



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*' UN MOLEKÜLER
YÖNTEM İLE SAPTANMASI**

BAHAR KAVUZKOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2022

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM' UN MOLEKÜLER
YÖNTEM İLE SAPTANMASI

Bahar KAVUZKOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Murat ARAL

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mustafa Altay ATALAY

KAHRAMANMARAŞ-2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bahar KAVUZKOZ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2020/19-14 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının hazırlanmasında bilgisinden ve deneyiminden yararlandığım, akademik ve kiőiliđine hayran olduğum, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Kezban Töluy YALÇINKAYA' ya,

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Baőkanı kıymetli hocam Prof. Dr. Murat ARAL'a ve bölümdeki değerli hocalarım Dr. Öđr. Üyesi Filiz ORAK, Prof. Dr. Ekrem KİREİ, Doç.Dr. Özlem KİRİŐÇİ' ye,

En değerli varlıklarımın desteği için aileme,

Desteđinden dolayı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne,

Teşekkür ederim.

Aralık-2022

Bahar KAVUZKOZ

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM' UN MOLEKÜLER

YÖNTEM İLE SAPTANMASI

Yüksek Lisans Tezi

Bahar KAVUZKOZ

ÖZET

Kriptosporidiyoz, *Cryptosporidium* genusunda yer alan apikompleksan protozoonlar tarafından oluşturulan paraziter bir hastalıktır. Moleküler çalışmalarda belirlenmiş en az 15 farklı türü insanlarda hastalığa neden olmaktadır. İnsanda en sık karşılaşılan türler *Cryptosporidium hominis* ve insanlar dışında pek çok memeli türünü de enfekte edebilen *Cryptosporidium parvum'* dur.

Kriptosporidiyoz özellikle çocukları etkileyen bir hastalıktır. Uzun süren ve malnütrisyona yol açan diyareye neden olur. Sağlıklı yetişkinlerde diyare kendini sınırlayan özelliğindedir. Ancak, kazanılmış immün yetmezliği (AIDS), solid organ veya kemik iliği transplantasyonu ya da kemoterapi/immün terapiye bağlı immün yetmezliği olan kişilerde ishal kronikleşir ve ağır seyreder.

Cryptosporidium spp. ayrıca su kaynaklı ve daha az sıklıkta olmak üzere gıda kaynaklı salgınlara neden olabilir.

Cryptosporidium türleri insanların yanı sıra memeli, kuş, sürüngen gibi pek çok hayvan türünü de enfekte etmektedir. İnsan enfeksiyonlarında parazit, gastrointestinal sistem epitel hücrelerinin içinde çoğalır.

Tüm yaşam döngüsünü tek bir konakta tamamlayabilmesine karşın bazı türleri farklı konak türleri arasında yayılabilmektedir.

Cryptosporidium türleri, enfekte kişilerin dışkılarıyla kontamine olmuş gıda-su yoluyla fekal-oral yolla bulaşır. Protozoon, ayrıca yüzme sırasında yutulan su ve hayvanlarla temas yoluyla da bulaşabilir.

Çeşme veya havuz suyunun kontaminasyonu ile su kaynaklı salgınlara bildirilmiştir. *Cryptosporidium* türleri klorlamaya ve çevre koşullarına dayanıklıdır.

Çalışmanın amacı, *Cryptosporidium parvum'* un laboratuvar tanısında kullanılan moleküler yöntemi (real-time PCR) 'çöktürme ile konsantrasyon + mikroskopik inceleme' ile

karşılaştırmak ve moleküler yöntemin analitik duyarlılığını belirleyerek rutin kullanıma uygunluğunu değerlendirmektir.

Ocak 2021-Eylül 2021 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' na rutin parazit araştırması için gönderilen 110 dışkı örneği çalışmaya dahil edildi.

Gaita örnekleri *Cryptosporidium* ookisti varlığı açısından Kinyoun aside dirençli boyama yöntemiyle mikroskopik olarak incelenmiştir.

Moleküler inceleme Gerçek zamanlı PCR yöntemi ile ticari test kiti (Nzytech, kat. No: MD00831, Lizbon, Portekiz) kullanılarak yapılmıştır.

Konsantre edilmiş gaita örneklerinde yapılan mikroskopik incelemede 17 örnekte *Cryptosporidium* ookisti görülmüştür.

Mikroskopik incelemede ookist saptanan örneklerden ikisinde moleküler yöntemle test sonucu pozitif alındı. Ayrıca mikroskopik incelemede negatif bulunan 3 örnekte de pozitif sonuç elde edilmiştir.

PCR referans alınarak yapılan istatistiksel analizde, mikroskopinin duyarlılığı %40; özgüllüğü %85,7 hesaplanmıştır.

Mikroskopik inceleme kriptosporidyoz tanısında ucuz ve kolay uygulanabilen bir yöntem olmasına rağmen duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bir testtir.

Bu nedenle kriptosporidyoz tanısında mikroskopi yerine özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek PCR gibi diğer testlerin kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : *Cryptosporidium parvum*, Kriptosporidyoz, Mikroskopi, PCR

Sayfa Sayısı : 47

Danışman : Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇIKAYA

**DETECTION OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*
BY MOLECULAR METHOD**

Master Thesis

Bahar KAVUZKOZ

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by apicomplexan protozoones in the genus *Cryptosporidium*. At least 15 different species identified in molecular studies cause disease in humans. The most common species in humans are *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*, which can infect many mammalian species besides humans.

Cryptosporidiosis is a disease that especially affects children. It causes chronic diarrhea and malnutrition. Diarrhea is self-limiting in healthy adults. However, diarrhea becomes chronic and severe in people with immunodeficiency due to AIDS, solid organ or bone marrow transplantation, and chemotherapy/immunotherapy.

Cryptosporidium species can also cause waterborne and less frequently, foodborne outbreaks.

Cryptosporidium spp. infect many animal species such as mammals, birds and reptiles as well as humans. The parasite multiplies inside the epithelial cells of the gastrointestinal tract in human infections. Although it can complete its entire life cycle in a single host, some species can spread between different host species.

Cryptosporidium species are transmitted by fecal-oral route through contaminated food-water from the feces of infected people. The protozoan can also be transmitted through contact with animals or swallowed water during swimming. Waterborne outbreaks have been reported with contamination of tap or pool water. *Cryptosporidium* spp. are resistant to chlorination and environmental conditions.

The aim of the study is to compare the “concentration by precipitation + microscopic examination” used in laboratory diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection with the new and more sensitive-specific molecular method (real-time PCR) and to evaluate the analytical sensitivity and suitability of the molecular method for routine use.

