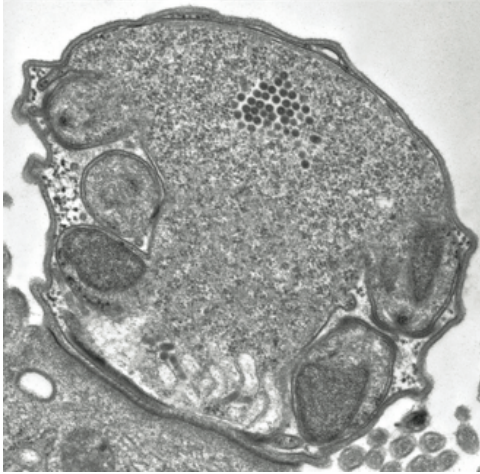
Tip 2 merontlardan meydana gelen merozoitler yeni bir döngüye girmez ve makrogamont (Şekil 2-9) ve mikrogamonta dönüşür. Bunlar da makrogamet (Şekil 2-10) ve mikrogamete (Şekil 2-11) dönüşmektedir^{4,24,29}.



Şekil 2-9: Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM, x 5720) nükleusu ve koyu renkli gövdesiyle bir makrogamont görülmektedir²³



Şekil 2-10: Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM, x 25250) konak hücreye bağlanmış, döllenmiş bir makrogamet ve parazitofor vakuolü²³



Şekil 2-11: Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM, x 24000) bir mikrogamont içinde beş mikrogamet görülmektedir²³.

2.4.4. Döllenme dönemi:

Gametogoni sonunda oluşan mikrogamet kamçısız fakat hareketli bir yapıya sahiptir. Daha sonra mikrogametın makrogameti döllemesiyle zigot oluşur^{4,24,29}.

2.4.5. Ookist dönemi:

Zigot duvarının kalınlaşması ile parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayacak olan, dış çevre koşullarına dayanaklı ookist meydana gelir²⁴.

2.4.6. Sporogoni dönemi:

Ookist içinde sporlanma ile dört sporozoit oluşur. Bu sporozoitleri içeren olgunlaşmamış olan ookistlerin %20'si ince duvarlıdır ve konağın sindirim sisteminde açılarak yeni hücrelerin enfeksiyonuna yola açabilir, bu duruma otoenfeksiyon denilir. Bu durumun bağışıklık yetmezlikli hastalarda görülen kronik ishalden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ookistlerin geri kalan %80'i ise kalın duvarlı olup çevre koşullarına dayanıklı ve bulaştan sorumlu ookistlerdir. Vücuttan atılan bu ookistler enfektif özelliktedir ve başka bir konakta enfeksiyon başlatabilirler^{4,29}. Kalın duvarlı ookistlerde tip 1 ve tip 2 duvar şekillendirici cisimlerin bulunduğu, ince çeperli ookistlerde ise bunlardan bulunmadığı bildirilmiştir²⁴.

2.5. BULAŞ YOLLARI VE KORUNMA

Cryptosporidium tüm dünyada görülen ve hemen hemen her çevrede karşılaşılabilecek bir hücre içi parazittir. En önemli gıda kaynaklı zoonotik patojenlerin arasında sayılmaktadır. Bulaşı fekal-oral yolla olmaktadır. Enfekte insanlar, hayvanlar veya kontamine yüzeylerle yakın temas sonucu, hava, toprak ve taşıyıcı konaklar (arthropodlar, kuşlar) aracılığıyla bulaşabildiği bilinmektedir²⁴. *Cryptosporidium* ookistleri su depoları, su boruları, yüzme ve yüzey suları ile umumi tuvaletler aracılığıyla, eşinsel faaliyetler yoluyla, ishalleri kişilerle temas sonucu insandan insana (antroponotik) geçebilmektedir. Yüksek riskli gıdaların (çiğ meyve ve sebze tüketimi, sokak satıcılarından alınan yiyecekler) tüketilmesi ve zoonotik bulaş yolları (çiftlik ve evcil hayvanların varlığı) ise diğeri risk faktörleridir^{4,29,30}.

Bazı meslek gruplarında (hayvancılıkla uğraşanlar, veterinerler, laboratuvar personeli, gıda işiyle uğraşanlar, kreş personeli), çocuklar ve yaşlılar, endemik bölgelere yolculuk edenlerde, hijyenik koşulların yetersiz olduğu yerlerde yaşayanlarda ve enfekte kişilerle yakın temas edenlerde enfeksiyon yüzdesi yüksektir. Özellikle yaşlılarda, çocuklarda ve bakım merkezlerinde yayılım kolay olmaktadır²⁹.

Ookistler, nem oranı yüksek ve 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda altı ay canlı kalabilmektedir. Ookistin çapının küçük oluşu ve çökme hızının az oluşu, su birikintilerinde uzun zaman yaşayabilmesini sağlarken dondurma ve 50°C'ye kadar

ıstmanın patojeni tam olarak öldüremediği bilinmektedir. Ookistler klorlamaya ve aside dirençlidir. Bu durum ookistlerin klorlu sulara, havuz sularında, asitli meyve sularında varlığına devam ederek salgınlara yol açmasına neden olabilmektedir²⁹.

Cryptosporidium'un dezenfeksiyonu zordur. Standart klorlama, iodinleme, filtrasyon gibi mekanik yöntemler *Cryptosporidium*'un dezenfeksiyonunda yetersiz kalmaktadır. Ancak klordioksit (ClO_2), ozon (O_3) ve kaynatmayla dezenfekte edilebilmekte ve ultraviyole (UV) ışın ile dezenfeksiyonun da son derece etkili olduğu bilinmektedir. 2 log-ünitelik, 25 L/cm³ dozda UV ışınının 3 log-ünitelik ookist inaktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir³¹.

Risk altındaki insanların, kullanacakları suyu kaynatarak içmeleri ve hayvan dışkılarıyla kontaminasyondan kaçınmaları önerilir^{29,32}. Besin kaynaklı bulaşı önlemek için kıymalar (sığır, dana, kuzu, domuz) 71°C'de, tavuk kıymaları 74°C'de, balık ve diğer deniz ürünleri ile kuşbaşı etler 63°C'de, tavuk göğüs eti 77°C'de ve bütün tavuk 82°C'de 15 dakika ısıtılmalıdır. Dondurulmuş hazır yiyecekler en az 74°C'de ani ısıtma gerektirir. Çiğ yiyeceklerin ve hazır gıdaların kontaminasyondan korunması, sebze ve meyvelerin iyice yıkanarak tüketilmesi önerilmektedir²⁹.

2.6. PATOJENİTE

Cryptosporidium, bağışıklığı sağlam kişilerde genellikle terminal jejunum ve ileumda; bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ise mide, duodenum, kolon, biliyer ve pankreatik kanallara, solunum sistemine yerleşebilmektedir. En sık intestinal sisteme yerleştiği için en sık görülen belirti ishaldir²⁴. *Cryptosporidium*'da görülen ishalin patofizyolojisi tam olarak açıklanamamakla birlikte üç mekanizmanın etkili olabileceği düşünülmektedir:

- sitotoksik etkiyle intestinal yapının tahrip edilmesi,
- konak bağışıklık sistemi tarafından inflamatuvar metabolit ve hormonların salınması,
- parazitin enterotoksik özellik göstermesi²⁵.

İnce bağırsaktaki enterositlerin ağır hasarı veya ölümü, vilus atrofi ve lamina propiyadaki hücresel enflamasyon sonucu sitotoksik etkiyle intestinal yapı tahrip olmaktadır. Enfekte epitel hücrelerden sitokinler salınması ile enflamatuvar ve bağışıklık sisteminin hücreleri burada toplanır. Prostaglandinler (PGE_2), epitel hücrelerden ve substance P gibi nöroproteinler ise enflamasyon hücrelerinden salınır. Ve böylece Na^+ emiliminde azalma, epitelyal permeabilitede ve Cl^- sekresyonunda artış sonucu ishal görülebilmektedir²⁴.

Cryptosporidium, yüzeyel epitel hücrelerine yerleştiği için “minimal invaziv mukozal patojen” olarak kabul edilmektedir²⁵. *Cryptosporidium*’un invazyonu ve bağlanmasında rolü olduğu düşünülen yüzeyel ve apikal kompleks proteinleri arasında circumsporoite-like protein (CSL), gp900, p23/27, TRAP C1, diğer TRAP’ler, gp40/45, cp47, gp15/ cp17, Cp2, Cpa 135, Muc4 ve Muc5 bulunmaktadır³³. Parazitin hem sporozoitlerinde hem de merozoitlerinde bulunan ve 23 kDA’luk bir antijen olan Cp23’ün, *Cryptosporidium* enfeksiyonunda sıvısal bağışık yanıtı uyardığı bilinmektedir³⁴.

2.7. İMMÜNİTE

Akut ve kronik kriptosporidiazda $CD4^+$ T lenfositlere bağımlı sistemik hücresel bağışıklığın önemli olduğu ve sıvısal bağışık yanıtın ise korunmada rol oynadığı düşünülmektedir²⁴.

Sıvısal bağışık yanıtı bakıldığında *Cryptosporidium*’un hücre içi bir parazit olduğu için antikorların parazite olan etkisinin tartışmalı olduğu söylenebilir. Ancak kısmen de olsa antikorlar hücre içi etkili olabilmektedir. Bu etki özellikle salgısal immunglobulin (Ig) A’nın transepitelyal transportu sırasında gerçekleşebilmektedir²⁵. İnsanda önceden kazanılmış antikorların enfeksiyona karşı olmasa da ishal semptomlarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir³³. *Cryptosporidium parvum*’da bulunan bir rekombinant antijenle immünize edilmiş sığırlardan elde edilen antikorca zengin kolostrumla beslenmiş buzağların kriptosporidyal ishale karşı korunduğu, ancak bunun enfeksiyonu önleyemediği bildirilmiştir. Buzağlarda IgA antikorları inokulumdan 5-6 gün sonra görülmüş, inokulumdan yedi gün sonra ishal görüldüğünde

IgM ve IgG1'lerin pik yaptığı ve ishal kaybolduktan sonra da IgG2'de pik olduğu görülmüştür³⁵.

HIV pozitif bireylerde enfeksiyon sırasında IgM, kronik enfeksiyonda IgG antikorların oluşmasına rağmen immünolojik korunmada antikor yanıtının korunmaya pek bir faydası bulunmamaktadır. Ancak bu bireylerde yaş ilerledikçe oluşabilecek bağışıklık nedeniyle enfeksiyon riskinin azalabileceği ileri sürülmüştür²⁵. Bazı çalışmalarda ise HIV pozitif ve HIV negatif hastalarda *Cryptosporidium* antijenlerine karşı farklı antikor yanıtları olduğu bildirilmiştir³⁶.

Hücre sel yanıtı bakıldığında, CD4⁺ T lenfositleri ve özelleşmiş hücre yüzey proteinlerinin (MHC sınıf II, CD40-CD154) immün yanıtta önemli yere sahip olduğu söylenebilmektedir²⁴. *Cryptosporidium* koenfeksiyonu olan HIV pozitif hastalarda CD4⁺ T lenfosit seviyesinin düşük olduğu bildirilmiştir³⁷. CD8⁺ T lenfositlerin rolü, parazitin eradikasyonunda ve korunmada çok net değildir³³. Parazitin parazitofor vakuoldeki yerleşimi nedeniyle sporozoit antijenler MHC sınıf I yoluna girememektedir²⁴. Yapılan bir çalışmada, MHC sınıf II eksikliği bulunan farelerin *Cryptosporidium* enfeksiyonuna, kontrol grubundaki farelerden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir³⁸.

Kriptosporidiazın immünolojisinde öne çıkan Th1 sitokinler bir taraftan hücre fonksiyonları ve intestinal yapının bozulmasına neden olan yangıya aracılık ederken diğer taraftan enfeksiyonun eliminasyonu için gereklidir. Th2 ise koruyucu rol oynarken eliminasyona etkisi yoktur³⁹. Primer enfeksiyon sırasında major T hücre sayısının villuslarda arttığı; luminal parazit hücrelerinin lenfoid foliküllerinde yerleşmiş olan CD4⁺ T lenfositlerine sunulduğu bilinmektedir. Aktive T hücreleri lamina propria veya intestinal epitelyuma göç eder ve aktive T hücrelerinin eksprese ettiği CD154 ve antijen sunucu hücrelerin eksprese ettiği CD40 ilişkisi koruyucu bağışıklığın gelişmesinde temel immünoregülatör rol oynar²⁴. AIDS'te antiretroviral tedavi ile CD4+ sayısında düzelme sağlandığında bazı kemokinlerin yapımında da azalma görülür ve bu durumda intestinal mukozada inflamatuvar yanıt azalması ile ishal semptomlarında da düzelme gözlenebilmektedir²⁵.

İnterferon (IFN) geni inaktive edilmiş farelerle yapılan bir çalışmada, şiddetli enfeksiyon geliştiği ve enfeksiyondan sonra ölüm görülebildiği bildirilmiştir. Bu durum IFN- γ 'nın enfeksiyon sürecinde önem taşıyan faktörlerden biri olduğunu

göstermektedir⁴⁰. Yapılan bazı çalışmalarda interlökin (IL)-4'ün ekspresyonunun semptomlarla ilişkili olmadığı bildirilmiştir. IFN- γ değil ancak IL-8, tümör nekroz faktör (TNF)- α , IL-13 ve IL-4 düzeylerinin kriptosporidiaz olgularının dışkı örneklerinde yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca AIDS hastalarının ince bağırsak biyopsilerinde CXC Kemokin Ligand (CXCL)-10 seviyesinin kontrol grubundakilere göre daha yüksek olduğu görülmüştür³³.

2.8. EPİDEMİYOLOJİ

Cryptosporidium tüm dünyada memelilerde, kuşlarda, sürüngenlerde ve balıklarda görülebilen bir parazittir. Sıklıkla sıcak iklime sahip bölgelerde görülmektedir. Enfeksiyonun zaman zaman mevsimsel özellik gösterdiği, nemli ve sıcak aylarda daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir^{14,24,41}.

Cryptosporidium'un *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. serpentis*, *C. nasorum*, *C. felis*, *C. wairi*, *C. andersoni*, *C. saurophilum* gibi çok sayıda türü bulunsa da insanlarda en sık görülen türler *C. parvum* ve *C. hominis*'dir. Ayrıca *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris* ve *C. suis*'in de yine insanlarda görülen türler olduğu bildirilmiştir^{24,42-44}.

Az sayıda ookistin enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olması, ookistlerin dış ortam şartlarına olan direnci, birçok dezenfektana karşı olan direnci, konaktan atılan ookistlerin enfekte özellikte olması, bazı genotiplerin hayvan rezervuarları olması ve konağın bağışıklık sisteminin baskılanmış olması *Cryptosporidium*'un epidemiyolojisini etkileyen faktörlerdir²⁴.

Çoğu tropikal ülkedeki çocuklarda görülen *Cryptosporidium* enfeksiyonu (kriptosporidiaz) yağışlı mevsimlerde pik yapar. Bu bölgelerde kriptosporidiazın oluşmasında su kaynaklı bulaşın büyük rolü olduğu düşünülmektedir⁴¹. *Cryptosporidium* seyahat edenlerde en sık görülen ikinci protozoal parazittir⁴⁵.

Çeşitli sosyal ve davranışsal faktörler enfeksiyona yakalanma riskini artırmaktadır. Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada homoseksüel erkeklere kıyasla intravenöz ilaç kullananlarda kriptosporidiaz riskinin daha düşük olduğu bildirilmiştir⁴⁶.

Kriptosporidiaz için bir ihmal hastalığı ve yoksulluk göstergesi denilebilmektedir. Bu hastalıktan en çok etkilenen kesim, hastalığın yayılması için elverişli olan ücra yerlerde, kırsal alanlarda, kentsel gecekonduarda, çatışma ve afet bölgelerinde yaşayan yoksul nüfustur. Gelişmekte olan ülkelerde ishalleri enfeksiyonların büyük kısmında etken saptanamamaktadır. Bunun nedeni kullanılan tanı yöntemlerinin sadece mikroskopi ve kültür gibi düşük duyarlılığa sahip yöntemler olmasıdır⁴⁰. Enfeksiyonun tanısında gelişmiş yöntemlerin kullanılması, daha fazla olguya tanı konulabilmesini sağlamaktadır²⁴.