110 stool samples sent from the clinics to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Health Practice and Research Hospital Microbiology Laboratory between January 2021 and September 2021 for routine parasite investigation were included in the study.

Submitted stool samples were microscopically examined for the presence of *Cryptosporidium* oocyst using the Kinyoun acid-fast staining method. A commercial test kit (Nzytech, cat. No: MD00831, Lisbon, Portugal) was used for real-time PCR.

In the microscopic examination of concentrated stool samples, *Cryptosporidium* oocysts were observed in 17 samples. Two of the 17 samples with oocysts were also positive with real-time PCR. In addition, three samples without oocysts were positive by PCR. In PCR-referenced statistical analysis, the sensitivity of microscopy was 40% and the specificity was 85.7%.

Although microscopy is an inexpensive and easily applicable method in the diagnosis of cryptosporidiosis, it has low-sensitivity and low-specificity. For this reason, it is thought that it would be beneficial to use other tests with high specificity and sensitivity, such as PCR, instead of microscopy in the diagnosis of cryptosporidiosis.

Key words : Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, Microscopy, PCR

Page Number : 47

Süpervisor : Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. C. parvum Ookistlerinin Duvar Yapısı.....	5
2.2. C. parvum' un Yaşam Döngüsü.....	6
2.2.1. Eksitasyon (kistlerin açılması).....	7
2.2.2. Merogoni (aseksüel çoğalma).....	7
2.2.3. Gametogoni.....	8
2.2.4. Fertilizasyon.....	8
2.2.5. Ookist duvar oluşumu.....	8
2.2.6. Sporogoni.....	9
2.3. Patogenez.....	9
2.4. Klinik.....	9
2.5. Epidemiyoloji-Bulaşma.....	10
2.6. Tedavi-Koruma.....	11
2.7. Tanı.....	12
2.7.1. Mikroskopik yöntemler.....	13
2.7.2. İmmünolojik yöntemler.....	15
2.7.3. Histopatolojik yöntemler.....	16
2.7.4. Kültür.....	16
2.7.5. Moleküler yöntemler.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	18
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler.....	18
3.1.1. Mikroskopik inceleme.....	18
3.1.2. Çöktürme ile konsantrasyondan işlemi.....	19
3.1.3. Direkt mikroskopik inceleme.....	19

3.2. Gerçek Zamanlı PCR	20
3.2.1. Fekal DNA izolasyonu.....	20
3.2.2. Gerçek zamanlı PCR.....	22
3.2.3. İstatistiksel analiz.....	23
4. BULGULAR	24
4.1. Mikroskopik İnceleme	24
4.2. Gerçek Zamanlı PCR (rt-PCR)	24
4.3. Probit Analizi	26
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	31
7. KAYNAKLAR.....	32
8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	42
9. TABLOLAR DİZİNİ	43
10. EKLER DİZİNİ.....	44
11. EKLER	45
12. ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
AIDS	: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu/acquired immune deficiency syndrome
<i>C. parvum</i>	: <i>Cryptosporidium parvum</i>
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
Mg	: Miligram
ml	: Mikrolitre
Nm	: Nanometre
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği
Rpm	: Revolutions Per Minute
rt-PCR	: Real-time PCR/gerçek Zamanlı PCR
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
spp.	: Türleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kriptosporidiyoz; sitoplazma dışı, apikomleks, hücre içi ökaryotik protozoonlar olan kriptosporidyum türlerinin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Parazit insanlar da dahil geniş yelpazede omurgalı konakçıda gastrointestinal sistemin mikrovillus epitelini enfekte ederek doku erozyonuna ve sonuç olarak ishale neden olur (1,2). Sporadik enfeksiyon ve salgınlara neden olan parazitin AIDS salgınının başlamasıyla birlikte immün yetmezliği olan kişilerde yaşamı tehdit edecek ciddiyette hastalığa yol açabildiği gözlenmiştir (3).

Cryptosporidium türleri ile enfekte bir hayvanın 1 gram dışkıında milyonlarca ookist bulunabilmekte ve bu ookist saçılımı enfeksiyon yayılım hızını artırmaktadır (4-6). Ookistlerin yüksek oranda karbonhidrat içeren kalın bir duvara sahip olması çevresel etmenlere karşı dirençli olmasını sağlar ve enfeksiyon yayılım hızının artmasına neden olur. Dirençli ve kalın duvar yapısı normal çevre şartlarında uzun süre canlı kalabilmesini sağlar, yalnızca 65°C'nin üzerinde ve -18°C'nin altı gibi uç çevre şartlarında bu dirençli yapısı bozulmaktadır (7, 8). Parazitin ookistleri kloroform için dirençlidir, dolayısıyla içme suyu kaynaklı bulaşma vakaları da görülebilmektedir (9-10). Parazit ookistlerinin küçük boyutları nedeniyle uygun filtrasyon kullanılmadığı takdirde parazitin elimine edilemeyeceği belirtilmektedir (11).

C. parvum su kaynaklı enfeksiyonlara neden olur, geniş konakçı ağına sahiptir. Ookistler dezenfektanlara dayanıklıdır. Doğrudan fekal-oral yolla (insandan-insana, hayvandan-insana) bulaşabilir. Enfeksiyon dozu 10-100 ookistdir. İmmün sistem yetersizliği olan hastalarda daha düşük sayıda ookistin enfektif olduğunu tespit edilmiştir. İnsanlar *Cryptosporidium* parazitinin ookistlerini sindirim yoluyla aldıkları zaman enfekte olur. Parazit gerekli elementlerini konakçı hücreden alır ve ara konakçısı yoktur. Bütün gelişme aşamalarını tek bir konakçı içerisinde geçirir (12).

İmmünitesi normal kişilerde *Cryptosporidium* enfeksiyonu çoğunlukla kendiliğinden iyileşir ve ortalama iki haftada ishal sonlanır, nadiren sıvı desteğine gerek duyulur. Beslenme yetersizliği olan çocuklarda nitazoksanid ile tedavi hastalık süresi ile mortalite oranını önemli ölçüde azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda yetişkinlerde de nitazoksanid tedavisi etkin bulunmuştur. Ancak, AIDS'e bağlı kriptosporidiyoz gelişen kişilerde yapılan çalışmalarda antiparaziter ilaçların sadece kısmen etkili bulunması hayal kırıklığı yaratmıştır. Hiçbir

antiparazitik ilacın, bağışıklığı baskılanmış hastalarda kriptosporidyozu güvenilir bir şekilde iyileştirdiği kanıtlanamamıştır (13-15).

Kriptosporidyoza özgü klinik belirti bulunmamaktadır. Özellikle küçük çocuklarda ve üç günden fazla süren akut gastroenterit olgularında *Cryptosporidium* akla gelmelidir. Ookistlerin çok küçük olması ve maya ile karıştırılabilmesi nedeniyle rutin parazitolojik inceleme ile parazitin tanımlanması son derece güçtür ve parazite spesifik tanı yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Aside dirençli boyama ile yapılan mikroskopik incelemede ookist yapılarına göre tür ayırımı mümkün değildir. Tür ayırımı için moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Gaita incelemesinde altın standart yöntem ookist duvar antijenlerine karşı monoklonal antikorların kullanıldığı immünfloresan yöntemidir. Yöntemin dezavantajı çok sayıda örnekle çalışmaya uygun olmaması, deneyimli teknisyen ve immünfloresan mikroskop gerektirmesidir. ELISA ile antijen aranması daha fazla sayıda örneğin test edilmesine imkân vermektedir. ELISA'nın duyarlılık ve özgüllüğü ticari kite göre değişkenlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmaya göre ELISA ve immün floresan yönteminin duyarlılığı %90'ın üzerinde bulunurken modifiye Ziehl-Neelsen boyama ile incelemenin duyarlılığı %75 bulunmuştur. Son yıllarda farklı kriptosporidyum türleri ile birlikte diğer patojenleri de saptayan PCR tabanlı testler geliştirilmiştir. Pahalı olmalarına karşın duyarlılıkları yüksek olan bu testler henüz yaygın kullanımda değildir (15,17).

Çalışmada farklı yaş grubundaki hastalardan hastanemiz laboratuvarına rutin parazit incelenmesi için gönderilen gaita örneklerinde, yoğunlaştırma işleminden sonra Kinyoun aside dirençli boyama ile mikroskopi ve moleküler yöntem (gerçek zamanlı PCR) kullanarak *Cryptosporidium parvum* ookist varlığının saptanması ve iki yöntemin karşılaştırılması ile moleküler yöntemin analitik duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Ernest Edward Tyzzer tarafından ilk tanımlanan kriptosporidyum türü *Cryptosporidium muris* 1907 yılında fare mide bezlerinde saptanmıştır (18,19). *C. parvum* ise 1912 yılında yine Ernest Edward Tyzzer tarafından fare ileum mukozasında *C. muris*'den daha küçük olan ookistleriyle ayırt edilerek tanımlanmış ve ookistlerin atılımının dışkı yoluyla olduğu ortaya konmuştur (20).

İnsanlarda en çok enfeksiyona neden olan iki tür, *C. hominis* ile *C. parvum*'dur (15). *C. hominis* sadece insanlarda enfeksiyona neden olurken *C. parvum* büyük ölçüde zoonotik vakalardan sorumludur (21,22).

Cryptosporidium türleri başlangıçta konağa göre adlandırılmıştır. 20. Yüzyılın sonuna dek insan izolatlarının sadece tek bir tür; *C. parvum* olduğu düşünülmekte idi. Daha sonra yapılan moleküler çalışmalarla *C. parvum* 'un çok sayıda genotip içerdiği anlaşılmıştır. Günümüzde konak özgüllüğü, morfoloji ve moleküler çalışmalarla tanımlanmış 35'ten fazla *Cryptosporidium* türü tanımlanmıştır. Ayrıca *C. parvum* 'un IIc subtipi diğer *C. parvum* izolatlarından daha çok *C. hominis*'le genetik benzerlik göstermektedir. Moleküler biyoloji çalışmaları insanların *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium viatorum*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium muris* ve diğerleriyle de enfekte olabileceğini göstermiştir (22,23).

Kriptosporidiyoz elektrolit ve aşırı sıvı azalmasına ve devamında negatif enerji dengesi, metabolik asidoz, ölümlere neden olabilmektedir (22).

Tablo 1. *Cryptosporidium* türleri, araştırmacı-tarih ve yerleştiği konaklar (24)

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

Tablo 2. *Cryptosporidium* cinsinin taksonomideki yeri (25,26)

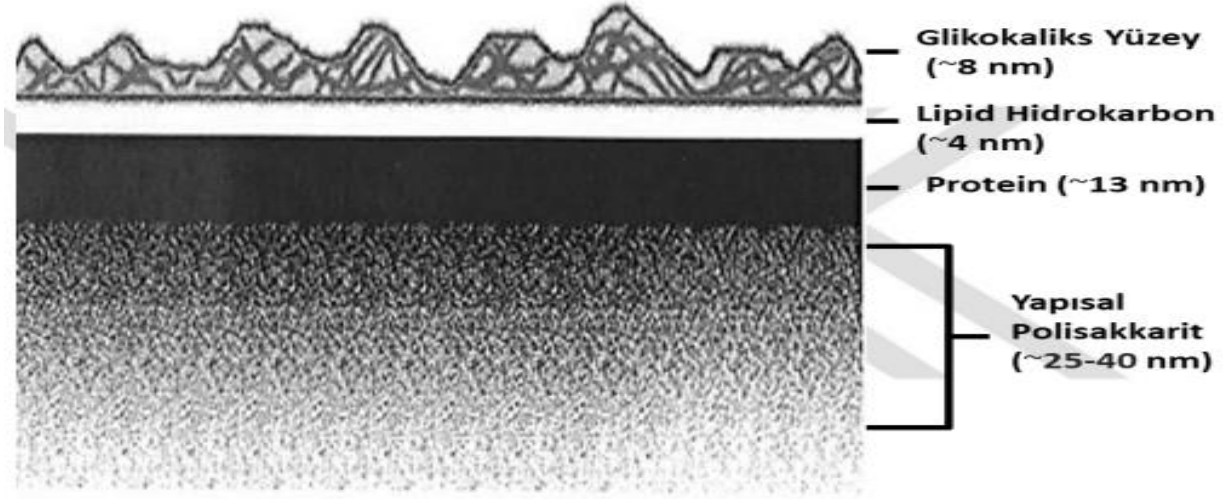
Sınıflandırma	İsim	Biyolojik Özellikleri
Alem	Animalia alemi içinde Protista alt alemi	Ökaryotik tek hücreli
Şube	Apicomplexa	Apikompleks yapıları olup mikrotübüllerden oluşur, çekirdeği veziküllerdir ve tüm türleri parazittir
Sınıf	Sporozoa sınıfı içinde Coccidia alt sınıfı	Seksüel ve aseksüel üreme, ookist oluşturma, hücreye giren parazitin kayma kontraksiyon şeklinde hareketi vardır, yaşam döngüleri merogoni, sporogoni, gametogoni şeklindedir.
Takım	Eucoccidia takımı içinde Eimerrina	Merogoni evresi omurgalı konakta gerçekleşir, Mikrogamet ve makrogametleri farklılık gösterir. Zigot hareketsizdir ve konoid mevcuttur.
Aile	<i>Cryptosporidiidae</i>	Konak süreci yüzey membranı altında gerçekleşir monoksen gelişim görülür. Ookistleri sporokist içermez dört sporozoiti vardır.
Cins	<i>Cryptosporidium</i>	