Kriptosporidiazın prevalans ve surveyansını etkileyen faktörleri beş ana başlık altında toplayabiliriz. Bunlar:

Epidemiyolojik indeksler:

- yaş
- cinsiyet
- bağışıklık durumu
- coğrafi dağılım
- etnik köken

İnsan aktiviteleri:

- hijyen ve beslenme uygulamaları
- kırsal ve kentsel düzenlemeler
- insan atıkları kontaminasyonu
- hayvancılık sonucu oluşan kirlilik
- su iyileştirme sistemleri
- yemek hazırlama
- seyahat
- göç

Sürveyans:

- kontamine sular

- uygunsuz gıda işleme
- salgın kaynaklarını yanlış tanımlama
- protozoon koenfeksiyonu

Çevresel ve sosyal faktörler:

- çevre kirliliği
- kıtlık ve yetersiz beslenme
- susuzluk
- coğrafya
- uluslararası evlat edinme
- doğal felaketler ve iklim değişimi
- ağaçları yok etme
- mevsimsel yağışlar

Klinik ve Tanı:

- zayıf belirtiler
- hafife alınan semptomlar
- yetersiz tanı
- gelişmiş moleküler araçların yokluğu.⁴⁷

Cryptosporidium, özellikle HIV/AIDS’de olduğu gibi CD4⁺ T lenfositlerin azaldığı durumlarda büyük risk teşkil eder⁴⁸. HIV pozitif bireylerde *Cryptosporidium* prevalansı ve epidemiyolojisiyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Sonuçlar %0-100 arasında değişmektedir. Sonuçların bu kadar geniş bir aralıkta değişiyor olması hastalığın safhası, laboratuvar yöntemlerinin hassasiyeti, populasyon grubu, coğrafi konum gibi değişkenlerle açıklanabilir¹.

2.8.1. Ülkemizdeki Dağılışı

Ülkemizde *Cryptosporidium* daha çok ishalleri çocuklar ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler gibi risk gruplarında bulunan hastalarda araştırılmıştır. Yapılan araştırmalarda farklı şehirlerde farklı sonuçlar elde edilmişse de ishalleri çocuklardaki *Cryptosporidium* pozitifliği ülkemizde genellikle %0,97-13,5 arasında değişmektedir⁴⁹⁻⁵³. Bağışıklığı baskılanmış hasta gruplarında yapılan çalışmalarda ise genellikle bu oran %2,1-20,27 arasında değişmektedir⁵⁴⁻⁵⁸.

2.8.2. Dünyadaki Dağılışı

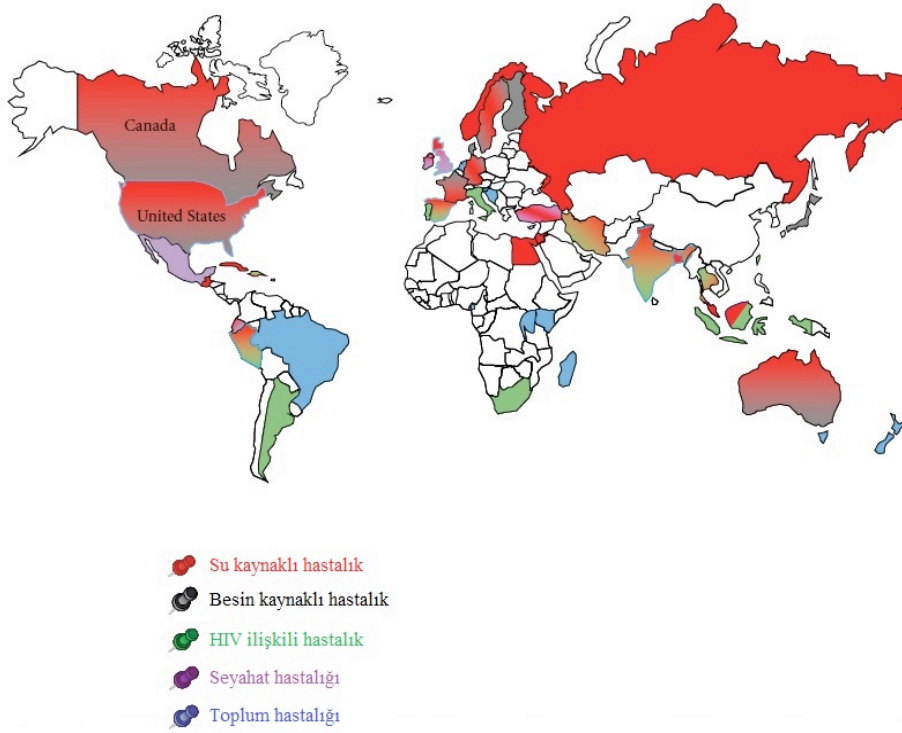
İnsanda ilk *Cryptosporidium* olgusu 1976 yılında, içme suyu ile ilişkilendirilmiş ilk vaka ise 1984 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) bildirilmiştir. O zamandan bu zamana pek çok ülkede büyüklü küçüklü salgınlar görülmüştür⁵⁹. Gürcistan'da 1987'de çıkan büyük salgın bunlardan biridir, yaklaşık 13.000 kişi bundan etkilenmiştir⁶⁰.

Coğrafi açıdan, *Cryptosporidium* salgınları özellikle İngiltere ve İrlanda'da, Kanada, Avustralya ve Avrupa'da yoğun olarak görülmektedir. Bu salgınlarda yetişkinler kadar çocuklar da etkilenmiştir⁴¹. Salgınlar su kaynaklı, besin kaynaklı, HIV ilişkili, seyahat veya toplum hastalığı şeklinde kendini gösterebilmektedir. Her ne kadar tüm dünyadaki enfeksiyon dağılımı değerlendirmek için coğrafi pek çok boşluğun doldurulması gerekiyorsa da Şekil 2-12'de verilen haritada 1998-2008 yılları arasında insanlarda görülen kriptosporidiaz salgınları ve sporadik vakalarının bulaş şekillerine göre coğrafi dağılımı görülebilmektedir⁴¹. 2002-2012 yılları arasında farklı ülkelere görülen *Cryptosporidium* salgınları ve tür düzeyinde etkenleri ise Tablo 2-2'de görülebilmektedir^{41,61-77}.

Amerika'da su kaynaklı kriptosporidiazın yaklaşık %90'ı eğlence parkları, yüzme havuzları ve spalar gibi su kaynaklarından bulaşmaktadır. Gelişmekte olan Afrika ülkelerinde ise atık suyun hijyenik olmayan, düzensiz bertarafı ve yüzey sularının içme suyu olarak kullanılması sebebiyle yetişkinlerde ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde çok yaygın görülmektedir⁴⁰.

Tablo 2-2: 2002-2012 yılları arası farklı ülkelerde görülen *Cryptosporidium* salgınları ve kaynakları

Salgın Tipi	Ülke	Hasta	Etkilenen Grup	Bulaş Yolu	Etken	Yıl	Kaynak
Toplum kaynaklı	ABD	31 öğrenci	Gençler	Buzağılarla temas	<i>C. parvum</i>	2002	61
Gıda kaynaklı	ABD	144 kişi	Çocuk ve yetişkin	Pastörize edilmemiş elma şarabından kontaminasyon	<i>C. parvum</i> Altgenotip IIaA15G2R1, IIaA17G2R1	2002	62
Su kaynaklı	İspanya	179 gezgin	Çocuk ve yetişkin	Kontamine hotel havuz suyu	<i>Cryptosporidium</i> <i>spp.</i>	2003	63
Toplum kaynaklı	İngiltere	36 ziyaretçi	Çocuk ve yetişkin	Çiftlik merkezi, okul gezisi	<i>C. parvum</i> <i>C. hominis</i> <i>C. meleagridis</i>	2003	64
Su kaynaklı	ABD	273 park ziyaretçisi	Çocuk ve yetişkin	Kontamine su parkı	<i>C. parvum</i> (Genotip IIc)	2004	65
Su kaynaklı	Türkiye	191 ev sakini	Çocuk ve yetişkin	Kontamine su tankı	<i>C. parvum</i>	2005	66
Toplum kaynaklı	İskoçya	62 kişi	Çocuk ve yetişkin	Vahşi hayat merkezi	<i>C. parvum</i>	2005	67
Seyahat kaynaklı	ABD	29 kişi	Yaşlı	Hayvan dışkı ile kontamine çevre	<i>C. parvum</i> (Altgenotip IIaA16G1R1b)	2006	68
Su kaynaklı	ABD	21 havuz partisi katılımcısı	Çocuk ve yetişkin	Kontamine havuz suyu	<i>C. hominis</i> (Altgenotip IbaA10G2)	2006	69
Su kaynaklı	İngiltere	57 havuz ziyaretçisi	Çocuk ve yetişkin	Kontamine havuz suyu	<i>C. parvum</i> <i>C. hominis</i>	2007	70
Toplum Kaynaklı	İskoçya	6 veteriner öğrenci	Genç yetişkin	Hijyen eksikliği	<i>C. parvum</i> (Altgenotip IIaA19G2R1)	2007	71
Gıda kaynaklı	İsveç	21 kişi- düşün misafir ve çalışanı	Yetişkin	Kıyılmış taze maydanoz içeren sos	<i>C. parvum</i>	2008	72
Gıda kaynaklı	İsveç	31 kişi	Yetişkin	Taze otlardan şüphelenilmiş	<i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> , <i>C. felis</i>	2010	73
Su kaynaklı	Kanada	12 eğlence parkı ziyaretçisi	Çocuk ve yetişkin	Kontamine eğlence su parkı	<i>Cryptosporidium</i> <i>spp</i>	2010	74
Toplum Kaynaklı	İspanya	24 kreş çocuğu ve 2 bakıcı	Çocuk ve yetişkin	Bilinmiyor	<i>Cryptosporidium</i> <i>spp</i>	2011	75
Su kaynaklı	Kore	124 kişi	Çocuk ve yetişkin	Kontamine apartman su tesisatı	<i>Cryptosporidium</i> <i>spp</i>	2012	76
Toplum Kaynaklı	Norveç	40 öğrenci	Çocuk	Çiftlik hayvanları	<i>C. parvum</i>	2012	77



Şekil 2-12: 1998-2008 yıllarında insanlarda görülen kriptosporidiaz salgın ve sporadik olguların bulaş şekillerine göre coğrafik dağılımı²⁹

2.9. KLİNİK

Cryptosporidium, özellikle bağışıklık yetmezlikli hastalarda ve küçük çocuklarda, ve hatta bağışıklık sistemi yeterli kişilerde de görülebilen önemli bir gastroenterit etkenidir²⁹. Kriptosporidiaz intestinal, respiratuar, hepatobilier ve pankreatik olmak üzere dört farklı klinik tabloya sebep olabilmektedir. Bunlardan intestinal kriptosporidiyaza bakıldığında dört farklı tablo görülmektedir:

- herhangi bir semptomun görülmediği asemptomatik tablo,
- kuluçka dönemi ortalama altı gün (2-30 gün) süren ve sıklıkla bol, sulu, mukuslu olabilen ishalin eşlik ettiği akut sınırlı tablo,
- daha çok malnütrisyonlu çocuklar ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde görülen kronik tablo,
- bağışıklığı baskılanmış bireylerde görülen kolera benzeri ve çok yüksek mortalite ile karakterize olan fulminant tablo²⁴.

Solunumsal kriptosporidiaz, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde görülen şiddetli öksürük, hapsirme, ses kısıklığı, ateş, trakeal sekresyon ve solunum güclüğü ile karakterizedir. Hepatobilier kriptosporidiazda safra kesesi ve safra yolları epitelinin tutulumu, taşsız kolesistit veya sklerozan kolanjit tablosu görülmektedir. Sıklıkla bağışıklığı baskılanmış bireylerde görülmektedir. Pankreatik kriptosporidiaz ise pankreatik kanalların kolonize olmasıyla gelişir ve bu da sıklıkla bağışıklığı baskılanmış bireylerde görülmektedir²⁹.

Cryptosporidium enfeksiyonu AIDS'li hastaları da kapsayan bağışıklık yetmezlikli konaklarda, çoğunlukla kronik ve ağır seyretmektedir. Hastalarda görülen ishal, iki aydan uzun sürebilmekte, şiddetli dehidratasyon, kilo kaybı ve malnutrisyona yol açabilmektedir. Uzun süreli hospitalizasyon ve mortaliteye yol açabilmektedir²⁹.

Kriptosporidiaz, bağışıklık sistemi normal bireylerde kronik seyredebilir ve çoğu kez asemptomatik olabilir⁷⁸. Sağlıklı kişilerde tipik olarak 9-15 gün süreyle seyreden, kendini sınırlayan ve tam iyileşme ile sonlanan bir tabloya neden olmaktadır²⁹. Abdominal kramplar, iştahsızlık, hafif ateş, bulantı-kusma ve sulu ishal ile karakterize bir hastalıktır. *Cryptosporidium parvum*, sulu ishallerin en önemli paraziter nedenleri arasında sayılmaktadır⁷⁸. AIDS olgularında *Cryptosporidium*'a bağlı olarak görülen ishal dört klinik tablo ile ortaya çıkabilir:

1. Kolera benzeri hastalık (%33)
2. Kronik ishal (%36)
3. İntermitan ishal (%15)
4. Geçici ishal (%15)²⁵.

Çocuklarda ve yetişkinlerde kriptosporidiazın klinik tablosu benzerdir. Ancak çocuklukta uzun süre seyreden kriptosporidiaz, büyüme ve gelişme üzerinde kalıcı etkiler bırakabilmektedir. Özellikle çocukluk yaş grubundaki gastroenteritlerde, lenfoma ve lösemi gibi malign hastalıklarda, AIDS gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda mutlaka *Cryptosporidium* araştırılmalıdır²⁹.

Bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, özellikle HIV pozitif hastalarda, CD4+ sayısı 180 hücre/mm³'ten yüksek olduğunda enfeksiyonun spontan temizlenebildiği, 180 hücre/mm³'ten az olduğunda %87 oranında persistan hastalık

oluştugu, CD4+ sayısının 50 hücre/mm³ altına düştüğü durumlarda ise ölüm riski bulunduğu bilinmektedir²⁵.

2.10. TANI

Cryptosporidium'un kesin tanısı, tür ve genotip tiplendirimi, hastalığın bulaşması ve yayılmasını kontrol eden stratejiler bakımından önem arz eder⁴².

Cryptosporidium, biyogüvenlik düzeyi 2 gerektiren ve Grup D bildirimi zorunlu enfeksiyon etkenlerinden biridir. Pozitif saptandığı takdirde ilgili sağlık kurumunca haftalık olarak İlçe Grup Başkanlıkları veya İl Sağlık Müdürlüğü'ne bildirilmesi gerekir⁷⁸. 2004 yılında yayınlanan Bulaşıcı Hastalıkların Bildirim Sistemi'ne göre *Cryptosporidium* tanısı için geçerli laboratuvar testleri dışkı, duodenal sıvıda aside dirençli boyama veya direkt floresan antikor (DFA) yöntemi ile ookistlerinin gösterilmesi, duodenal biyopside *Cryptosporidium* gösterilmesi veya dışkıda özgül immünotanisel yöntemlerle antijen varlığının saptanmasıdır. Sağlık Bakanlığı'nın Bulaşıcı Hastalıkların Bildirim Sistemi'ne göre kriptosporidiazın kesin tanısı, geçerli laboratuvar testlerinin en az birinden pozitif sonuç alınması halinde konulabilmektedir⁷⁸.

Cryptosporidium'un dışkıda tespit edileceği durumlarda ise 2 - 3 gr'lık bir örnek yeterli olabilmektedir. Su örneklerinde tarama yapılması gerektiği durumlarda ise ookistlerin suda az bulunması sebebiyle en az 10 (ham) - 100 (işlenmiş) lt su örneğinin filtre edilmesi gerekmektedir^{42,78}.

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium*'un saptanabilmesi örneğin kalitesi, laboratuvara gönderilme koşulları ve gönderilme zamanı ile doğrudan ilişkilidir⁷⁹. Parazitolojik inceleme için örnek alınmadan önce hastaya herhangi bir nedenle mineral yağ, baryum veya bizmut verilmemiş olmalıdır⁷⁸. Antibiyotik, antidiyareik, antiasid, baryum sülfat veya bizmut gibi ilaçlar parazitlerin saptanmasını engelleyebilir. Bu nedenle bu ilaçların örnek alımından en az bir hafta önce bırakılmış olması veya ilaçların alınmasının bir hafta sonraya ertelenmesi gerekmektedir⁸⁰.

Kriptosporidiaz tanısında hastanın 10 gün içerisinde üç kez (tercihen gün aşırı) dışkı örneği (2-3 gr) vermesi ve hastaya dışkıya idrar kaçırmamasına dikkat etmesi

söylenmelidir⁷⁸. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında, enfeksiyon kanıtı olan ookistlerin duodenumda daha yoğun bulunması nedeniyle dışkı örneği ile tanı konulamayabilir. Bu durumda duodenum aspirasyonu veya Entero-Test adlı ipli bilye içeren bir kapsülün yutulması ile elde edilen safra materyali kullanılabilir. Duodonal aspirasyon sıvısı (2-3 ml) ve biyopsi örnekleri (5-6 doku parçası) etkenin *Cryptosporidium* olduğu düşünülmese de rağmen dışkıda görülemediği durumlarda tercih edilmektedir^{78,80}. Günümüzde yeni yöntemlerin gelişmiş olması ile birlikte invaziv, pahalı ve uzun zaman alan biyopsi gibi dezavantajlı yöntemlere gerek kalmamıştır⁸¹.