2.1. *C. parvum* Ookistlerinin Duvar Yapısı

C. parvum ookisti üç katlı bir duvar yapısına sahiptir. En dıştaki katmanı yoğun bir elektron yapısıyla düzensiz bir kalınlığa sahip olup ortalama 10 nm'dir. Orta katman 2,5 nm kalınlığında yarısaydam yapıdadır ve mikobakteriyel lipidler ve balmumu benzeri sert yapılı kompleks lipid tabakası yer alır. İç katman ise kendi içinde iki katmanlı olup sırasıyla 11,6 ve 25,8 nm kalınlığında sütür yapıdan oluşur ve glikoproteinleri içerir. Dış bilayer tabakayı çevreleyen asidik özellikte glikokaliks tabaka bulunmaktadır. *C. parvum*'un ookist duvarı ookist çapının yarısı veya üçte birini oluşturmaktadır. Ookist duvarı yapısı mekanik ve kimyasal etkilere karşı dirençlidir. Bol miktarda lipid bulunması ookist duvarının karbol fuksin boyama işleminde sonra asit-alkol ile dekolorizasyondan etkilenmemesini sağlar. Duvar yapısındaki orta ve uzun yağ asitleri, alifatik hidrokarbonlar ve karbonhidrat bileşenleri biyokimyasal analizlerle ortaya konmuştur (27,28).

Saflaştırılan duvar % 7,5 proteinden oluşur ve SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsünde 5 bant içerir. Hidrofobik moleküller içerir. Bu kimyasal yapı, duvara geçirgen olmayan ve dirençli olmasını sağlayan özellik verir. Duvarın esnekliği ve gücü iç tabakasındaki glikoproteine bağlıdır. Ookist duvarının sıcaklığa bağlı olarak geçirgenliğinin

değişmesinin orta katmandaki mumsu hidrokarbonlara bağlı olduğu düşünülmektedir. *Coccidia* parazitlerinin ookistleri içinde sporozoitleri sarmalayan sporokistler bulunur. Bu yapının bulunmaması nedeniyle parazit 'gizli sporokistler' anlamında *Cryptosporidium* olarak adlandırılmıştır (27-29).

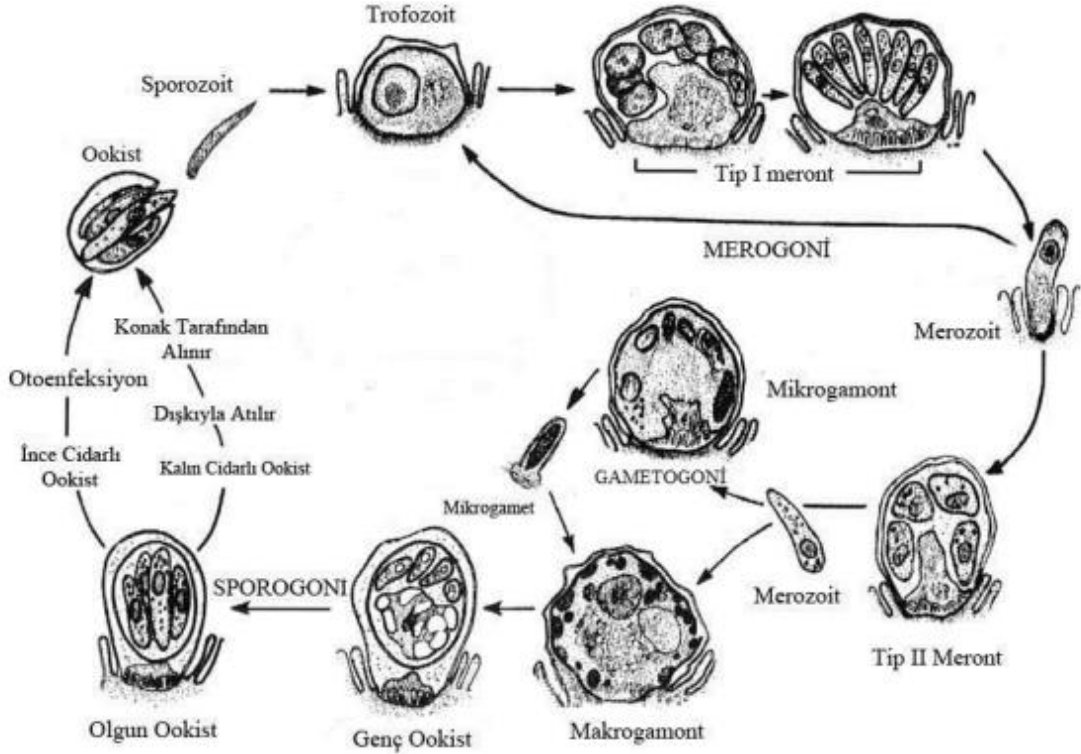


Şekil 1. *C. parvum* ookist duvar yapısı için önerilen model (27)

2.2. *C. parvum*' un Yaşam Döngüsü

Parazitin yaşam döngüsü sporogoni, ookist duvar oluşumu, gametogoni, fertilizasyon ve merogoni, eksitasyon olmak üzere 6 ana evreden oluşur (30). Bulaş parazitin ookistleri ile kontamine olan suların ve gıdaların konakçı tarafından ağız yolu alınması ile gerçekleşir; böylelikle endojen safha başlar. Mide ortamındaki asidik etki, safra tuzları ve pankreatik enzimler ile ookist duvarı bir kutuptan ayrılmaya başlar ve 4 sporozoit serbest kalır. Oval veya küresel yapıda olan ookistlerin büyüklüğü $\geq 4,5 \mu\text{m}$ ' dir (1).

Parazitin tek bilinen ekzojen safhası ise enfekte konağın dışkısı ile çevreye atılan sporlu ookist formudur. Parazitin bu formunda yeni enfeksiyonların kaynağı olacak sporozoitleri çevreleyerek mekanik ve kimyasal bozulmalara, çevresel şartlara karşı dayanıklılığını artıran yaklaşık 49 nm kalınlığında üç katlı bir duvar yapısı mevcuttur (31).



Şekil 2. *C. parvum*' un yaşam siklusu (1)

2.2.1. Eksitasyon (kistlerin açılması)

Konağın sindirim yoluyla aldığı ookistlerin normal koşullarda ince bağırsakta açılmasına “eksitasyon” denir ve sporozoitler serbest hale geçer. Kist açılımını etkileyen faktörler arasında çeşitli proteolitik enzimler, pankreatik enzimler, safra tuzları, vücut ısısı ve sindirim sistemindeki değişik indirgeyici etmenler sayılabilir (32,33). Ookistlerden serbest kalan sporozoitler hareketli ve pürüzlü dış yüzeye sahiptir. Sporozoitler konakçı hücrenin apikaline yerleşerek hücreyi istila eder (34,35). Sporozoitler yapısal olarak başlangıçta ince ve hilal şeklinde iken küresel veya oval yapıya dönüşür. Paraziti çevreleyen bir parazitofor vakuol oluşumuyla bir araya gelerek kümelenir. Bu alan konak hücre membranı ile birleşerek parazit-konakçı arayüzü oluşturur. Sporozoitler konakçı hücre sitoplazması ile doğrudan temas halinde değildir, ekstrasitoplazmik yerleşimlidir ve parazitofor vakuolü içindedir (34,36,37).

2.2.2. Merogoni (aseksüel çoğalma)

C. parvum'un bağırsakta asıl tutunma yeri ileum ve jejunumdur. Konağın bağırsak epitel hücreleri içine giren sporozoitler, mikrovillüslerde trofozoit (tek nükleuslu merontlar)

formuna dönüşür. Bununla beraber sporozoitler sindirim kanalına ek olarak safra kanalları, pankreatik kanal ve solunum sistemini de tutabilmektedir. Sporozoitler 4,9x1,2 µm ebadında olup çekirdekleri 1/3 arka kısmındadır, duvarı ise yaklaşık 49 nm kalınlığında, renksiz ve düz yapıdadır (38-41). Trofozoitler ise 2-2,5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapıya sahiptir. Tam gelişmemiş olan apikal kompleks, trofozoitler olgunlaşınca kaybolur ve ribozomal endoplazmik retikulum meydana gelir. Trofozoit form konak hücre içerisinde eşeysiz olarak şizogoni ile çoğalarak 6-8 merozoit oluşur. Merozoitleri taşıyan hücreye meront I (şizont) denir. Meront I'lerin parçalanması ile serbest kalan merozoitler diğer hücrelere girerek yeni bir şizogoniyi başlatırlar ve meront I veya meront II'ye farklılaşırlar. Meront II içerisinde şizogoni sonrası 4 merozoit oluşur. Meront II'lerden oluşan merozoitler yeni hücreleri enfekte eder ve gametogoninin oluşmasında rol oynar (42,43).

2.2.3. Gametogoni

Meront II içinde oluşan 4 merozoit hücre parçalanınca serbest kalır yeni bir döngü oluşturmazlar ancak bu merozoitler konakta yeni hücrelere girerek mikro veya makro gametositlere, devamında ise makro ve mikrogametlere dönüşürler (42,44,45). Her bir mikrogametosit 16 tane mikrogamet ve her bir makrogametosit hücreden yalnızca bir makrogamet meydana gelir (46-48).

2.2.4. Fertilizasyon

Konak içinde bağırsak lümeninde serbest bulunan ince yapılı kamçısız ve 0,4- 0,5 µm büyüklüğünde mikrogametlerden birisinin, 4-6 µm büyüklüğündeki makrogameti döllemesi ile zigot oluşur (48,49). Dölleme sonucu oluşan zigot, dört sporozoiti olan kalın ve ince duvarlı ookist oluşumu için iki aseksüel sporogoni döngüsü sonunda üretilir (50).

2.2.5. Ookist duvar oluşumu

Dölleme için konakçı hücre zarına bağlanan mikrogamet, makrogametositin sitoplazması içindeki çekirdeğine girer veya nükleer içeriğini membranından geçirir. Mikrogametlerin makrogametositleri nasıl tespit ettiği tümüyle açıklanamamıştır. Varsayıma göre yalnızca döllemiş makrogametositleri ookist yapıya dönüşmektedir. Zigotun etrafı üç farklı tabakanın birleşmesinden oluşan ookist duvarıyla çevrili haldedir (1, 40).

2.2.6. Sporogoni

Enfektif sporozoitler konak hücrede olgunlaşan ookistler içinde sporlanma sonucu oluşur. Eşeyli üreme sonucunda parazitte iki farklı tipte ookist oluşur ve yaklaşık %80'i kalın duvarlı, %20'si ise ince duvarlıdır. Duvar yapısı ince olan ookistler içinde 4 sporozoit bulunur. Ookistler bağırsak boşluğunda açılırlar ve sporozoitler serbest kalır. Serbest kalan sporozoitler yeni epitel hücresi içine girer ve konakta enfeksiyonun devamından sorumludur. Bu bulaş şekline “oto enfeksiyon” denir (51-53). Kalın yapıdaki 2. tip ookistler ise sporlanarak konak dışkı ile dışarıya atılır ve konaklar arası bulaşmada rol oynar (38,54,55).

Ookistler, kontamine yiyecek içeceklerle, fekal-oral yolla ağızdan, yakın temasla veya nadiren aerosol ile alınırlar. Yani bulaşma ara konakçı olmadan gerçekleşmektedir. Ookistler iklim ve çevre şartlarına uzun süre dayanıklı yapıya sahiptir (51,52,56,57).

2.3. Patogenez

Cryptosporidium enfeksiyonlarının patogenezini konak hücrenin epitel hücre mikrovilluslarına yapışarak bağırsak mukoza yapısını tahrip etmesiyle başlamaktadır (58). Parazitin sebep olduğu patofizyolojik değişimler, gelişim evrelerine göre açıklanmaktadır. Bağırsağın fonksiyonel bozukluğu sonucu mukoza yüzey alanı azalır ve çok sayıda mikrovillus kaybına yol açar bu durum mikrovillus atrofi ile sonuçlanır. Böylelikle önemli sindirim enzimleri kaybıyla protein ve şekerlerin parçalanması yetersiz kalarak malabsorbsiyon oluşur (59). Bağırsak lümenindeki oligosakkaritler ve aktif disakkarit suyu bağlayarak ozmotik ishal gelişmesine neden olur (60). İmmün sistemi baskılanmamış konaklarda parazit sıklıkla ileumda ve terminal jejunumda yerleşerek enfeksiyona neden olurken immün sistemi baskılanmış konaklarda ise mide, kolon, bilier kanal, duodenum, solunum sistemi ve pankreatik kanala yerleşerek enfeksiyona sebep olabileceği açıklanmıştır (61,62). Parazit-konakçı etkileşimi parazit ligandı, konağın reseptörü, parazitofor vakuol oluşumu ve invazyon ile gerçekleşir. *Cryptosporidium parvum*'un üremesi ve gelişimini tamamlaması için konakçı enflamatuvar yanıtını azalttığını, epitel hücrelerin apoptozunu engellediği ve bu durumun patogenezde payı olduğu düşünülmektedir (63,64).