Örneklerin laboratuvara gönderilirken temiz, ağzı sızdırmaz kapaklı bir kaba konulması gerekmektedir. Laboratuvara gönderilecek örnek 30 dakika içinde incelenmeyecekse iki ayrı kaba ayrılmalıdır. Dışkı örneklerinde bu kaplardan birine koruyucu koymadan, diğerine %10'luk formalin eklenerek laboratuvara gönderilmelidir. Örnek, ince bağırsak aspirasyon sıvısı veya biyopsi örneği olduğunda steril iki ayrı tübe ayrılır ve birinin içine %10'luk formalin eklenerek, diğerine 1 ml salin (kurumayı önlemek amacıyla) eklenerek tüpler laboratuvara gönderilir⁷⁸.

Transport sırasında koruyucu içermeyen örnekler <30 dakika oda ısısında bekleyebilirken, şehirlerarası transportlarda örneğin üçlü paketleme ile soğuk zincirde en geç 24 saatte gönderilmesi gerekmektedir. Koruyucu içermeyen örnekler buzdolabında 24 saat muhafaza edilebilir. İmmünotanisel testlerde kullanılacak örnekler 4°C'de saklanabilir. Daha uzun süreli saklamalarda ise örnekler -20°C'de muhafaza edilmelidir⁷⁸.

Kriptosporidiaz tanısında sıklıkla kullanılan yöntemler arasında, aside dirençli boyama, IFA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immünkromatografi, floresan in situ hibridizasyon (FISH), Nested PZR, PZR-Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PZR-RFLP), Gerçek zamanlı PZR, mikrosatellit analiz, nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) ve flow sitometri sayılabilir^{82,83}.

PZR temelli yöntemler, mikroskopi ve immün testler gibi geleneksel yöntemlere göre daha duyarlı ve daha özgül olmaları, çok sayıda örneğin aynı zamanda çalışılmasına olanak sağlamaları, tür ve genotip tayini yapabilmeleri, örnek içindeki patojenin miktarını saptayabilmeleri gibi avantajları dolayısı ile günümüzde daha çok tercih edilir olmuştur^{42,82}.

Kesin tanı için mikroskopi, ELISA, PZR gibi yöntemlerden en az iki yöntemle pozitif sonuç alınması gerektiği bildirilmiştir⁸⁴. Pek çok ticari firma kolay uygulanabilen hızlı tanı testleri geliştirmiştir: lateral-flow immunoassay, DFA testleri, immünokromatografik test bunlar arasında sayılabilir. Bu testler daha az zaman alır ve kolayca uygulanabilir. ColorPAC kombinasyon hızlı katı-faz kalitatif immünokromatografik test ve Triage parazit panel de insan dışkısında *C. parvum* antijenlerinin saptanması için kullanılan yöntemlerden bazılarıdır⁸⁵. Triage parazit panelin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %98,3 ve %99,7 olarak bildirilmiştir²⁴. FISH yöntemi, direkt klinik örneklerden veya kültürlerdeki üremelerden aile, cins ve tür düzeyinde mikroorganizmaların hızlı tanısında ve mikroorganizmaların filogenetik analizlerinde kullanılmaktadır⁸⁶. *Cryptosporidium*'un tanısında kullanılan yöntemler karşılaştırıldığında her birinin ayrı ayrı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bunlar Tablo 2-3'de özetlenmiştir^{82,87}.

Tablo 2-3: Tanı yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Aside dirençli boyama	-Kolay -Başka parazitler de görülebilir	-Özgül değil
IFA	-Özgüllüğü yüksek -Morfolojik doğrulama mümkün	-Canlılık belirlenemez -Floresan mikroskop gerektirir
ELISA	-Hızlı ve özgül -Tüm gelişim evrelerinin antijenleri belirlenebilir	-Morfolojik doğrulama mümkün değil -ELISA okuyucu cihaz gerektirir
İmmünokromatografi	-Hızlı	-Kalite kontrol ve kalite güvence konusunda sorunlu
Nested PZR	-Yüksek duyarlılık -Özgül	-Kontaminasyon riski yüksek -Gerçek zamanlı PZR'ye göre daha uzun zaman alır
PZR-RFLP	-Tür ve genotip ayrımı yapabilir	-Gerçek zamanlı PZR'ye göre daha uzun zaman alır
Gerçek zamanlı PZR	-Hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllük	-Yüksek maliyet

	- Rutinde kullanılabilir - Tür ayrımında kullanılabilir	
NASBA	- Sadece RNA örneklerinden amplifikasyonla ookist canlılığı belirlenebilir	- Isı döngü cihazı gerektirmez - Tanı aracı olarak kullanımı için ileri çalışmalara gereksinim var

2.10.1. Mikroskopik İnceleme

Dışkı örnekleri ve çevresel örneklerde bulunan mayalar, küf mantarları, alg ve bitkisel artıklar gibi yapısal olarak benzer partiküller *Cryptosporidium*'un ayırt edilmesini güçleştirir. Bu nedenle *Cryptosporidium*'un ışık mikroskobunda tanısı zordur⁴².

Cryptosporidium'un tanımlanmasında kullanılan çeşitli boyama yöntemleri bulunmaktadır: Ziehl Neelsen (10% H₂SO₄ kullanarak), Kinyoun'un aside dirençli boyama (soğuk boyama), Safranin metilen mavisi ve Giemsa boyama. Metenamin gümüş ve nigrosin ile de negatif boyama yapılarak *Cryptosporidium* ookistleri gösterilebilir^{82,85}. Nigrosinle boyamada zemin, bakteri ve mayalar yeşil boyanırken, ookistler boya almamaktadır⁸⁸. Ziehl Neelsen ve Kinyoun'un aside dirençli boyamalarında ookistler, mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı renkte hafif oval-yuvarlak görünümleriyle tanınırlar^{82,85}. Safranin boyamada ookistler, yeşil zeminde kırmızı-turuncu renkte görünürler. Kinyoun boyamada yeşil zeminde pembe-parlak kırmızı renkte görünürler⁸⁹. Ayrıca auramin/auramin rhodamin, kalkoflor beyazı ve Uvitex 2B gibi floresan boyalarla da ookistler boyanabilmektedir⁸². Auramine-rhodamine boyalı preparatlar 480-520 nm filtreyle incelendiğinde 4-6 µm'lik sarımsı yuvarlak yapılar *Cryptosporidium* ön tanısı alır⁸⁰.

Doku örneklerinde tanı için yapılan hematoksilin&eozen (H&E) gibi boyamalar çeşitli gelişim safhalarındaki *Cryptosporidium*'ları gösterebilse de parazitler kolayca gözden kaçabilmesi nedeniyle tanı için yeterli bir yöntem değildir⁹⁰.

Mikroskopik muayenede ookistleri yoğunlaştırmak için bazı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılan yöntemler formol - eter veya formol-etil asetat çöktürme yöntemleridir^{82,91}. Çöktürme yöntemlerinde ookistlerin küçük olduğu göz önüne alınarak en az 500 g'de 10 dakika santrifuj edilmesi önerilmektedir²⁴.

Yoğunlaştırma sonrası elde edilen çöktelden 10 µl lam üzerine yayılarak kuruması beklenir. Kuruyan preparat, üzerine immersiyon yağı eklenerek x400 büyütmede incelenir^{82,91}. Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi sonrası faz-kontrast mikroskopisi, taze veya formolle korunmuş örneklerde *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılmasında yararlıdır⁸⁰.

Boyalı preparat incelemesi sırasında 10 farklı sahada görülen ookist sayısına göre enfeksiyon şiddeti tanımlanabilmektedir. 10 ookiste kadar hafif şiddetli, 11-25 arası ookist için orta şiddetli ve 25'den fazla ookist için ise şiddetli enfeksiyon tanımlaması yapılabilir⁸².

Cryptosporidium tanısında kullanılan mikroskopinin avantajları olduğu gibi dezavantajları da mevcuttur. Hızlı ve ucuz bir yöntem olan mikroskopi yöntemi için deneyimli eleman gerekmesi, yöntemin tekrarlanabilir, izlenebilir olmaması yöntemin dezavantajlarıdır. Bunun dışında bağırsak parazitlerinin aralıklı atımı sebebiyle her zaman tek bir dışkı örneği etkeni saptayabilmek için yeterli olmayabilir⁸⁷.

Dışkıdaki *Cryptosporidium* ookist sayısının değişken olması, vücuttan atılımının aralıklı olması ve enfeksiyonun iyileşme döneminde non asit-fast yani "hayalet" ookistlerin sayısının artması nedeniyle yanlış negatif sonuçların alınabileceği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada tek bir yayma ile negatif olduğu düşünülen bir örneğin nested PZR ile pozitif sonuç verdiği görüldüğünde tekrar yapılan dört aside dirençli yaymanın sadece birinde tek bir ookist olduğu görülmüştür⁹².

Dezavantajları bulunması nedeniyle son yıllarda mikroskopiye ihtiyaç duyulmayan DFA, ELISA, PZR gibi alternatif yöntemlere yönelinmiştir⁸⁷.

2.10.2. Antijen-Antikor Arama Testleri

Antijen saptayan kitler, genellikle bir mikroorganizma saptamasına rağmen bazı kaset kitlerde birden fazla mikroorganizma saptanabilmektedir. *Giardia* ve *Cryptosporidium* antijenlerinin beraber arandığı bir çalışmada antijen tarama testinin (RIDA Quick Cryptosporidium/Giardia Combicasette antijen testinin (R-Biopharm AG, Germany), modifiye aside dirençli boyama tekniğine göre hem duyarlılığı hem de özgüllüğü %100 bulunmuştur⁹³. Koproantijen ELISA ile yapılan bir çalışmada ELISA'nın duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulunurken bir başka çalışmada sırasıyla

%100 ve %80,1 bulunmuştur^{94,95}. *Cryptosporidium* antijenlerini tanımaya yönelik monoklonal antikolarla kaplı kuyucukların kullanıldığı ELISA kitleri, protozoonun yüzey antijenlerini tanıyan floresan işaretli monoklonal antikor içeren DFA testleri, IFA testleri gibi ticari immünotest kitleri iş yükü fazla olan laboratuvarlarda tercih edilmektedir^{42,82}.

Antikor saptama testlerinde sıklıkla kullanılan iki antijen vardır; bunlar Cp23 ve Cp17 antijenleridir. Cp23, 27 kDa'luk ve Cp17, 17 kDa'luk birer antijendir. Bu antijenlerin konak hücreye invazyondan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bunlar serolojik belirteç olarak görev yaparak enfekte konakta antikor yanıtına yol açarlar. Bu nedenle antikor tarama testlerinde sıklıkla kullanılırlar ve saflaştırılmamış ookist antijenlerinin kullanıldığı yöntemlerden daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir^{96,97}.

ELISA testleri hızlı, kullanımı kolay, uzmanlık istemeyen ve mikroskopi yöntemine göre daha duyarlı testlerdir. IFA testi ise duyarlılık ve özgüllüğü ELISA'dan yüksek olan bir testtir^{42,82}. Modifiye asid-fast (MAF) yöntemiyle karşılaştırıldığında IFA'nın MAF'a göre duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %97 bulunmuştur. Ayrıca IFA'nın MAF'a göre daha az zaman alan, ancak pahalı bir yöntem olduğu bildirilmiştir²⁴. Ticari IFA kitlerinde kullanılan monoklonal antikolar hemen hemen tüm *Cryptosporidium* türlerine ait ookistlerle reaksiyon vermektedir. Bu nedenle IFA tür düzeyinde saptama yapamamaktadır⁴.

Yapılan bir çalışmada IFA'nın Ziehl-Neelsen MAF boyamadan daha duyarlı ve özgül olduğu, diğer enterik organizmalar ile çapraz reaksiyon vermediği bildirilmiştir⁹⁸. IFA'nın duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %92,6 ve %85,8 olduğu bildirilmiştir⁹⁹.

Antijen saptama yöntemi, *Cryptosporidium* tanısında boyama yöntemlerine göre daha duyarlı bir yöntem olmasına rağmen yanlış pozitiflik verebilmektedir¹⁰⁰. Ancak antijen tarama testinin hızlı sonuç vermesi, kolay değerlendirilebilmesi, zaman ve iş gücünün az olması, deneyimli bir personele ihtiyaç duyulmaması gibi nedenlerle kriptosporidiaz tanısında yararlı olacağı düşünülmüştür⁹³.

2.10.3. Moleküler Yöntemler

Her ne kadar boya yöntemleri kolay ve ucuz olması dolayısı ile avantajlı da olsa özellikle az sayıda ookist içeren dışkılarda veya tedavi sonrası kontrol amacıyla değerlendirilen örneklerde tek bir asit-fast yaymasının incelenmesi yetersiz kalabilmekte ve daha duyarlı başka bir yöntemle (PZR gibi) sonucun desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır⁹². Ticari tanı kitleri ile karşılaştırıldığında PZR, hızlı ve kolay kullanımı nedeniyle tercih edilebilmektedir. Ancak PZR sadece tanı değil tür/genotip/altgenotip ayrımı için de kullanılabilir⁸⁵. *Cryptosporidium*'un varlığını saptamak her ne kadar birden fazla tanı yönteminden elde edilen pozitif sonuçla mümkün olabilse de tür ve genotip açısından tanısını koymak sadece moleküler yöntemlerle mümkün olabilmektedir⁴². Bunlar dışında, antijen tarama testleri *Cryptosporidium*'un en önemli bulaş yolu olan su kaynaklarında parazit aramak için uygun değildir. Bu sebeple su kaynaklarında yapılan çalışmalarda da PZR yöntemi kullanılmaktadır¹⁰⁰.

Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde materyal olarak dışkı, doku ve safra örnekleri kullanılabilir⁸². Tanı yöntemlerinin en duyarlılarından biri olmasına rağmen DNA'nın amplifikasyonu sırasında örnek içinde bulunan bazı inhibitörler (bilirubin, safra tuzları gibi) amplifikasyonu azaltabilmektedir. Bu nedenle DNA ekstraksiyonundan önce ookistleri örnekten izole etmek için çeşitli konsantrasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile örnekteki inhibitörlerin interferansı azaltılabilmektedir. Konsantrasyon işlemi fekal örneklerde bir seri filtrasyon ve santrifüj basamaklarını içerir. Kabaca bahsetmek gerekirse; telden süzdürüldükten ya da düşük hızda santrifüjle dışkıdaki kaba partiküller uzaklaştırıldıktan sonra tuzlu suda yüzdürme (flotasyon) veya aralıklı olarak süzkroz veya sezyum dansite gradient santrifüjleme yapılır⁴². Ayrıca formaldehitli dışkılarda *Cryptosporidium* aranması sonucunda görülen düşük duyarlılığın DNA ekstraksiyonu öncesinde PZR'nin formaldehitle inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir⁹².

Cryptosporidium'un saptanmasında çeşitli PZR yöntemleri kullanılabilir. Bunlar arasında konvansiyonel PZR, Gerçek zamanlı PZR, nested PZR, multipleks PZR, PZR-RFLP bulunmaktadır⁴². Kriptosporidiaz tanısında kullanılan PZR yöntemlerinde daha çok 18S rRNA, 70 kDa Isı şok protein 70 (HSP70) ve ookist duvar

proteini (COWP), trombospondin ilişkili adezin proteinleri 1 ve 2, hedef bölgeler olarak kullanılmaktadır^{42,82,101}.

Gerçek zamanlı PZR’de, PZR sonucu oluşan nükleik asit ürünlerinin çift zincirli DNA arasına giren floresan bir boya ya da floresan ile işaretli problemler aracılığıyla reaksiyon sırasında izlenebilmektedir. PZR ürünü ile floresan yoğunluğu arasında korelasyon vardır. Gerçek zamanlı PZR’de, döngülerin hızlı uygulanması ve floresan ölçümü yardımıyla saptamanın aynı zamanda yapılabilmesi nedeniyle toplam test süresi kısaltılmıştır. PZR sonrası başka bir işleme (agaroz jelde yürütme gibi) gerek yoktur. Çoğaltma ve saptamanın aynı tüp içinde gerçekleşmesi nedeniyle kontaminasyon riski azaltılmıştır. Termal döngü cihazı ve florimetre aynı cihaz içinde bulunur. Manuel işlem gerektiren az sayıda ekipman içermesi nedeniyle konvansiyonel PZR yöntemleriyle karşılaştırıldığında gerçek zamanlı PZR’yi uygulamak daha kolaydır. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyonu kapalı bir sistem içinde gerçekleşiyor olduğundan konvansiyonel PZR’deki gibi hava kontrollü odalara ihtiyaç yoktur ve kontaminasyon gerçek zamanlı PZR’de çok daha azdır. Gerçek zamanlı PZR’de SYBR Green boyası, özgül hibridizasyon problemleri veya Taqman problemleri kullanılarak PZR ürünleri saptanmaktadır¹⁰¹.

Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemler dışında Western blot, floresan in situ hibridizasyon, izoenzim analizi ve NASBA gibi moleküler yöntemler de PZR’ye alternatif olarak bulunmaktadır⁴². NASBA yaklaşık beş oosiste kadar olan sayılarda dahi saptama yapabilmektedir. Ancak canlı olmayan oosistleri saptayamamaktadır¹⁰².