2.4. Klinik

Kriptosporidiyozda enfektif ookist dozunun insanlarda oldukça az sayıda olduğu, bazı türlerde 10'dan daha az ookistin yeterli olduğu bildirilmiştir (15,65). Ookist atılımı yoğunluğuna bağlı

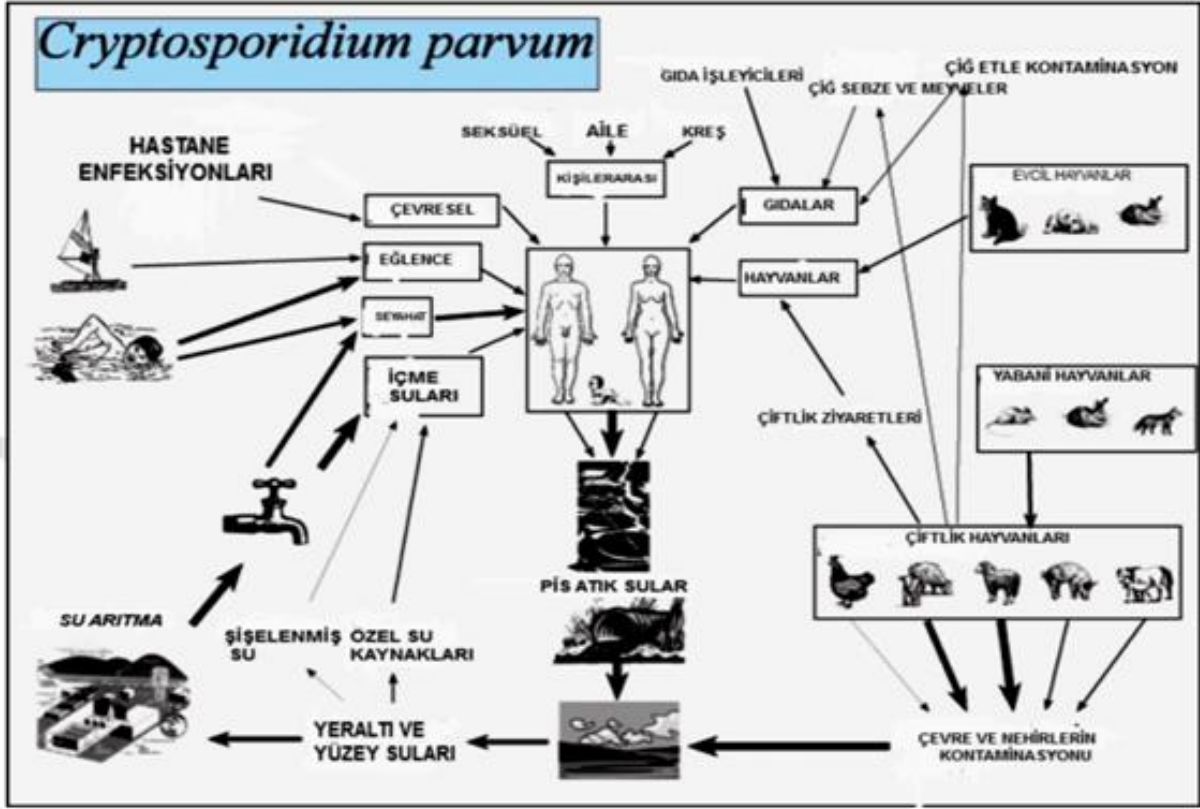
olarak konakçıda meydana gelen semptomların şiddeti ve süresi değişmektedir (66). Semptomların şiddetini etkileyen etkenlerden biri enfeksiyonun yerleşim yeridir. İnce bağırsağın üst bölgesine tutunması ile daha şiddetli ve sulu ishal görülür. Kalın bağırsak ve distal ileuma lokalize ise hafif seyirli ishal olabilir ya da klinik belirti vermez (67). Konakçının immün yanıtı hastalığın şiddetini etkileyen en önemli etkindir. İmmün sistemi baskılanmamış konakçılarda çoğunlukla asemptomatik olarak seyrederek. Semptomatik enfeksiyonda 7-10 gün süreyle mukus içeren sulu ishal, nadiren lökositli ve kanlı dışkı görülmektedir. Hastaların %90'ından fazlasında kuluçka periyodundan sonra iki hafta mide bulantısı, kusma, krampa benzer abdominal ağrı ve akut ishal; %36'sında bu belirtilere ek olarak ateş gibi semptomlar da görülür. Devamında tam iyileşme ile sonuçlanabilir (68). AIDS tablosu gelişen HIV pozitif hastalarda CD4+ T lenfosit seviyesinin aşırı düşmesine bağlı ishale eşlik eden solunum sistemi veya diğer sistemlerde farklı klinik tablolar gelişir, ölümle sonuçlanabilir (69). Özellikle kusma görülen hastalarda tablonun altta yatan sebebi hepatobilyer sistem ve mide enfeksiyonlarıdır (70,71).

2.5. Epidemiyoloji-Bulaşma

Dünya genelinde yaygın olan su kaynaklı kriptosporidyoza salgınlarında en sık karşılaşılan etken *C. parvum*'dur. *C. parvum* kaynaklı enfeksiyon nedeniyle her yıl yaklaşık 3,4 milyon insan yaşamını kaybetmektedir (72). Parazit ishal etkeni olarak rotavirüs enfeksiyonlarından sonra çocuklarda ikinci sırada olup ishal kaynaklı ölümlerin %10,5'inden sorumludur (73).

İnsanlarda *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonu için risk faktörleri; yetersiz beslenme, epidemik alanlara seyahat, enfekte kişilerle yakın temas, immün sistemin baskılandığı durumlar, 0-4 yaş arası ve 60 yaş üstü olma, besi-evcil hayvanlar ve özellikle buzağı dışkısı ile temas, bozuk kanalizasyon ve uygun şekilde arıtılmamış içme suları olarak bilinmektedir (46,74,75).

ABD'de içme suyu kaynaklı 400.000 kişi *C. parvum* ile enfekte olmuştur. Bu parazitin su kaynaklı epidemik sebepleri arasında; içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, prevalansının yüksek olması, klora dirençli olması ve çok düşük sayıda ookistin enfeksiyon yapabilmesi gösterilmektedir. Günümüzde kullanılan su arıtma yöntemleri bu nedenlerle yetersiz kalmaktadır ve yüzme havuzu ve içme suyu kaynaklı kriptosporidyoza salgınları bildirilmiştir (22,53).



Şekil 3. *C. Parvum*' un bulaşma yolları ve epidemiyolojisinde rol alan faktörler (76)

Bulaş enfekte insan ve hayvanların dışkıyla atılan ve çevreye yayılan dirençli ookistler ile gerçekleşir. Dışkıda ookistlerin tespiti ile saptanan enfeksiyon prevalansının, ABD ve Avrupa'da %1-3, gelişmekte olan ülkelerde ise %5-10 arasında olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de ise yapılan çalışmalarla insanlarda kriptosporidiyoz insidansının %0-35,5 arasında değiştiği ve olguların bahar aylarında yükselerek, Eylül-Ekim aylarında pik yaptığı bildirilmiştir (77).

Nemli hava ve sıcaklıkla birlikte ookist yoğunluğundaki artışa bağlı *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında artış görülmektedir. Bilim adamları kriptosporidiyozun özellikle nemli ve ılık mevsimlerin hastalığı olduğunu bildirmiştir. Bol yağış parazitin içme sularına ve gıdalara bulaşma riskini artırmaktadır (78-80).

2.6. Tedavi-Koruma

C. parvum ile enfekte konaklarda birçok ilaç tedavisi uygulanmasına rağmen tam bir parazitolojik iyileşme sağlanamamıştır. Kriptosporidiyoz olgularında uygulanan tedavi enfeksiyonu kalıcı olarak tedavi etmede yetersizdir. Sadece bazı ilaçlar ookist atılımını

azaltabilmiştir. Bu nedenle öncelikle hijyenik koşulların iyileştirilmesi ile bulaşın engellenmesi önerilmektedir (80,81).

Kriptosporidiyozun insan vakalarında tedavi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı tek ilaç nitazoksaniddir (82,83). 1980'lerde yapısal olarak metronidazole benzeyen tiyazol halkasının benzamidin ile birleştirilmesiyle sentezlenmiştir. Çalışmalar sonucunda nitazoksanidin geniş spektrumlu antihelmintik, antiviral ve antiprotozoer güçlü etkisi olduğu bildirilmiştir. Mısır'ın Delta bölgesinde yapılan plasebo kontrollü çalışmada immün sistemi baskılanmamış 12 yaş üstü hastalarda *Cryptosporidium* türlerinin enterit ve ishal tedavisinde üç günlük nitazoksanid kullanımı etkili olduğu gösterilmiştir (84).

İçme sularının rutin olarak klorlanması bu parazitten kaynaklı enfeksiyonların önlemek için yeterli değildir. % 5,25 sodyum hipoklorit içeren çamaşır suyunda 30 dakikada ölümler ancak beş kat seyreltilmiş çamaşır suyunda 12 dakikaya dek canlılığını korumaktadır (38).

Klorlama ookistler üzerine sınırlı etki gösterdiğinden suların arındırılmasında klorlama ile birlikte flokülasyon ve filtrasyon da uygulanmalıdır. Filtre porları ookist çapından daha dar ($\leq 1 \mu\text{m}$) olmalıdır. Ultraviyole ışın ve ozon dezenfeksiyonda etkilidir ancak nadiren kullanılmaktadır. Ookistler suyun kaynama sıcaklığına getirilmesi ile de enfektivitelerini yitirmektedir (22).

C. parvum ookistleri 64,2°C'de 2 dakika içinde canlılığını yitirir. 4°C'de aylarca, 25°C'de 2 hafta, 35°C'de 1 hafta canlı kalabilir. 0°C'nin altındaki soğuk protozoonu etkilemez, ancak hızla dondurulduğunda enfektivitesi önemli ölçüde düşer. Atık sularda pH 7-10 arasında canlı kaldığı gösterilmiştir (85). Çevre koşullarına dayanıklı olması nedeniyle yüzme havuzları, eğlence amaçlı su tesisleri enfeksiyona kaynak olabilir. Herhangi bir kontaminasyon oluşması durumunda havuzun geçici süre kapatılması gibi acil önlemler alınmalıdır (22).

2.7. Tanı

Klinik laboratuvarlarda enfeksiyonun tanısı için dışkıda mikroskopik inceleme ile ookist aranması en temel yöntemdir (33). Ancak mukozal biyopsi taramaları, bronkoalveolar lavaj, endoskopi, ince bağırsak aspiratı, endoskopik pankreas kanalları grafisi ookistlerin saptanması amacıyla kullanılmaktadır (33,86).

C. parvum enfeksiyonunun tespitinde kullanılan temel yöntemler;

1. Direkt Mikroskopik yöntemler

- Flotasyon tekniği
- Sedimentasyon tekniği
- Boyama tekniği

2. İmmunolojik ve serolojik yöntemler

- Antikor tekniği
- Antijen tekniği

3. Akım Sitometrisi

4. Histopatolojik incelemeler

5. Moleküler Yöntemler

2.7.1. Mikroskopik yöntemler

Dışkının makroskopik bakışı enfeksiyon şüphesi uyandırsa bile kriptosporidiyozise spesifik bir bulgu bulunmamaktadır. Dışkıda kan görülmesi *C. parvum* enfeksiyonu için ender bir bulgudur ve bu durum parazitle birlikte tespit edilen başka bir enteropatojen ait olabilir (87).

Parazitin neden olduğu ishallerde mukus sık görülür ve incelemeye alınan örneğin mukuslu kısımlarından seçilmesi gerektiği bildirilmiştir (33,88). Yapılan araştırmalarda hasta bireylerin dışkı taramasında %75 oranında lökosit de görüldüğü belirtilmiştir (3). Enfekte konakçıda parazitin saptanmasında dışkı boyama, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), akım sitometrisi, immün floresans antikor (IFA), PCR gibi yöntemler kullanılsa da rutin klinik laboratuvarlarda en sık uygulanan yöntem dışkının mikroskopik incelemesinde ookist görülmesidir (33,89). Ancak parazitozun tanısında dışkı kullanıldığı gibi, tükürük, safra ve diğer vücut sıvısı örnekler de %10 formalin veya sodyum asetat-asetik, asit-formalin ile fikse edilerek ya da taze olarak kullanılabilir. Fikse edilmiş örnek kullanımı daha güvenlidir (66).