2.10.4. Hücre Kültürü

Cryptosporidium, insan kolon kanseri hücreleri (Caco-2) ve insan ilioçekal adenokarsinom hücreleri (HCT-8) gibi epitel hücrelerinde çoğaltılabilmektedir. Hücre kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda, su örneklerindeki inhibitörlerden etkilenmeyen, sadece enfekte oosistlerin saptanabildiği, sonuçların fare infektivite deneyleriyle paralellik gösterdiği ve oosist konsantrasyonu ile ilgili tahmin yapılabilen hücre kültür teknikleri geliştirilmiştir. Tüm bu avantajlarına rağmen kültür için gerekli araç-gereçlere ihtiyaç duyulması, hücreler arası şekillerin gelişimi için 24-72 saat gibi bir süreye ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları da bulunmaktadır⁴².

Kullanılan eksistasyon protokolü, konak hücre tipi ve olgunluğu, pH ve besiyeri içeriği gibi kültür şartları *Cryptosporidium*'un kültürde üretilmesini etkileyen önemli faktörlerdir. Kültür protokollerinde görülen farklılıklar in vitro kültür sonuçlarını ciddi şekilde etkileyebilmektedir¹⁰³.

2.11. TEDAVİ

Bağışıklık sistemi normal kişilerde tedavi gerekli olmamakla birlikte dehidratasyon durumunda sıvı ve elektrolit kaybını karşılamak üzere oral veya intravenöz replasman tedavisi uygulanmaktadır^{5,104}. Bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar kullanan (kanser, transplantasyon tedavileri sırasında) kişilere bu ilaçları kullanmayı bırakmaları önerilmektedir. AIDS veya konjenital bağışıklık yetmezliği olanlarda sadece destekleyici tedavi mümkündür⁵. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ise daha fazla sıvı, elektrolit, kalori, yağ, karbonhidrat ve aminoasit replasmanı ile ilaç tedavisi başlanmalıdır¹⁰⁴.

Özellikle AIDS'li hastalarda CD4+ hücre sayısı 200'ün altına düşmektedir. Bu durumda kriptosporidiaz tedavisine başlamadan önce antiretroviral tedavi ile CD4+ sayısının yükseltilmesi gerekmektedir¹⁰⁴.

Cryptosporidium sıklıkla su kaynaklı salgınlara yol açabildiği için bağışıklığı baskılanmış hastalara içme sularını kaynatarak içmeleri tavsiye edilir. Kriptosporidiaz, antiretroviral kombinasyon tedavisine genellikle cevap verir³².

Tedavide paramomisin, nitazoksanit ve son zamanlarda makrolidler kullanılmaktadır. AIDS tedavisindeki gelişmeler sayesinde hastalığa bağlı semptomlar giderek azalmaktadır²⁹. Paramomisinle tedavide, tedaviye yanıtın %67 oranında olduğu, tekrarlanan yaygın görüldüğü ve uzun süreli başarının sadece %33'ünde görüldüğü bildirilmiştir².

Kriptosporidiaz tedavisi için nitazoksanit kullanımında %52 oranında klinik tabloda azalma görülürken, parazitolojik tabloda %38'lik bir azalma görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca nitazoksanit ve spiramisin birlikte kullanımında mortalitede %76 düşüş olduğu bildirilmiştir¹⁰⁵.

Ayrıca nitazoksanit, A.B.D. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1-11 yaş arasındaki çocuklarda kriptosporidiaz tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Ayrıca daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde de kullanılabilir. 1-4 yaş arası çocuklarda üç gün, 100 mg; 4-11 yaş çocuklarda üç gün, 200 mg ve yetişkinlerde üç gün, günde iki kez 500 mg kullanılması önerilir. HIV ile enfekte kişilerde CD4+ sayısı 50'nin üzerinde olanlarda 14 gün boyunca günde iki kez 500-1000 mg nitazoksanit önerilir^{2,106}. Tedavi uygulanan hastalarda 3-4 hafta sonra kontrol önerilmektedir⁸⁰.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışma izlemli HIV-1 pozitif hastalarda *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis* ve *Microsporidium* sp. gibi fırsatçı parazitlerin araştırıldığı kombine bir çalışmanın *Cryptosporidium* kısmını oluşturdu³. Bu kombine, kesitsel ve tanımlayıcı amaçlı çalışma için T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü'nde izlenen 100 HIV-1 ile enfekte gönüllü bireyden 31.03.2011 - 29.12.2011 tarihleri arasında dışkı örnekleri randomize olarak toplandı. Toplanan örnekler, üç farklı parazit araştırması için üç tez öğrencisi arasında paylaşıldı.

Örnekleri toplanan 100 HIV-1 pozitif bireyden dokuzu (olgu no: 33, 76, 78, 82, 83, 84, 98, 99, 100) dışkı miktarlarının yetersizliği, örneğin taşıma ve saklanma koşullarındaki olumsuzluk, örneğin idrar ve benzeri sıvılarla karışmış olması gibi nedenlerle çalışma dışı bırakıldı.

Kombine ve tanımlayıcı amaçlı çalışmanın *Cryptosporidium* kısmında izlemli HIV-1 pozitif hastalarda *Cryptosporidium* insidansını araştırmak ve bu hastalarda izlemin önemini vurgulamak amaçlandı. Çalışmanın etik kurul onayı (14.01.2011 tarih ve 151 sayılı) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verildi.

Çalışmaya aldığımız olguların altısında sifiliz, altısında tüberküloz, beşinde HBV, ikisinde toksoplazmoz, ikisinde EBV, birinde HCV, birinde Anti-HAV, birinde anal fistül ve kolit ve birinde de seboreik dermatit ek hastalık olarak bildirildi. Erkek hastaların 20 (%28,6)'sinde bir veya birden fazla, kadın hastaların ise altısında (%28,6) ek hastalık vardı.

HIV-1 pozitif hastaların dışkı örnekleri şekillerine göre sulu, gevşek, yumuşak ve şekilli olmak üzere dört grupta incelendi. HIV-1 pozitif bireylerin örneğin alındığı tarihteki yaşı, cinsiyeti, CD4+ ve HIV-RNA sayıları, ek bir hastalıklarının olup olmadığı, tanı ve tedavi süreleri kaydedildi.

Her bir dışkı örneği üçe ayrıldı; bir kısmı formol eter çöktürme yöntemi uygulanarak Modifiye Ziehl-Neelsen boyama yapmak için, bir kısmı ELISA testi için,

bir kısmı ise gerçek zamanlı PZR yöntemi için çalışma gününe kadar -20°C’de derin dondurucuda saklandı.

3.2. Olgu Gruplarında *Cryptosporidium* Araştırılmasında Kullanılan Test ve Yöntemleri

3.2.1. Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi

Modifiye Ziehl-Neelsen boyama yöntemi, *Cryptosporidium*’un yanı sıra *Cyclospora*, *Microsporidia*, *Isospora* gibi diğer fırsatçı protozoonların da görülmesini sağladığından ve ayrıca rutin laboratuvar koşullarında uygulanabilirliğinin yüksek olması sebebiyle seçildi^{6,23}.

Çalışmamızda Modifiye Ziehl-Neelsen boyama yönteminde ticari bir boya kiti (Gül Boya Laboratuvarı-İstanbul-Türkiye) kullanıldı.

Kit içeriği

Kit içerisinde karbol-fuksin, metilen mavisi ve asit alkol çözeltileri bulunmaktadır.

Boyama metodunun uygulanması

1. Formol eter çöktürme yöntemiyle hazırlanmış dışkı örneğinin ince olarak yayıldığı ve kurutulduğu lamin örnek bulunan yüzeyi, “karbol fuksin çözeltisi” ile tamamen kaplandı.
2. Preparat, beş dakikadan az bir süre alttan ısıtıldı.
3. Lam üzerindeki boya distile suyla 15 saniye yıkanarak giderildi.
4. Preparat 15 saniye “asit alkol çözeltisi” ile yıkandıktan sonra silkelenerek ayıraç uzaklaştırıldı.
5. Preparat tekrar distile su ile 15 saniye yıkandı.

6. Preparatın üstü “metilen mavisi çözeltisi” ile örtüldü ve 30 saniye sonra silkelenerek bu ayıraç da uzaklaştırıldı.
7. Preparat distile suyla tekrar 15 saniye yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı.
8. Lamın altında kalan boya kalıntıları bir peçete ile silindi.
9. Kurumuş olan boyalı preparat, ışık mikroskobunda x100’lik immersiyon objektifinde immersiyon yağı damlatılarak incelendi.

3.2.2. ELISA Yöntemi

Cryptosporidium antijen testi, *Cryptosporidium* Fekal ELISA kiti (Diagnostic Automation, Inc., Calabasas, CA) ile antikor kaplı platelerde sandviç ELISA yöntemi ile yapıldı.

Kit içeriği

- Anti- *Cryptosporidium* poliklonal antikor içeren kuyucuklar
- Enzim konjugat
- Kromojen
- Yıkama Solüsyonu (x20)
- Dilüsyon tampon
- Pozitif ve negatif kontrol
- Stop solüsyon

Testin uygulanması

1. Tüm kit içeriği kullanılmadan önce oda ısısına getirildi ve kullanılacak olan her reaktif, vorteks ile karıştırıldı.
2. -20°C’de saklanan dışkı örnekleri oda ısısına getirildi.
3. Örnek dilüsyon tüpleri içine konan 0,7 ml dilüsyon tampon ve bezelye

büyükliğindeki (yaklaşık 0,1 gr) dışkı örneği önce bir çubuk yardımı ile daha sonra vorteksle iyice karıştırıldı.

4. Numaralandırılmış ELISA kuyucuklarına, sulandırılmış örnekler, pozitif ve negatif kontrolün her biri 100'er µl olacak şekilde konuldu.
5. Örnekleri ve kontrolleri içeren kuyucuklar 60 dakika oda ısısında (15-25°C) inkübe edildi.
6. Kuyucuklar inkübasyon sonrasında beş kez dilüe edilmiş yıkama solüsyonu ile yıkandı.
7. Yıkama sonrası her kuyucuğa iki damla enzim konjugat konuldu ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
8. İkinci inkübasyon sonrası tekrar beş kez yıkanan kuyucukların her birine iki damla kromojen eklendi ve 10 dakika inkübe edildi.
9. Inkübasyon sonrası iki damla stop solüsyon ile reaksiyon durduruldu ve beş dakika içinde ELISA okuyucu ile 450 nm'de sonuçlar okutuldu.

Sonuçların değerlendirilmesi

Üretici firmanın talimatı doğrultusunda ELISA okuyucuda 450 nm'de okunarak absorbans değerleri 0,08 OD ve üzerinde bulunan örnekler, *Cryptosporidium* antijeni yönünden pozitif, 0,08 OD'nin altında bulunan sonuçlar ise negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3. PZR Yöntemi

Çalışmamızda RT-PZR yöntemi ile *Cryptosporidium* aranması sırasında ekstraksiyon için QIAGEN QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya), amplifikasyon için “Primerdesign™ Genesig® Kit for *Cryptosporidium* (Crypto) genomes” gerçek zamanlı PZR kiti (Primerdesign Ltd, Southampton, Birleşik Krallık) ve mastermix olarak 2x QuantiTech Probe PZR Mastermix (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı. PZR çalışması QIAGEN Rotor Q gerçek zamanlı PZR (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) cihazında yapıldı.

Taqman prob bazlı gerçek zamanlı PZR uygulamasında kullanılan proplar, *Cryptosporidium* ookist duvar proteini (COWP) gen bölgelerini hedef alan özgül bölgeleri amplifiye etmekteydi.

3.2.3.1. DNA ekstraksiyonu

Her örneğin DNA izolasyonunda QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı ve aşağıda verilen protokol uygulandı. Çalışmanın kontrolü için PZR aşamasında kullanılacak olan ve “Primerdesign™ Genesig® Kit for *Cryptosporidium* (Crypto) Genomes” PZR kiti içinde bulunan internal kontrol, ekstraksiyon aşamasında eklendi. Kullanılacak olan internal ekstraksiyon kontrol primer/probe karışım, DNAase/RNAase free su eklenerek 165 µl hacme tamamlandı. Çalışmada HIV-1 pozitif hastalardan toplanan ve çalışma gününe kadar -20°C’de saklanan dışkı örnekleri kullanıldı.

Ekstraksiyon kit içeriği

- QIAamp DNA mini Stool column
- Toplama tüpleri (2 ml)
- InhibitEX Tablet
- Tampon ASL
- Tampon AL
- Tampon AW1
- Tampon AW2
- Proteinaz K

Ekstraksiyon prosedürü

1. 150-200 mg dışkı örneklerinden 2 ml'lik santrifüj tüplere konuldu. Sıvı formda olan dışkı örneklerinden ise 200 µl konuldu.
2. Örneklerle 1,4 ml Buffer ASL eklendi. Bir dakika vorteks ile karıştırıldı ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi.
3. 37°C'deki inkübasyon sonunda örnekler vortekslendi ve 70°C'de 5 dakika ısıtıldı.
4. Isıtıcıdan alınan örnekler 15 saniye vortekslendi ve bir dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj edilen örneklerden 1,2 ml süpernatant alınarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve bu örnek tüpleri içine birer adet inhibitEX tablet atıldı.
6. İnhibitEX tablet içeren örnek tüpleri bir dakika boyunca vortekslendi ve sonrasında bir dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Örnek tüpleri üç dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Örnek tüpleri içindeki süpernatantlar, 1,5 ml'lik yeni tüplere aktarıldı ve bu tüpler üç dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
9. 1,5 ml'lik boş santrifüj tüplerine 15'er µl proteinaz K koyuldu; ardından tüplere sırasıyla 200 µl süpernatant, 200 µl Buffer AL ve 4 µl internal ekstraksiyon kontrol primer/probe karışım eklendi.
10. Tüpler 15 saniye vortekslendi ve 10 dakika boyunca 70°C'de ısıtıldı.
11. 70°C'den alınan tüplere 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
12. 2 ml'lik toplama tüpleri içine bir QIAamp spin column konuldu ve içine etanol de eklenmiş olan örnek karışımları, membran içeren spin column'a aktarıldı. Spin column kapağı kapatılarak bir dakika süreyle 14.000 rpm'de santrifüj edildi.

13. Santrifüj sonrası altta kalan tüpler atıldı ve spin column başka toplama tüpleri içine yerleştirildi.
14. Dikkatlice açılan QIAamp spin column'lar içine 500'er µl Tampon AW1 eklendi ve spin column kapakları kapatılarak tekrar bir dakika süreyle 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
15. Santrifüj sonrası altta kalan tüpler atıldı ve spin column'lar başka toplama tüpleri içine yerleştirilerek üstüne 500'er µl Tampon AW2 eklendi.
16. Kapağı kapatılan spin column'lar üç dakika süreyle 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
17. Santrifüj sonrası spin column'lar boş 2 ml'lik toplama tüpleri içine yerleştirilerek bir kez de üstüne herhangi bir solüsyon konulmadan santrifüj edildi. Bu basamak spin columnlar içindeki membranlarda Tampon AW2 kalması olasılığını elimine etmek içindir.
18. Son olarak spin column yeni 1,5 ml'lik santrifüj tüpleri içine yerleştirildi ve membranlar üzerine 100'er µl Tampon AE konuldu. Spin columnların kapağı kapatılarak üç dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra bir dakika süreyle 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen izolatlar -20°C'de saklandı.

3.2.3.2. Gerçek zamanlı PZR uygulanması

Gerçek zamanlı PZR kit içeriği

- Crypto özgül primer/probe mix
- Crypto positive kontrol template
- RNAase/DNAase free su
- 2x QuantiTech Probe PZR Mastermix

Gerçek zamanlı PZR prosedürü

1. Çalışma öncesi gerekli reaktifler RNAase/DNAase free su ile sulandırılarak son hacme getirildi. Pozitif kontrol sulandırılarak standart dilüsyon serisi oluşturuldu. Standartlar aşağıdaki şekilde hazırlandı (Tablo 3-1):
 - a. Her biri 900 µl RNAase/DNAase free su içeren dilüsyon tüpleri hazırlandı ve 1'den 5'e kadar numaralandırıldı.
 - b. 1 numaralı tüpe 100 µl pozitif kontrol konuldu ve vorteksle karıştırıldı.
 - c. Pipet değiştirilerek 1 numaralı tüpten 100 µl, 2 numaralı tüpe eklendi ve bu uygulama 5 numaralı tüpe kadar devam etti. En son 5 numaralı tüpten alınan 100 µl çöpe atıldı. Böylece 5 standart dilüsyon hazırlanmış oldu.
2. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda bir reaksiyon karışımı hazırlandı ve her örnek için numaralanmış test tüplerine dağıtıldı. Reaksiyon karışımının içeriği Tablo 3-2'de verilmiştir.
3. Her hasta için reaksiyon karışımı içeren test tüpüne 5'er µl örnek DNA izolatları konuldu, negatif kontrol tüpüne 5 µl RNAase/DNAase free su eklendi, standart tüplerine ise standart konsantrasyonlarından 5'er µl eklendi. Her tüpte son hacim 20 µl idi.
4. PZR test tüpleri, gerçek zamanlı PZR cihazına yüklendi.
5. PZR cihazındaki amplifikasyon protokolü, kit içeriğindeki bilgilere göre ayarlandı. Amplifikasyon protokolü, Tablo 3-3'de verilen koşullarda ve FAM ve VIC (green ve yellow) kanalları kullanılarak tamamlandı.

Tablo 3-1: Standart dilüsyon serisi

STANDARTLAR	KOPYA SAYISI
Standart 1 (Pozitif Kontrol)	$2 \times 10^5 / \mu\text{l}$
Standart 2	$2 \times 10^4 / \mu\text{l}$
Standart 3	$2 \times 10^3 / \mu\text{l}$
Standart 4	$2 \times 10^2 / \mu\text{l}$
Standart 5	$2 \times 10 / \mu\text{l}$

Tablo 3-2: Her örnek için kullanılan reaksiyon karışımının içeriği

Komponentler	Miktar
2x QuantiTech Probe PZR Mastermix	10 μl
Crypto özgül Primer/Probe mix	1 μl
RNAase/DNAase free su	4 μl
Final Konsantrasyon	15 μl

Tablo 3-3: Amplifikasyon protokolü

	Aşama	Süre	Sıcaklık
50 Döngü	Enzim aktivasyonu	15 dakika	95°C
	Denatürasyon	10 sn	95°C
	Bilgilerin toplanması	60 sn	60°C

PZR sonuçlarının değerlendirilmesi

Bir örneğin Green kanalı grafiğindeki PZR eğrisinin, threshold çizgisini kesmiş olması, yani pozitiflik sınırının üzerine çıkmış olması, örneğin pozitif olduğunu göstermektedir. Örneğin pozitifliği (içerdiği kopya sayısı) ne kadar yüksekse, internal kontrolün baskılanması (Yellow kanalında) o derece fazlalaşır. Yani örneğin PZR eğrisi ile o örneğin internal kontrolünün eğrisi ters orantılıdır.

Bir örneğin negatif olarak değerlendirilebilmesi için PZR eğrisinin, threshold çizgisini kesmemiş olması yani pozitiflik sınırının altında kalmış olması gerekmektedir. Negatif kontrolün doğruluğundan emin olmak için internal kontrol kanalındaki (Yellow kanalı) PZR eğrisinin threshold çizgisini geçmiş olması, yani internal kontrolün pozitif olması gerekmektedir.

3.3. Diğer Testler ve Yöntemler

3.3.1. Diğer İmmünolojik Testler

Çalışma grubunu oluşturan HIV-1 ile enfekte bireylerin CD4+ ölçümleri Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında flow sitometri yöntemi ile yapıldı. Flow sitometrik inceleme, Becton Dickinson FACSCalibur cihazı (Becton Dickinson, San Jose, CA) ve BD Simultest IMK Plus kiti içindeki CD4+/ CD8+ monoklonal antikorlar (Becton Dickinson, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.2. Diğer Virolojik Testler

Çalışma grubunu oluşturan HIV-1 ile enfekte bireylerin HIV-RNA ölçümleri Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında COBAS TaqMan 48 (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Almanya) cihazı ve COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman HIV-1 Test, v2.0 kiti (Roche

Diagnostics, Almanya) ile kantitatif PZR yöntemi ile çalışıldı. Testin saptama aralığı $20 - 10^7$ kopya/ml idi.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda NCSS-PASS 2000 istatistik paket programı kullanılmış olup verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler frekans ve yüzde olarak verildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Ki-kare testi ile değerlendirildi ve p değeri $p < 0,05$ ve iki yönlü olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Doksanbir HIV-1 pozitif gönüllü hastanın dışkı örneği, *Cryptosporidium* varlığı açısından modifiye Ziehl-Neelsen boyama, ELISA ve gerçek zamanlı PZR yöntemleriyle incelendi. Çalışma grubuna ait demografik, klinik ve virolojik bilgiler (yaş, cinsiyet, ek hastalık, CD4+ sayısı, HIV-RNA düzeyi, dışkı şekli) Tablo 4-1’de gösterildi.

Tablo 4-1: Hastaların demografik, klinik ve virolojik bilgileri

Olgu No	Cinsiyet	Yaş	Tanı süresi (yıl)	Tedavi süresi (yıl)	Ek Hastalık	HIV-RNA Düzeyi (kopya/ml)	CD4+ Sayısı (/mm ³)	Dışkı Şekli
1	E	49	11	11	Yok	<20	620	Gevşek
2	E	33	1	Yok	Yok	157000	580	Gevşek
3	E	30	1	5 Ay	Yok	<20	267	Şekilli
4	E	41	1	3 Ay	Yok	241	312	Şekilli
5	E	26	1	Yok	Yok	<20	560	Yumuşak
6	E	38	6 Ay	Yok	Yok	563	725	Yumuşak
7	E	35	5	3 Yıl	Yok	<20	500	Yumuşak
8	E	30	3	3 Yıl	Yok	<20	20	Sulu
9	E	54	1	1 Yıl	Yok	47	440	Gevşek
10	E	46	2	Yok	Yok	<20	631	Yumuşak
11	E	46	1	Yok	Sifiliz	8290	260	Sulu
12	K	25	1	Yok	Anal Fistül ve Kolit	59	490	Şekilli
13	E	41	1	1 Yıl	Yok	560	375	Gevşek
14	E	27	1	Yok	Yok	<20	450	Yumuşak
15	E	28	1,5	Yok	Yok	<20	246	Yumuşak

16	K	26	1	Yok	Yok	<20	520	Yumuşak
17	K	51	11	10	Yok	<20	544	Gevşek
18	E	37	10	4	Anti-HAV	<20	1016	Gevşek
19	E	42	4	4	Seboraid	350	358	Gevşek
20	E	48	10	9	AIDS	4327	28	Gevşek
21	E	28	2	1	Yok	<20	207	Gevşek
22	K	39	11	7	Yok	<20	1000	Gevşek
23	E	44	11	7	Yok	<20	2562	Gevşek
24	E	10	10	7	TBC	3540	190	Gevşek
25	E	44	4	4	Sifiliz, AIDS	<20	360	Gevşek
26	K	30	6	5	Yok	<20	692	Gevşek
27	E	56	2	1	Yok	<20	421	Gevşek
28	E	58	8	3	Yok	868	1078	Gevşek
29	E	30	1	1	Yok	56452	439	Gevşek
30	E	41	2	---	Yok	<20	520	Gevşek
31	E	37	3	2	Yok	<20	237	Gevşek
32	E	46	5	3	Yok	<20	470	Gevşek
34	E	50	3	3	Sifiliz	<20	315	Sulu
35	E	45	13	13	Yok	200	784	Sulu
36	K	41	11	11	Yok	851	249	Sulu
37	E	54	5	5	Yok	<20	887	Sulu
38	E	36	8	7	TBC	<20	785	Sulu
39	E	38	10	8	Yok	5240	89	Gevşek
40	K	41	10	5	HCV(+)	408000	24	Gevşek
41	K	33	3	1	TBC	107170	403	Gevşek
42	E	28	1	1	Yok	6371	845	Şekilli
43	E	44	3	3	TBC	115	287	Gevşek
44	E	56	4	3	Yok	<20	636	Gevşek
45	E	82	5	4	Yok	<20	350	Gevşek
46	E	61	3	3	Sifiliz	<20	669	Gevşek

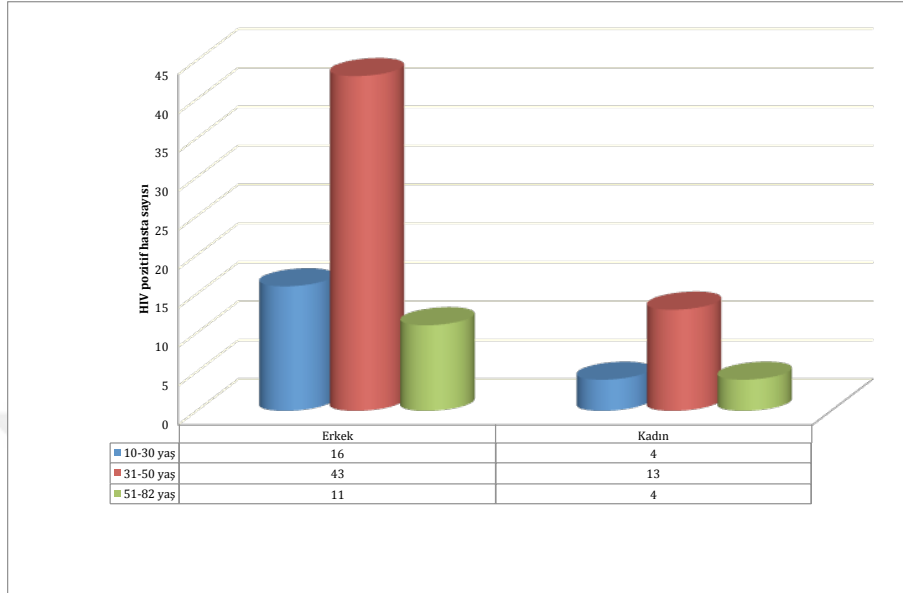
47	E	37	6	1	HBV(+)	872	470	Gevşek
48	E	45	1	---	Yok	<20	614	Gevşek
49	E	28	1	---	Toxoplazmoz, EBV(+), CMV(+)	<20	422	Gevşek
50	K	47	1	1	AIDS	<20	275	Gevşek
51	K	35	7	2	Yok	<20	456	Gevşek
52	E	34	7	7	Yok	129959	65	Gevşek
53	K	33	10	9	HBV(+)	<20	472	Gevşek
54	E	45	10	10	HBV(+)	<20	1932	Gevşek
55	E	36	4	2	EBV(+)	25250	401	Gevşek
56	E	75	12	12	Yok	<20	275	Gevşek
57	E	47	1	1	Toxoplazmoz	<20	128	Gevşek
58	K	32	1	1	Yok	<20	285	Gevşek
59	E	44	1	---	Yok	<20	286	Gevşek
60	E	46	3	2	Yok	199	363	Gevşek
61	K	47	13	8	TBC	<20	736	Sulu
62	E	41	2	2	Yok	<20	609	Sulu
63	E	74	9	8	Yok	20	332	Sulu
64	E	68	5	4	Yok	85	1065	Sulu
65	E	45	9	7	AIDS	<20	259	Sulu
66	E	34	7	3	Yok	47	359	Sulu
67	K	36	5	---	Yok	<20	1146	Sulu
68	K	61	13	13	Yok	<20	390	Sulu
69	E	38	1	---	Yok	748	400	Sulu
70	E	23	1	1	Yok	>20	444	Yumuşak
71	E	30	6	6	HBV(+)	20065	289	Yumuşak
72	K	48	2	2	Yok	<20	280	Yumuşak
73	E	43	3	---	Yok	907	326	Yumuşak

74	E	22	1	1	TBC	66715	297	Gevşek
75	E	31	2	---	Yok	19900	522	Yumuşak
77	E	25	1	1	Yok	3102	748	Gevşek
79	K	57	2	1	Yok	<20	396	Yumuşak
80	E	59	1	1	Sifiliz/HBV(+)	<20	737	Yumuşak
81	K	45	1	---	Yok	<20	268	Sulu
85	K	30	9	6	Yok	23298	256	Şekilli
86	E	27	2	1	Yok	7596	626	Şekilli
87	E	24	3	3	Yok	<20	645	Gevşek
88	E	47	3	3	Yok	<20	254	Gevşek
89	E	42	5	5	Yok	20	286	Yumuşak
90	K	32	5	4	Yok	<20	178	Gevşek
91	E	35	1	---	Yok	<20	620	Yumuşak
92	E	50	10	5	Yok	<20	992	Yumuşak
93	E	37	10	3	Yok	<20	580	Yumuşak
94	E	31	5	4	Yok	<20	620	Yumuşak
95	E	45	2	2	Sifiliz	430000	692	Sulu
96	K	60	12	2	Yok	<20	183	Gevşek
97	E	32	6	2	Yok	40	648	Yumuşak

E: Erkek; K: Kadın; AIDS: Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu; Anti-HAV: Anti Hepatit A Virus Antikoru; TBC: Tüberküloz; HCV: Hepatit C Virusü; HBV: Hepatit B Virusü; EBV: Epstein-Barr Virusü; CMV: Sitomegalovirus

Çalışmaya dahil edilen 91 HIV-1 pozitif hastanın 70 (%76,9)'ini erkek, 21 (%23,1)'ini kadın hastalar oluşturmuştur. Cinsiyete göre yaş dağılımı yapıldığında erkek hastaların 16'sının (%17,6) 10-30 yaş grubunda, 43'ünün (%47,3) 31-50 yaş grubunda, 11'inin 51-82 yaş grubunda olduğu görülmüştür. Kadın hastalardan dört hasta (%4,4) 10-30 yaş, 13 hasta (%14,3) 31-50 yaş grubunda ve dört hasta (%4,4) ise 51-82 yaş grubundadır (Şekil 4-1). Hastaların tanı zamanı, örneklerin toplanmasından altı ay öncesi ile 13 sene öncesi arasında değişmektedir. HIV-RNA düzeyi (kopya/ml) <20-430.000 arasında değişmektedir. Yaş aralığı 10 ile 82, ortalaması ise yaklaşık

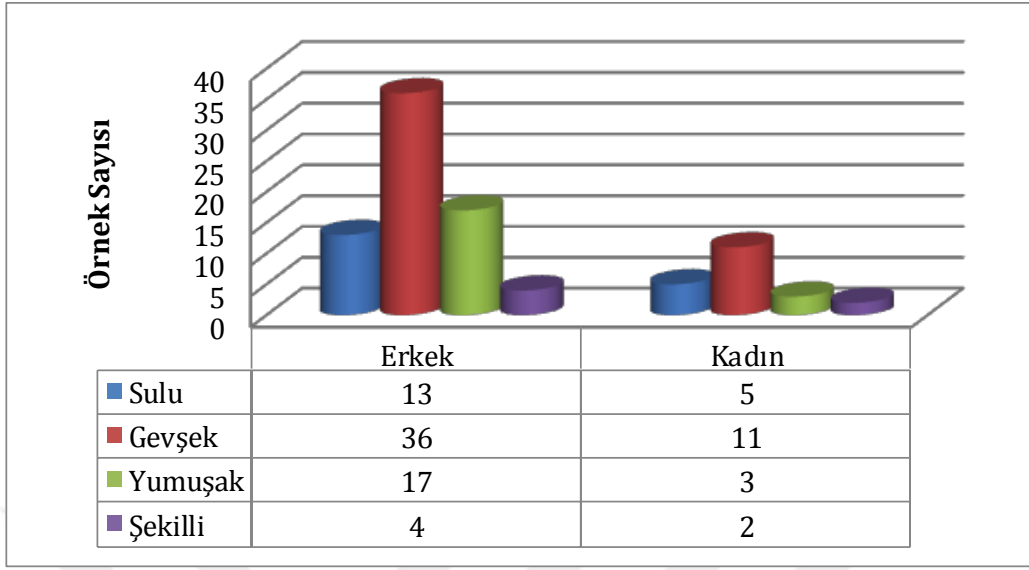
olarak 41'dir. HIV-1 pozitif hastaların demografik verilerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($X^2=1,31$; $p=0,72$).



Şekil 4-1: Hastaların cinsiyete göre yaş dağılımları

Toplanan 91 dışkı örneğinin makroskopisinde 13'ü erkeklerde, beşi kadınlarda olmak üzere toplam 18 (%19,8) sulu dışkı; 36'sı erkeklerde ve 11'i kadınlarda olmak üzere toplam 47 (%51,6) gevşek dışkı; 17'si erkeklerde ve üçü kadınlarda olmak üzere toplam 20 (%22) yumuşak dışkı; dördü erkeklerde ve ikisi kadınlarda olmak üzere toplam altı (%6,6) şekilli dışkı saptanmıştır. Cinsiyete göre dışkı şekillerinin dağılımı değerlendirilmiş, ancak cinsiyetler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($X^2=1,31$, $p=0,72$) (Şekil 4-2).

Hastalar CD4+ sayılarına göre gruplandırıldığında <200 hücre/ mm^3 CD4+ sayısına sahip dokuz hastanın altısının erkek, üçünün kadın olduğu, 200-349 hücre/ mm^3 CD4+ sayısına sahip 24 hastanın 18'inin erkek, altısının kadın olduğu, 350-499 hücre/ mm^3 CD4+ sayısına sahip 21 hastanın 15'inin erkek, altısının kadın olduğu ve >500 hücre/ mm^3 CD4+ sayısına sahip 37 hastanın 31'inin erkek, altısının kadın olduğu görülmüştür. Hastaların CD4+ T lenfosit sayıları 20 ile 2562 arasında değişmektedir ve ortalaması yaklaşık 499 olarak belirlenmiştir (Tablo 4-2).



Şekil 4-2: Çalışmaya alınan örneklerde cinsiyete göre dışkı şekli dağılımları

Tablo 4-2: CD4+ sayıları ve dışkı şekillerine göre cinsiyet dağılımı

CD4+ Dağılımı	<200 hücre/ mm ³ (9) E(6) / K(3)				200-349 hücre/ mm ³ (24) E(18) / K(6)				350-499 hücre/ mm ³ (21) E(15) / K(6)				>500 hücre/ mm ³ (37) E(31) / K(6)			
	S	G	Y	Ş	S	G	Y	Ş	S	G	Y	Ş	S	G	Y	Ş
Dışkı Şekilleri																
E	1	5	0	0	4	8	4	2	2	11	2	0	6	12	11	2
K	0	3	0	0	2	2	1	1	1	3	1	1	2	3	1	0

S: Sulu, G: Gevşek, Y: Yumuşak, Ş: Şekilli, E: Erkek, K: Kadın

4.1. Mikroskopi sonuçları

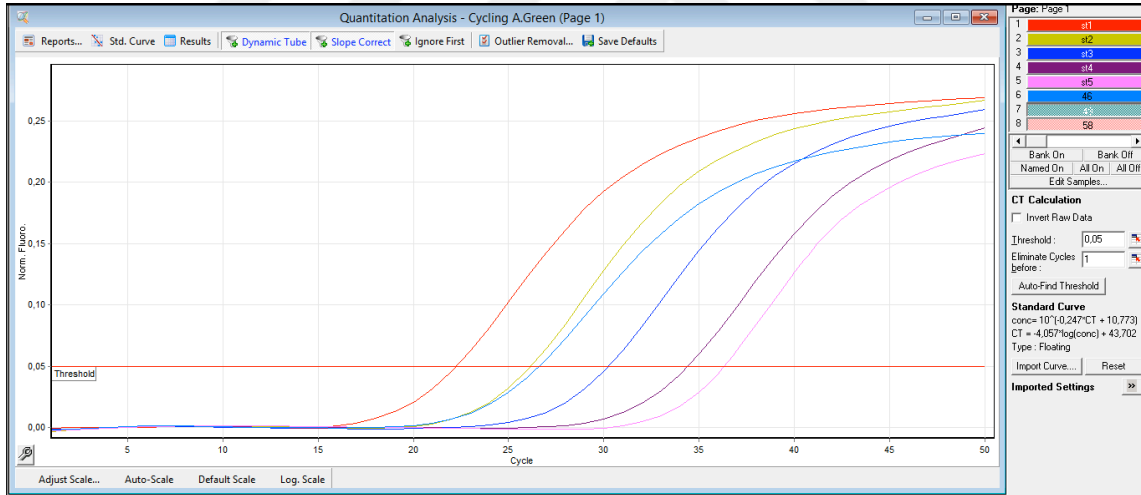
Örneklerin hiçbirinde modifiye Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookistine rastlanmadı.

4.2. ELISA sonuçları

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* antijeni sandviç ELISA yöntemi ile arandı ve absorbans değerleri $\geq 0,08$ OD olan örnekler pozitif, $< 0,08$ OD olan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi. Sonuçta bir pozitiflik (46 numaralı hasta) saptandı. Pozitif örneğin OD değeri: 0,150'dir.

4.3. PZR Sonuçları

Gerçek zamanlı PZR çalışması sonunda 91 örnekten sadece birinde (46 numaralı hasta) pozitiflik saptandı (Şekil 4-3, Tablo 4-3). PZR ile pozitif bulunmuş olan bu örneğin ELISA test sonucu da pozitif idi.



Şekil 4-3: Gerçek zamanlı PZR sonucunda pozitif saptanan örnek ve standartların grafik eğrileri

Tablo 4-3: Gerçek zamanlı PZR sonucunda pozitif saptanan örnek ve standartların değerleri

Renk	İsim	Tip	Ct	Hesaplanmış Kons. (kopya/ul)	Hesaplanan Kons. (kopya/ul)
	46. örnek	Örnek	26,65		16.436
	St 1	Standart	22,35	200.000	193.106
	St 2	Standart	26,25	20.000	20.784
	St 3	Standart	30,15	2.000	2,057
	St 4	Standart	34,35	200	193
	St 5	Standart	36,07	20	17

Kullanılan yöntemlere, hastaların CD4+ sayılarına, tedaviye alıp almamasına, hastaların tanı alma zamanına göre sırasıyla istatistiksel olarak değerlendirildi ve anlamlı fark bulunmadı ($X^2=1$, $p=0,60$; $X^2=1,47$, $p=0,68$; $X^2=0,23$, $p=0,88$; $X^2=0,54$, $p=0,90$) (Tablo 4- 4 / 7).

Pozitif bulunan örneğin sahibi olan hasta, dışkısı gevşek, üç yıl önce HIV-1 tanısı almış ve HIV tedavisine başlanmış, ek hastalık olarak sifilizi olan, HIV-RNA düzeyi <20 olan, CD4+ sayısı 669 olan 61 yaşında bir erkekti.

Tablo 4-4: *Cryptosporidium* varlığının üç yöntemle göre dağılımı

Yöntem	Pozitif	Negatif	Toplam
Mikroskopi	0	91	91
ELISA	1	90	91
PZR	1	90	91

($X^2=1$, $p=0,60$)

Tablo 4-5 : *Cryptosporidium* varlığının CD4+ sayılarına göre dağılımı

Cryptosporidium varlığı	<200 hücre/ mm³	200-349 hücre/ mm³	350-499 hücre/ mm³	>500 hücre/ mm³
Pozitif	0	0	0	1
Negatif	9	24	21	36
Toplam	9	24	21	37

(X²=1,47, p=0,68)Tablo 4-6 : *Cryptosporidium* varlığının HIV tedavisi bakımından değerlendirilmesi

Cryptosporidium varlığı	Tedavi alanlar	Tedavi almayanlar	Tedavisi hakkında bilgi olmayanlar	Toplam
+	1	0	0	1
-	80	9	10	90
Toplam	81	9	10	91

(X²=0,23, p=0,88)Tablo 4-7 : HIV-1 ile enfekte olgularda *Cryptosporidium* varlığının tanı alma sürelerine göre dağılımı

Tanı zamanı	<1 yıl önce	1-5 yıl önce	6-10 yıl önce	>10 yıl önce
+	0	1	0	0
-	1	58	21	10
Toplam	1	59	21	10

(X²=0,54, p=0,90)

5. TARTIŞMA

Cryptosporidium bağışıklık sistemi normal bireylerde kendiliğinden geçen orta şiddette gastroenterit ve ishale sebep olurken bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, özellikle son yıllarda ciddi seyreden ve uzun süreli enfeksiyonlara neden olması ve hatta ölümlere yol açması nedeni ile önem kazanmıştır^{4,5}.

Bağışıklık sistemi baskılanmış özellikle de HIV ile enfekte hastalarda kriptosporidiaz insidansı ve epidemiyolojisi hakkında pek çok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların sonuçları birbirinden çok büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Bu durumun sebebi coğrafik yerleşime, laboratuvar yöntemlerinin duyarlılığına, seçilen çalışma grubundaki farklılıklara ve sayıya, hastalığın safhasına bağlı olabilmektedir^{4,5}. HIV/AIDS hastalarında izlem, hayati önem taşımaktadır¹⁰⁷.

Yurdumuzda Ülçay ve ark. 10 günden uzun süreli ishali olan 36 bağışıklık yetmezlikli hasta ile yaptıkları çalışmada modifiye aside dirençli (MAF), direkt floresan antikor (DFA) ve PZR ile *Cryptosporidium* araştırmışlardır. Çalışma sonunda sadece bir hastada MAF ve DFA ile pozitiflik saptanırken, PZR ile hiçbir pozitiflik saptanamamıştır¹⁰⁸. Karadag ve ark.'nın 62 diyaliz hastasında yaptıkları çalışmalarında ise *Cryptosporidium* pozitifliği ELISA ile %2,1 oranında bulunmuştur¹⁰⁹. Aydın'da hemodiyaliz tedavisi gören 47 kronik böbrek yetmezlikli hasta ve 36 sağlıklı bireyin dahil edildiği bir çalışmada, kronik böbrek yetmezliği olan hastaların %6,4'ünde, sağlıklı grubun ise %2,1'inde *Cryptosporidium* tespit edildiği bildirilmiştir¹¹⁰. İshali olan solid tümörlü 72 hasta ve 50 bağışıklık sistemi yeterli hastanın dahil edildiği bir çalışmada 72 hastanın %8,3'ünde *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanırken, bağışıklık yeterli grupta *Cryptosporidium* ookisti saptanamamıştır¹¹¹. Eren ve ark.'nın çalışmasında 275'i bağışıklık sistemi baskılanmış, 178'i pediatri hastası, 22'si bağışıklık sistemi normal ancak gastroenterit şikayeti olan ve 55'i de kontrol grubu olan toplam 530 hastada dışkı örnekleri incelenmiştir. İnceleme sonunda MAF boyama ile %3,2 oranında pozitiflik bulunurken, ELISA yöntemi ile örneklerin %5,8'inde pozitiflik saptanmıştır¹¹². Kolombiya'da yapılmış bir çalışmada bağışıklığı baskılanmış 111 kişide modifiye Ziehl Neelsen boyama ile *Cryptosporidium* pozitifliği %3,6 olarak saptanmıştır¹¹³. Sreedharan ve ark.'ları ishali olan 560 kanser hastasında MAF

yöntemiyle *Cryptosporidium* insidansına bakmış ve hastaların yedisinde (1,3%) pozitiflik saptamışlardır¹¹⁴.

HIV ile enfekte hasta gruplarına bakıldığında *Cryptosporidium* görülme oranlarının değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Bu durum hastaların izlemli olup olmamasına, antiretroviral tedavi alıp almamasına, özellikle hastaların CD4+ sayılarına, sosyoekonomik durumlarının farklılığına ve araştırmada kullanılan tanı yöntemlerine göre değişebilmektedir. Yurdumuzda Okay'ın yaptığı bir çalışmada yarından fazlası 30-40 yaş grubunda bulunan 29 HIV ile enfekte hasta, *Cryptosporidium* açısından ELISA yöntemi ile incelenmiş; ancak, hastaların hiçbirinde *Cryptosporidium* tespit edilememiştir¹¹⁵. Brezilya'da yapılan bir çalışmada HIV/AIDS pozitif hastalarda enterik parazitler araştırılmış ve modifiye Ziehl-Neelsen yöntemi ile 500 hastadan sadece ishali olmayan bir hastada (%0,2) *Cryptosporidium* saptanmıştır¹¹⁶. Silva ve ark., Brezilya'da 52 HIV/AIDS hastasında safranin/metilen mavisi, modifiye trikrom boyama ve ELISA yöntemlerini kullanarak *Cryptosporidium* varlığını araştırmıştır. Boyama yöntemi ile üç hastada (%5,8), ELISA yöntemi ile dört (%7,7) hastada pozitiflik tespit edilmiştir. Hastaların üçünde her iki yöntemle de pozitiflik saptanmıştır¹¹⁷. Bizim çalışmamızda ise boyama yöntemi ile pozitiflik saptanmazken, ELISA ve PZR yöntemleri ile bir pozitiflik saptanmıştır.

Malezya'da Lim ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 66 HIV ile enfekte hastanın dışkı örneği modifiye Ziehl-Neelsen metodu ile incelenip, immünfloresan boyama ile karşılaştırılmış ve sonuçta *Cryptosporidium* sıklığı %3 olarak tespit edilmiştir¹¹⁸. Çin'de 302 HIV pozitif ve 303 HIV negatif bireyin dahil edildiği bir çalışmada MAF boyama ile *Cryptosporidium* prevalansı %5,6 bulunmuştur. HIV pozitif hastalarda prevalans %8,3 bulunmuşken HIV negatif bireylerde bu oran %3 olarak saptanmıştır¹¹⁹. Tayland'da 156 akut ishalleri HIV ile enfekte hastada yapılan çalışmada dışkı örnekleri modifiye Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanmış ve %12,8 oranında *Cryptosporidium* tespit edilmiştir¹²⁰. Cranendonk ve ark. 121 ishalleri ve 122 ishalsiz HIV pozitif hastanın dahil edildiği çalışmalarında HIV pozitif ishalleri hastalardaki pozitiflik oranını ishalsizlere göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. *Cryptosporidium* oranını, ishalleri HIV pozitif hastalarda %11 (13 hasta), ishalsiz olmayan hastalarda ise %3 (üç hasta) olarak saptamışlardır¹²¹. Bizim çalışmamızda ise *Cryptosporidium*, gevşek formda dışkısı olan hastada saptanmıştır.

Hindistan’da Jayalakshmi ve ark. 89 HIV/AIDS hastasının dışkı örnekleri ile yaptıkları çalışmada ELISA ile *Cryptosporidium* antijen prevalansını %12,4 (11/89) olarak bulmuşlardır¹²². Hindistan’da direkt mikroskopi, modifiye safranin boyama, Kinyoun asit-fast ve ELISA ile antijen arama yöntemlerinin kullanılarak *Cryptosporidium* pozitifliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise 450 HIV ile enfekte hastada %36,22 oranında pozitiflik saptanmıştır. Aynı çalışmada HIV negatif olduğu bilinen 200 kişilik grupta ise pozitiflik %21 olarak bulunmuştur⁸⁹. Yine Hindistan’da 34’ü kronik ishalli ve 79’u ishal hikayesi bulunmayan toplamda 113 HIV pozitif hasta ile 113 HIV negatif hastada MAF boyama tekniği ile *Cryptosporidium* araştırılan bir çalışmada ise kronik ishalli hastaların %20,6’sında, ishali olmayan hastalarda %2,5 oranında pozitiflik saptamışlardır. HIV negatif hastalarda ise *Cryptosporidium*’a rastlanmamıştır¹²³. Etiyopya’da 2007 yılında 268 HIV ile enfekte kişide formol-eter sonrası modifiye Ziehl-Neelsen yöntemi ile *Cryptosporidium* aranmış ve %34,3’ünde pozitiflik saptanmıştır¹²⁴. Tuli ve ark.’nın çalışmasında *Cryptosporidium* pozitifliği, HIV pozitif ishalli hastalarda %39,8; HIV negatif ishalli hastalarda ise %21 oranında bulunmuştur¹²⁵. Wumba ve ark.’nın 242 HIV pozitif hastayla yaptıkları çalışmalarında 13 (%5,4) hasta Ziehl Neelsen boyama ve gerçek zamanlı PZR yöntemiyle *Cryptosporidium* açısından pozitif saptanmıştır⁶. Peru’da %66’sının erkek, ortalama yaşın 31 ve ortalama CD4+ sayısının 131 hücre/ μ m olduğu 2490 HIV ile enfekte kişinin 230’unda (%9,2) modifiye asit fast boyama ile *Cryptosporidium* saptanmıştır¹²⁶. Bizim çalışmamızda ise hasta grubumuzun %76,9’u erkek, ortalama yaş yaklaşık 41 ve ortalama CD4+ T lenfosit sayısı 499 hücre/ μ m idi.

Literatürde moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmalara bakıldığında, *Cryptosporidium*’ların daha çok tür ve genotip düzeyinde incelendiği ya da birden fazla parazitin birlikte arandığı görülmektedir. Dolayısı ile pek çok çalışmada multipleks PZR, nested PZR veya PZR-RFLP yöntemleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda hem kullanım kolaylığı hem de mikroskopi ve ELISA gibi tür tayini yapılamayan yöntemlerle karşılaştırmak açısından cins düzeyinde saptama yapabileceğimiz bir gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır.

Hollanda’da yapılan bir çalışmada gastrointestinal şikayetleri olan 397 hastanın dışkı örnekleri toplanarak mikroskopi yöntemi ile iki (%0,5) ve gerçek zamanlı PZR yöntemi ile üç (%0,8) pozitiflik saptanmıştır¹²⁷. Brezilya’da yapılan bir çalışmada ise

10'u HIV pozitif ve 38'i çocuklardan oluşan 48 kişilik bir *Cryptosporidium* pozitif hasta grubunda Taqman 18S rRNA gerçek zamanlı PZR yöntemiyle 37 *C. hominis* ve beş *C. parvum* saptanmıştır. Bunlardan HIV ile enfekte hastalarda dokuz *C. hominis* ve bir *C. parvum* tespit edilmiştir¹²⁸. Beauty ve ark. Güney Afrika'da 35 ishali HIV pozitif, 125 ishali HIV negatif hasta ve 20 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmalarında Ziehl Neelsen (ZN) boyama, sandviç ELISA (sad-ELISA) ve direkt PZR yöntemleri ile *Cryptosporidium* aramış ve HIV pozitif ishali hasta grubunda ZN boyama ile 13 (%37,1), ELISA ile 26 (%74,3) ve direkt PZR ile 23 (%65,7) pozitiflik saptamışlardır. HIV negatif ishali grupta ise sırasıyla 34 (%27,2), 96 (%76,8) ve 89 (%71,2) pozitiflik saptanmıştır. HIV pozitif ve HIV negatif hastalarda testlerin duyarlılıkları ile özgüllükleri sırasıyla ZN'de %46,2, %32,3, sad-ELISA'da %92,3, %96,9, PZR'de ise %75, %96,9 olarak saptanmıştır¹²⁹. Çalışmamızda 91 örnekte modifiye ZN boyama ile pozitiflik saptanmazken, sandviç ELISA (sad-ELISA) ve COWP gen bölgesi hedef alınarak yapılan gerçek zamanlı PZR yöntemleriyle *Cryptosporidium* pozitifliği sırasıyla bir (%1,1), bir (%1,1) olarak saptanmıştır.

Hollanda'da yapılan bir çalışmada 542 yolcunun tropikal kuşağa seyahati sonrasında dördünde (%1) multipleks gerçek zamanlı PZR ile *Cryptosporidium* saptanmıştır. PZR pozitif bulunan dört örnekten sadece üçü (%75) mikroskopi (karbol fuksin boyama) ile pozitif saptanabilmiştir¹³⁰. Nazeer ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada mikroskopi ve multipleks gerçek zamanlı PZR ile *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., ve *Entamoeba histolytica* araştırılması sonucunda 396 ishali hastanın mikroskopi ile %1'inde, gerçek zamanlı PZR ile %3'ünde *Cryptosporidium* saptanmıştır. Çalışmada mikroskopinin çok sayıda yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç verdiği saptanmıştır. *Cryptosporidium* için duyarlılık ve özgüllük ise sırasıyla %33,3 ve %100 olarak saptanmıştır¹³¹. Avustralya'da yapılan bir çalışmada dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia intestinalis* araştırılmış 472 örneğin dokuzunda hem gerçek zamanlı PZR ile hem de Multiplex Tandem gerçek zamanlı PZR (MT RT-PZR) ile, 5'inde ise mikroskopi ile *Cryptosporidium* pozitif saptanmıştır. Gerçek zamanlı PZR, MT RT-PZR ve mikroskopi yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %100,%100; %100,%100 ve %38-56, %97-100 olarak saptanmıştır¹³². Vastert ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada akut ve kronik ishali dışkılarda *Cryptosporidium parvum*'un tespitinde mikroskopi (Kinyoun boyama ile doğrulanmış Auramin boyama), Crypto-strip test, ELISA ve gerçek zamanlı

PZR yöntemleri karşılaştırılmış ve PZR, altın standart olarak kabul edildiğinde testlerin duyarlılıkları sırasıyla %37, %78, %71 bulunmuştur; özgüllükleri ise %98'in altına inmemiştir¹³³. Hadfield ve ark.'nın gerçek zamanlı PZR ile yaptıkları bir çalışmada *Cryptosporidium cuniculus* olduğu bilinen 41 izolat gerçek zamanlı PZR yöntemiyle incelenmiş ve gerçek zamanlı PZR ile tüm isolatlar pozitif olarak saptanmıştır¹³⁴.

Fransa'da 2006-2009 yılları arasında 38 farklı laboratuvarından toplanan *Cryptosporidium* pozitif örneklerin elde edildiği hastaların yaşı, bağışıklık durumu ve isolatların genotipi değerlendirilmiştir. Toplanan 364 *Cryptosporidium* pozitif örneğin %18,2'sinin (n=74) çocuk, %38,6'sının (n=157) HIV ile enfekte ve %28'sinin (n=114) ise immün yeterli olduğu görülmüştür. Çalışmada en yüksek pozitiflik dört yaş altı çocuklarda (n=74, %18,2) ve 35-49 yaş grubundaki bireylerde (n=125, %30,7) görülmüştür⁴³. Venezuela'da HIV pozitif hastalarda yapılan bir çalışmada *Cryptosporidium* pozitif olduğu bilinen 59 hasta yaş gruplarına göre incelendiğinde 35 yaş üstü grupta (%71,4), 35 yaş altı gruba (%28,6) göre daha yüksek oranda pozitiflik görüldüğü bildirilmiştir¹³⁵. Bizim çalışmamızda ise pozitiflik saptadığımız tek hasta 61 yaşındaydı.

Literatüre bakıldığında *Cryptosporidium*'un erkeklerde kadınlardan daha yüksek oranda görüldüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Tian ve ark. 302 HIV pozitif ve 303 HIV negatif bireyin dahil olduğu çalışmalarında, *Cryptosporidium* pozitifliğinin erkeklerde (%12,6) kadınlardan (%4,4) daha yaygın görüldüğünü bildirmişlerdir¹¹⁹. Ribeiro ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 75 HIV ile enfekte hastada Safranin O metilen mavisi boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* aranmış ve %9,33 oranında pozitiflik bulunmuştur. Çalışmada erkek ve 20-50 yaş arası gruplarda bulunan hastalarda pozitifliğin yüksek olduğu görülmüştür¹³⁶. Bu araştırmalar ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da pozitif çıkan örnek erkek bir hastaya aittir.

Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyona yakalanma riskinin CD4+ sayısı ile ilişkili olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır²⁴. Özellikle CD4+ sayısı <200 hücre/mm³ olan bireylerde yüksek oranda *Cryptosporidium* görülmektedir^{6,7}. Fransa'da 38 farklı laboratuvarından toplanan *Cryptosporidium* pozitif örnekler ile yapılan çalışmada HIV pozitif hastalar arasında CD4+ sayısı <200 hücre/μm olanlarda pozitiflik oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir⁴³. Yine benzer olarak Tuli ve ark.'nın çalışmasında HIV pozitif ishali hastalarda *Cryptosporidium*

pozitiflik oranı, CD4+ sayısı <200 hücre/ μ l olan grupta daha yüksek bulunmuştur¹²⁵. Certad ve ark. Venezuela’da 397 HIV ile enfekte hastada *Cryptosporidium* taraması sonunda %15 pozitiflik saptamışlar ve enfeksiyonun ishal, kilo kaybı ve <100 hücre/mm³ olan CD4+ sayısı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir¹³⁵.

Etiyopya’da yapılan bir çalışmada ise 378 kişide (214 HIV pozitif ve 164 HIV negatif) MAF yöntemi ile bağırsak parazitleri taraması yapılmıştır. Çalışmada HIV varlığı, ishal varlığı ve CD4+ sayısının enfeksiyon ile bağlantısı araştırılmıştır. HIV negatif hastalarda *Cryptosporidium* saptanamazken, HIV pozitif hastalarda prevalansın %20,1 (43 kişi) olduğu görülmüştür. *Cryptosporidium* pozitifliği saptanan HIV pozitif bireylerin CD4+ sayısı dağılımlarının şu şekilde olduğu görülmüştür: <200 hücre/ μ m’de %50,8 (31 kişi), 200-349 hücre/ μ m’de %12,1 (yedi kişi), 350-499 hücre/ μ m’de %8,7 (dört kişi), $\geq$ 500 hücre/ μ m’de %2 (bir kişi)¹³⁷. Pam ve ark.’nın yaptıkları benzer bir çalışmada CD4+ sayısı bilinen 280 HIV/AIDS’li hastanın 66 (%23,6)’sında *Cryptosporidium* pozitifliği saptanmıştır. Bu 280 HIV/AIDS’li hastayı, $\leq$ 100 hücre/ μ m, 101-200 hücre/ μ m, 201-300 hücre/ μ m, 301-400 hücre/ μ m, 401-500 hücre/ μ m, 501-600 hücre/ μ m ve >600 hücre/ μ m olacak şekilde CD4+ sayılarına göre grupladıklarında, *Cryptosporidium* prevalansının sırasıyla %54,8, %32,7, %9,3, %23,3, %12,2, %40, %20 olduğunu bildirmişlerdir. CD4+ sayısı bilinen 66 HIV/AIDS’li ve *Cryptosporidium* pozitif hastadan sadece ikisi >600 hücre/ μ m’dir¹³⁸. Taherkhani ve ark. ise hem HIV hem de *Cryptosporidium* pozitif olduğu bilinen 20 hastanın yedisinde CD4+ sayısının $\leq$ 200 hücre/ μ m, altısının 200-350 hücre/ μ m, altısının 350-500 hücre/ μ m ve birinin de >500 hücre/ μ m olduğunu saptamışlardır¹³⁹. Çalışmamızda da *Cryptosporidium* pozitif saptanan hastanın CD4+ sayısı 669 hücre/ μ m’dir. Çalışma grubunda, CD4+ sayısı düşük olan çok az sayıda hasta (9/91) bulunmaktaydı. Bu durumun çalışmamızdaki *Cryptosporidium* pozitiflik oranını etkilediğini ve CD4+ sayısı düşük olan daha çok hasta ile yapılacak çalışmalarda daha yüksek oranda *Cryptosporidium* saptanabileceğini düşünmekteyiz.

Kriptosporidiaz başta AIDS’liler olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda, özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık rastlanan enfeksiyonlardan biridir. Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam eden HIV/AIDS’in izlemi zahmetli ve uzun soluklu bir yol olsa da HIV/AIDS’li hastalarda izlem, yaşam süresinin uzatılması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi açısından hayati önem taşımaktadır.

HIV/AIDS hastalarında ishal ve kilo kaybı yakınmaları geliştiğinde *Cryptosporidium* gibi etkenler akla gelmelidir¹⁴⁰.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 13 yıl süren bir çalışmada 24 yaşına, izlemi bırakana veya ölene kadar izlenen 3,553 HIV/AIDS'li çocuk hastalardan hayatını kaybetmiş olan 298 çocuk incelenmiştir. Bu hastaların ölüm sebeplerine bakıldığında *Cryptosporidium* sebebiyle ölen hastaların sayısında çalışmanın ilerleyen yıllarında belirgin bir düşüş olduğu görülmüştür. Bunlardan *Cryptosporidium* nedeniyle ölen izlemlili hastaların oranı 1994-1996 yılında %2,6 iken 1997-2000 yılları arasındaki oran %1,5'dir ve 2001-2006 yılları arasında ise *Cryptosporidium* nedeniyle ölen hiçbir hasta olmadığı bildirilmiştir¹⁴¹.

İzlemlili HIV pozitif hastalarda yaptığımız bu çalışma sonunda çok düşük oranda *Cryptosporidium* saptanmış olmasının hastaların izlemlili olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmada çok az sayıda *Cryptosporidium* varlığı saptanmış olsa da HIV pozitif hasta izleminin mortaliteyi belirgin oranda azaltacağı düşüncesindeyiz. Sonuç olarak; HIV/AIDS'li hastalarda, hasta izleminin hayat kurtarıcı olduğu ve intestinal parazitlerin rutin kontrolünün ihmal edilmemesi gerektiği unutulmamalıdır. *Cryptosporidium* gibi intestinal parazitlerin HIV pozitif olguların prognozundaki klinik önemin ortaya koyulması için yeni, geniş serili çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2002 Jan;15(1):145-54.
2. CDC. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports. April 10, 2009 / Vol. 58 / No. RR-4:14-17.
3. Oner YA, Yildirmak T, Sepetcioglu S, Altiparmak S, Atalik K, Kirkoyun H, Akgul O. Intestinal parasites should be considered in HIV/AIDS cases. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (25th ECCMID) Copenhagen, Denmark 25-28 April 2015. eposter: EV0726.
4. Klinik Mikrobiyoloji. (Manual of Clinical Microbiology) 9. Baskı, 2. cilt. 2122-2132.
5. Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri edit: Yenen OŞ. Nobel Tıp Kitapevleri. 2010; 681-682.
6. Wumba R, Longo-Mbenza B, Menotti J. Epidemiology, clinical, immune, and molecular profiles of microsporidiosis and cryptosporidiosis among HIV/AIDS patients. Int J Gen Med. 2012; 5: 603-11.
7. Hung CC, Tsaihong JC, Lee YT. Prevalence of intestinal infection due to *Cryptosporidium* species among Taiwanese patients with human immunodeficiency virus infection. J Formos Med Assoc. 2007; 106: 31-35.
8. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet 2013; 382: 209–222.
9. Natchu UC, Bhatnagar S. Diarrhoea in children: identifying the cause and burden. Lancet 2013; 382: 184-186.
10. Weller TH. Ernest Edward Tyzzer 1875-1965. Biographical Memoirs. 1978; XLIX: 353-373.

11. Anon, Basic Biology of *Cryptosporidium*, 09/12/2003, <http://www.k-state.edu/parasitology/basicbio>, 12/07/05.
12. Tzipori S, Widmer G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 2008; 24: 184-189.
13. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976; 70: 592-598.
14. Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.* 2013; 29: 237-251
15. Rosales MJ1, Córdón GP, Moreno MS, Sánchez CM. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop.* 2005; 95: 74-78.
16. Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res.* 1999; 85: 899-904.
17. Widmer G1, Sullivan S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 61-71.
18. Šlapeta J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *Int J Parasitol.* 2013; 43: 957–970.
19. Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol.* 2015; 45: 367-373.
20. Ryan U, Paparini A, Tong K, Yang R, Gibson-Kueh S, O'Hara A, Lymbery A, Xiao L. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp Parasitol.* 2015; 150: 31-35.
21. Kváč M, Hofmannová L, Hlásková L, Květoňová D, Vítovec J, McEvoy J, Sak B. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet Parasitol.* 2014; 201: 9-17.
22. Chalmers RM. *Cryptosporidium* as a public health challenge. Thompson RCA, Armson A, Ryan UM. (Editors) *Cryptosporidium: From Molecules to Disease* 2003; Chapter 13: 97-108.

23. Klassen-Fischer MK, Neafie RC, Wear DJ, Meyers WM. Cryptosporidiosis, isosporiasis, cyclosporiasis, and sarcocystosis; Topics on the pathology of protozoan and invasive arthropod diseases (e-book) Fairfax, Virginia, USA: Inova Central Laboratory; 2011. Chapter 13. pp. 1–19.
24. Ok ÜZ, Balcıoğlu C. Cryptosporidiosis. Özcel MA. (edt.) Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2007; 22: 363-382.
25. Ergüven S. Cryptosporidiosis ve immunolojisi. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Edt. Özcel MA, İğci A, Turgay N, Köroğlu E. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları no:21, 2007. s:93-97.
26. CDC. Parasites - *Cryptosporidium* (also known as "Crypto") (Erişim Tarihi 10.08.2015) <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>
27. Leitch GJ, He Q. Cryptosporidiosis-an overview. J Biomed Res. 2011; 25: 1-16.
28. Nesterenko MV, Woods K, Upton SJ. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. Biochim Biophys Acta. Volume 1999; 1454: 165–173.
29. Usluca S, Aksoy Ü. Su kaynaklı bir parazit: *Cryptosporidium*. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2006; 20: 65-74.
30. Korkoca H, Göz Y, Ataş AD. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic food workers. Türkiye Parazitol Derg. 2013; 37: 241-244.
31. Miman Ö, Aktepe OC. İçme sularında protozoon parazitlerin dezenfeksiyonu. Kocatepe Tıp Dergisi 2008; 9: 31-35.
32. Brian Gazzard. HIV and the gastrointestinal tract. Medicine. 2013; 41: 442-445.
33. Borad A, Ward H. Human immune responses in cryptosporidiosis. Future Microbiol. 2010; 5: 507–519.
34. Bonafonte MT, Smith M, Mead JR. A 23-kDa recombinant antigen of *Cryptosporidium parvum* induces a cellular immune response on in vitro stimulated spleen and mesenteric lymph node cells from infected mice. Exp Parasitol. 2000; 96: 32–41.

35. Wyatt CR. *Cryptosporidium parvum* and mucosal immunity in neonatal cattle. Anim Health Res Rev. 2000; 1: 25-34.
36. Guk SM, Chai JY, Shin YO, Seo M. Antibody responses to *Cryptosporidium* antigen in HIV-positive patients in the Republic of Korea. Korean J Parasitol. 2008; 46: 71-75.
37. Tian LG, Wang TP, Lv S, et al. HIV and intestinal parasite co-infections among a Chinese population: an immunological profile. Infect Dis Poverty. 2013; 23: 18.
38. Aguirre SA, Mason PH, Perryman LE. Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. Infect Immun. 1994; 62: 697-699.
39. Aktaş M, Dumanlı N, Altay K. *Eimeria* ve *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında İmmunite. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Edt. Özcel MA, İğci A, Turgay N, Köroğlu E. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2007; 21: 480-490.
40. Hayward AR, Chmura K, Cosyns M. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. J Infect Dis. 2000; 182: 1001-1004.
41. Putignani L, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2010; 2010: 753512.
42. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ. (Eds: Persing DH, et al.; Çeviri editörleri: Tekeli A, Ustaçelebi Ş). Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Palme Yayıncılık 2006; 583-582.
43. ANOFEL *Cryptosporidium* National Network. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. Euro Surveill. 2010; 15: 19642.
44. Lucca Pd, De Gaspari EN, Bozzoli LM, Funada MR, Silva SO, Iuliano W, Soares RM. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009; 51: 341-343.

45. Slack A. Parasitic causes of prolonged diarrhoea in travellers - diagnosis and management. *Aust Fam Physician*. 2012; 41:782-786.
46. Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE, Lundgren JD. Epidemiology of cryptosporidiosis among european AIDS patients. *Genitourin Med*. 1996; 72: 128-131.
47. Caccio SM, Putignani L. Epidemiology of human cryptosporidiosis. Caccio SM, Widmer G. (eds.) *Cryptosporidium: Parasite and Disease* 2014; 2: 43-79.
48. Marcos LA, Gotuzzo E. Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis*. 2013; 26: 295–301.
49. Çiçek M, Yılmaz H. İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve diğer barsak parazitlerinin yaygınlığı. *Dicle Tıp Dergisi* 2011; 38: 70-75.
50. Mülazımoğlu L, Vahapoğlu H, Görgün Ö, Yıldırım İ, Semerci İ, Taşer B. beş yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 1993; 23: 113-115.
51. Doğan N, Akgün Y. İshalli olgularda *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*. 1998; 22: 243-246.
52. Ögünç D, Çolak D, Tuncer D, Öngüt G, Sayğan MB, Er D, Ergin Ç, Gültekin M, Mutlu G. Akut ishalli 0-6 yaş grubu çocuk dışkılarında enteropatojenlerin aranması. *Türkiye Parazitol Derg*. 2000; 24: 268-273.
53. Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut ishalli çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*. 2004; 13: 16-19.
54. Tanyüksel M, Gün H, Doğançlı L. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scand J Infect Dis*. 1995; 27: 69-70.
55. Ok ÜZ, Cirit M, Ok E, Akçiçek F, Başçı A, Özcel MA. Cryptosporidiosis and blastocystosis in renal transplant recipients. *Nephron* 1997; 75: 171-174.
56. Karadağ G, Tamer GS, Dervisoglu E. Investigation of intestinal parasites in dialysis patients. *Saudi Med J*. 2013; 34: 714-718.

57. Arslan H, Inci EK, Azap OK, Karakayali H, Torgay A, Haberal M. Etiologic agents of diarrhea in solid organ recipients. *Transpl Infect Dis.* 2007; 9: 270–275.
58. Turkcapar N, Kutlay S, Nergizoglu G, Atli T, Duman N. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 90: 344–346.
59. Chalmers RM. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann Ist Super Sanita.* 2012; 48: 429-446.
60. Hayes EB, Matte TD, O'Brien TR, et al. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N Engl J Med.* 1989; 320: 1372-1376.
61. Kiang KM, Scheftel JM, Leano FT, et al. Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003. *Epidemiol Infect.* 2006; 134 (4): 878– 886,
62. Blackburn BG, Mazurek JM, Hlavsa M, et al. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 684–686.
63. Galmes A, Nicolau A, Arbona G, Smith-Palmer A, Pezzi GH, Soler P. Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Majorca, Spain. *Eurosurveillance*, 2003; 7: Article ID 2275.
64. Chalmers RM, Elwin K, Thomas AL, Guy EC, Mason B. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Eurosurveillance*, 2009; 14: Article ID 19086
65. Wheeler C, Vugia DJ, Thomas G, et al. Outbreak of cryptosporidiosis at a California waterpark: employee and patron roles and the long road towards prevention, *Epidemiol Infect.* 2007; 135: 302–310.
66. Aksoy U, Akisu C, Sahin S, et al. First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. *Eurosurveillance* 2007; 12: Article ID 3142.
67. McGuigan C. *Cryptosporidium* outbreak after a visit to a wildlife centre in northeast Scotland: 62 confirmed cases. *Eurosurveillance* 2005; 10: Article ID 2691.

68. Lazensky R, Hammond RM, Van Zile K, Geib K. Cryptosporidiosis outbreak in a Nassau County, Florida, return travel group from Ireland, may 24, 2006-june 4, 2006. *J Environ Health*. 2008; 71: 20–24.
69. Boehmer TK, Alden NB, Ghosh TS, Vogt RL. Cryptosporidiosis from a community swimming pool: outbreak investigation and follow-up study. *Epidemiol Infect*. 2009; 137: 1651–1654.
70. Coetzee N, Edeghere O, Orendi J, Chalmers R, Morgan L. A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in Staffordshire, England, October to December 2007. *Eurosurveillance*, 2008; 13: Article ID 19028.
71. Gait R, Soutar RH, Hanson M, Fraser C, Chalmers R. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *The Veterinary Record*, 2008; 162(26): 843–845.
72. Insulander M, de Jong B, Svenungsson B. A food-borne outbreak of cryptosporidiosis among guests and staff at a hotel restaurant in Stockholm county, Sweden, September 2008. *Eurosurveillance* 2008; 13: Article ID 19071.
73. Gherasim A, Lebbad M, Insulander M, et al. Two geographically separated food-borne outbreaks in Sweden linked by an unusual *Cryptosporidium parvum* subtype, October 2010. *Euro Surveill*. 2012; 17: 20318.
74. Hopkins J1, Hague H, Hudgin G, Ross L, Moore D. An outbreak of *Cryptosporidium* at a recreational water park in Niagara Region, Canada. *J Environ Health*. 2013; 75: 28-33.
75. Artieda J, Basterrechea M, Arriola L, Yagüe M, Albisua E, Arostegui N, Astigarraga U, Botello R, Manterola JM. Outbreak of cryptosporidiosis in a child day-care centre in Gipuzkoa, Spain, October to December 2011. *Euro Surveill*. 2012; 17: 20070.
76. Cho EJ, Yang JY, Lee ES, et al. A waterborne outbreak and detection of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water of an older high-rise apartment complex in Seoul. *Korean J Parasitol*. 2013; 51: 461-466.
77. Lange H, Johansen OH, Vold L, Robertson LJ, Anthonisen IL, Nygard K. Second outbreak of infection with a rare *Cryptosporidium parvum* genotype in

schoolchildren associated with contact with lambs/goat kids at a holiday farm in Norway. *Epidemiol Infect.* 2014; 142(10): 2105-2113.

78. T.C. Sağlık Bakanlığı. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi 2004.

79. Bilgehan H. Sindirim sistemi enfeksiyonlarının mikrobiyolojik incelenmesi. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı* 4. Baskı 2004; 18: 349-373.

80. Ok ÜZ. Dışkının incelemeleri. 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Bildiri Özet Kitabı. 15 – 19 Haziran 2010 ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi Ankara. (edt: Us D.)

81. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 325-58.

82. Al FD. Cryptosporidiosis. Korkmaz M, Ok ÜZ. (eds.) *Parazitolojide Laboratuvar Yöntem, Yorum, Akreditasyon.* Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın 2011; 23: 359-364.

83. Barbosa JMM, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Hanscheid T, Shapiro H, Pina-Vaz C. A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. *cytometry A.* 2008; 73: 44-47.

84. Khurana S, Sharma, P Sharma A, Malla N. Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Trop Parasitol.* 2012; 2: 20-23.

85. De A. Current laboratory diagnosis of opportunistic enteric parasites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Trop Parasitol.* 2013; 3: 7-16.

86. Börekçi G. Flüoresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminin klinik mikrobiyolojide kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2010; 40: 131-142.

87. Uyar Y, Özkan AT. Amebiyazis, giardiyazis ve kriptosporidiyazis tanısında antijen tarama yöntemlerinin yeri. *Türkiye Parazitol Derg.* 2009; 33: 140-150.

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

89. Tuli L, Singh DK, Gulati AK, Sundar S, Mohapatra TM. A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. *BMC Microbiology* 2010; 10: 11.
90. Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 1991; 44: 445-451.
91. Çöplü N, Gözalan A, Akın L. Gaitada parazit incelemesinde kullanılan yoğunlaştırma yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2007; 31: 123-128.
92. Erdoğan DD, Dağcı H, Turgay N, Akarca US, Alkan MZ. Taze ve formaldehitte saklanmış dışkı örneklerinde *Cryptosporidiosis*in moleküler tanısı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2009; 33: 120-124.
93. Doni NY, Zeyrek FY, Gürses G, Tümer S. *Giardia* ve *Cryptosporidium* Tanısında Direkt Mikroskopi ve Antijen Tarama Testlerinin Karşılaştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2013; 37: 169-173.
94. Direkel Ş, Özerol İH, Durmaz R. İshalli hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve modifiye ehrlich-ziehl-neelsen boyama yöntemleriyle araştırılması. *Mersin Univ. Sağlık Bilim Derg.* 2008; 1: 20-25.
95. Elgun G, Koltas IS. Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitol Res.* 2011; 108: 395–397.
96. Priest JW, Kwon JP, Moss DM, et al. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1385–1392.
97. Jakobi V, Petry F. Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes encoding sporozoite surface antigens in infected HCT-8 host cells. *Microbes Infect.* 2006; 8: 2186-2194.
98. Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 1135-1136.

99. Tsaihong JC, Ma P. Comparison of an indirect fluorescent antibody test and stool examination for the diagnosis of cryptosporidiosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990; 9: 770-773.

100. Petri WA Jr. (çeviren: Çiğdem Güngör) Parazitik hastalıkların moleküler tanısında gelişmeler, yararları ve geleceğe bakış. *Moleküler Mikrobiyoloji- Tanı Prensipleri ve Uygulamalar* (Eds: Persing DH, et al.; Çeviri editörleri: Tekeli A, Ustaçelebi Ş). 2006; 579-582.

101. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR III, Smith TF. Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 165-256.

102. Baeumner AJ, Humiston MC, Montagna RA, Durst RA. Detection of viable oocysts of *Cryptosporidium parvum* following nucleic acid sequence based amplification. *Anal Chem.* 2001; 73: 1176-1180.

103. Hijjawi N. *Cryptosporidium*: New developments in cell culture. *Experimental Parasitology* 2010; 124; 54–60.

104. Protozoon Hastalıklarında Tedavi. *Tıbbi Parazitolojide Tedavi* (edt: Akısı Ç, Korkmaz M) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın 2005;20: 40-41.

105. Das JK, Ali A, Salam RA, Bhutta ZA. Antibiotics for the treatment of Cholera, *Shigella* and *Cryptosporidium* in children. *BMC Public Health* 2013; 13: 10.

106. Fox LM, Saravolatz LD. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 1173-1180.

107. Berheto TM, Haile DB, Mohammed S. Predictors of loss to follow-up in patients living with HIV/AIDS after initiation of antiretroviral therapy. *N Am J Med Sci.* 2014; 6: 453–459.

108. Ülçay A, Görenek L, Coşkun Ö, Araz E, Acar A, Eyigün CP. İmmün yetmezlikli hastalarda intestinal protozoonların tanısı. *Türk Parazitol Derg.* 2008; 32: 328-333.

109. Karadag G , Tamer GS, Dervisoglu E. Investigation of intestinal parasites in dialysis patients. *Saudi Med J.* 2013; 34:714-718.

110. Sarı C, Sarı K, Ertuğ S. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* spp. ve *Blastocystis hominis* sıklığının araştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg. 2003; 27: 187-190.
111. Yıldız M, Çöplü N, Kılıç S, Babür C, Öncül Ö, Esen B. İshali olan solid tümörlü olgularda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg. 2001; 1: 1-8.
112. Eren C, Mete Ö, Akpolat N, Çiçek M. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve modifiye aside dirençli boyama yöntemi ile araştırılması. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2012; 32: 1545-1553.
113. Botero JH, Castano A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurdato MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2003; 45: 197-200.
114. Sreedharan A, Jayshree RS, Sridhar H. Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. J Diarrhoeal Dis Res. 1996; 14: 211-213.
115. 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. 2006.
116. Cardoso LV, Galisteu KJ, Schiesari Júnior A, Chahla LA, Canille RM, Belloto MV, Franco C, Maia IL, Rossit AR, Machado RL. Enteric parasites in HIV-1/AIDS-infected patients from a Northwestern São Paulo reference unit in the highly active antiretroviral therapy era. Bras Med Trop. 2011; 44: 665-669.
117. Silva CV, Ferreira MS, Goncalves-Pires Mdo R, Costa-Cruz JM. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. Mem Ins Oswaldo Cruz. 2003; 98: 1097-1099.
118. Lim YA, Rohela M, Sim BL, Jamaiah I, Nurbayah M. Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients in Kajang Hospital, Selangor. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005; 36: 30-33.

119. Tian LG, Chen JX, Wang TP, et al. Co-infection of HIV and intestinal parasites in rural area of China. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 36.
120. Saksirisampant W, Eampokalap B, Rattanasrithong M, Likansakul S, Wiwanitkit V, Nasingkarn A, Denmasae N. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai*. 2002; 85: 424-428.
121. Cranendonk RJ, Kodde CJ, Chipeta D, Zijlstra EE, Sluiters JF. *Cryptosporidium parvum* and *Isospora belli* infections among patients with and without diarrhea. *East Afr Med J*. 2003; 80: 398-401.
122. Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian J Pathol Microbiol*. 2008; 51: 137-138.
123. Gupta S, Narang S, Nunavath V, Singh S. Chronic diarrhoea in HIV patients: Prevalence of coccidian parasites. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 172-175.
124. Girma M, Teshome W, Petros B, Endeshaw T. Cryptosporidiosis and Isosporiasis among HIV-positive individuals in south Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Infectious Diseases* 2014; 14: 100.
125. Tuli L, Gulati AK, Sundar S, Mohapatra TM. Correlation between CD4 counts of HIV patients and enteric protozoan in different seasons – An experience of a tertiary care hospital in Varanasi (India). *BMC Gastroenterology* 2008; 8: 36.
126. Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis*. 2007; 196: 684-691.
127. Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled Real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 869-874.
128. Rolando RF, Silva Sd, Peralta RH, Silva AJ, Cunha Fde S, Bello AR, Peralta JM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by Real-time polymerase

chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107: 476-479.

129. Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO. Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. Molecules. 2014; 19: 2674-2683.

130. Soonawala D, van Lieshout L, den Boer MA, Claas EC, Verweij JJ, Godkewitsch A, Ratering M, Visser LG. Post-travel screening of asymptomatic long-term travelers to the tropics for intestinal parasites using molecular diagnostics. Am J Trop Med Hyg. 2014; 90: 835-839.

131. Nazeer JT, El Sayed Khalifa K, von Thien H, El-Sibaei MM, Abdel-Hamid MY, Tawfik RA, Tannich E. Use of multiplex Real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. Parasitol Res. 2013; 112: 595-601.

132. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Evaluation of multiplex tandem Real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. J Clin Microbiol. 2011; 49: 257-262.

133. Vastert D, Brinkman M, Wilke H, Mulder B. Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* with microscopy, strip test, ELISA and real-time PCR. Poster: Ned Tijdschr Med Microbiol 2006; 14: Supplement: 10.06

134. Hadfield SJ1, Chalmers RM. Detection and characterization of *Cryptosporidium cuniculus* by Real-time PCR. Parasitol Res. 2012; 111: 1385-1390.

135. Certad G, Arenas-Pinto A, Pocaterra L, Ferrara G, Castro J, Bello A, Núñez L. Cryptosporidiosis in HIV-infected Venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73: 54-57.

136. Ribeiro PC, Pile E, Queiroz MM, Norberg AN, Tenório JR. Cryptosporidiosis occurrence in HIV+ patients attended in a hospital, Brazil. Rev Saude Publica. 2004; 38: 469-470.

137. Assefa S, Erko B, Medhin G, Assefa Z, Shimelis T. Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count. BMC Infect Dis. 2009; 9: 155.

138. Pam VA, Dakul DA, Karshima NS, Igeh CP. Cryptosporidiosis in relation to CD4+ T- Lymphocyte counts of people living with HIV/AIDS in Jos, Plateau State, North-Central Nigeria. *AJBPS*. 2013; 3: 50-54.

139. Taherkhani H, Fallah M, Jadidian K, Vaziri S. A study on the prevalence of *Cryptosporidium* in HIV positive patients. *J Res Health Sci*. 2007; 7: 20-24.

140. Feasey NA, Healey P, Gordon MA. Review Article: The aetiology, investigation and management of diarrhoea in the HIV-positive patient. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34: 587-603.

141. Brady MT, Oleske JM, Williams PL, Elgie C, Mofenson LM, Dankner WM, Van Dyke RB, Pediatric AIDS Clinical Trials Group 219/219C Team. Declines in mortality rates and changes in causes of death in HIV-1-infected children during the HAART era. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 53: 86-94.

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Toplantı Tarihi : 07 / 01 / 2011

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Toplantı Sayısı : 01

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER'in üstlendiği ve Doktora Öğrencisi Kevser KARAMAN'ın yürüteceği 2010/1117-386 dosya numaralı "HIV Pozitif Bireylerin Dışkı Örneklerinde Cryptosporidium SP'nin Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzca incelenmiştir.

Etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. A. Yağız ÜREŞİN

İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Ayşen BULUT (T.Katılmadı.)

Halk Sağlığı (Emekli)

Prof.Dr. Berrin UMMAN

İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK

Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1.Dahiliye Kliniği

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN

Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN (T.Katılmadı)

İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanı

Prof.Dr. Pınar SAİP

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Demir TIRYAKI

Biyofizik (Emekli)

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU

İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK (izinli)

İstanbul Üniversitesi

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya

M. Kerim AKMAN

İİBF İktisat Bölümü (Özel)

Doç. Dr. H. Hanzade DOĞAN (T.Katılmadı)

İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kevser	Soyadı	Atalık
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	08.10.1983
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	21289951388
Email	kevserkaraman@yahoo.com	Tel	5058191152

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniv. İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD	
Yük.Lis.	İstanbul Üniv. İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2008
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji	2005
Lise	Beyoğlu Fındıklı Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kalite Kontrol Uzmanı	RTA Laboratuvarları	2008-2010
2.	Bilimsel Dergi Uzmanı	Nobel İlaç, Nobel Medicus	2011-2015
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Resim