Mikroskopik dışkı incelemesinde, direkt yayma ile hazırlanan boyalı preparatlarda görülme şansını artırmak amacıyla ookistler konsantrasyon teknikleri ile yoğunlaştırılır. Ookistlerin su kaynaklarında ve klinik örneklerde tespiti için kullanılan konsantrasyon yöntemleri; formalin-etil ve formalin-eter asetat sedimentasyon yöntemleri, Percoll-sükroz

yöntemi, Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi, doymuş sodyum klorür yöntemi ve doymuş çinko sülfat yüzdürme yöntemleri, demir III sülfat yüzdürme yöntemi ve cam boncuklarla ayırıştırma teknikleridir. Sheather şekerli yüzdürme yöntemi, Formalin-etil ve formalin-eter asetat sedimentasyonu sık tercih edilen yöntemlerdir (33,46,90-92). *Cryptosporidium* ookistlerinin çöktürme yönteminde 1.000-1.500 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılması yeterlidir (66,33,91,92).

Cryptosporidium parvum ookistleri direkt mikroskopide mayalarla benzerlik gösterdiğinden boyasız preparatlarda tanımlamak zordur. Bu nedenle preparatlarda boyama tekniklerinin kullanılması gerekir. Bu teknikler arasında auramin-rodamin, akridin oranj, modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen aside dirençli boyama yöntemi, Kinyoun aside dirençli boyama yöntemi, Giemsa ve safranin boyama yöntemleri sayılabilir (93) (Tablo 3)

Tablo 3. Parazit ookistlerin farklı boyama yöntemlerinde mikroskopi görünümü (93)

Boyama Yöntemi	Maya	Ookist
Giemsa	Eflatun	Eflatun
Akridin oranj	Kırmızı-turuncu	Yeşil-sarı
Kinyoun aside dirençli	Mavi-yeşil	Kırmızı-mor
Auramin-Rodamin	Görünmez	Portakal rengi
Modifiye EZN aside dirençli	Mavi-yeşil	Parlak kırmızı

Giemsa boyama tekniği kolay olup hazırlanan preparatlar uzun süre muhafaza edilebilir. Ancak Giemsa boyalı preparatlarda parazit ookistlerini diğer mikroorganizmalardan ve sporelerden ayırt etmek güçtür (94).

Cryptosporidium ookistlerinin tespitinde akridin-oranj, auramin-rodamin gibi floresan boyalar da kullanılmaktadır (33,91,93). Boyanan preparatlar x100 objektifte floresan mikroskopunda incelendiğinde yuvarlak-oval şekilli ookistler, boyaya göre siyah zemin üzerinde sarı-yeşil veya turuncu renkte ayırt edilebilir. Ancak, ookistlerin yeteri kadar boya almamasından dolayı içyapısı seçilemez, tekniğin kalite kontrolü de zordur (93-95).

Ziehl-Neelsen aside dirençli boyama yöntemi, minör modifikasyonlarla sıcak veya soğuk uygulanabilir. Sıcak boyamada karbol fuksin eklendikten sonra lam alttan ısıtılırken soğuk boyamada ısıtılmaz. Sıcak tekniğin dezavantajı ısıtma işlemi sırasında tahriş edici maddelerin buharlaşması ve tehlikeli buharı uzaklaştırmak için havalandırma sistemi gerektirmesidir (22,66,96).

Kinyoun aside dirençli boyama yönteminde lama tespit metanolla yapılır ve boyanın alttan ısıtılması gerekmez (96). Parazitin ookistleri morfolojik açıdan maya hücreleri, küf sporları, yağ globüllerine benzerlik gösterebilir. Ookistleri ayırt etmek için en sık kullanılan yöntemdir ve *Cryptosporidium* ve *Cyclospora* ookistleri büyüklük ve şekil bakımından farklılık gösterir. Ancak tespit işlemlerine bağlı olarak küçülen *Hymenolepis diminuta* yumurtası da kırmızı görünüme sahip olacağından ookistlerle karıştırılabilir (33,92,93,97-99). Bu teknik sık kullanılsa da özgüllük ve duyarlılığı düşüktür (68).

Maliyeti ucuz ve hızlı yöntem olan mikroskopik yöntemlerin tekrarlanabilir, izlenebilir yöntem olmaması, deneyimli eleman gereksinimi, parazit ookistlerin aralıklı atılımı nedeni ile her zaman tek bir dışkı örneğinin etkeni tespit etmek için yeterli olmaması yöntemin diğer dezavantajlarıdır (100).

2.7.2. İmmünolojik yöntemler

Boyama yöntemlerine göre daha hassas ve özgül olan indirekt floresan antikor testi (IFA), direkt immünfloresans testi (DFA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve hızlı tanı kitleri dışkıda ookist varlığının araştırılması için geliştirilmiştir (101).

Floresan antikor testinde floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlar kullanılır ve hassasiyeti yüksektir. Monoklonal antikorlar ookistlerin antijenik yapısına bağlanır ve floresan boya ile görünür hale getirir. Bağlanma sonrası ookistler yeşil, zemin ise siyah görünmektedir. Dışkıda az sayıda ookistin saptanmasına olanak sağlar. Boyama yöntemine göre değişmekle birlikte yüksek özgüllüktedir, ancak pahalıdır ve deneyimli elemana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu teknik ile ookist yoğunluğu 1 gram dışkıda 5×10^5 'e ulaştığında saptanabilmektedir (16,102). Altın standart yöntem kabul edilmektedir (15).

Kriptosporidiyoz tanısında kullanılan direkt floresan antikor testinde gaita örneği lam üzerine yayılarak tespit edilir ve üzerine doğrudan floresanla işaretli ookiste özgül antikorlar konur (103).

Diğer bir teknik olan ELISA'da, gaitadaki ookist antijenleri enzimle işaretli antikorlar aracılığı ile saptanır (104). Floresan antikor testine göre daha fazla örneğin aynı anda test edilmesini sağlayan ELISA testinin duyarlılığı ticari kite göre değişmektedir ve genellikle %90'ın üzerindedir (15).

Antikor tarama yöntemlerinde en sık tercih edilen iki antijen; Cp17 ve Cp23 antijenleridir. Sırasıyla 17 ve 27 kDa büyüklüğündeki bu proteinlerin konak doku

invazyonunda kullanıldığı düşünülmektedir ve serolojik belirteç olarak antikor yanıtına yol açarlar. Bu antijenlerin kullanıldığı antikor saptama yöntemleri yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (105,106). Daha çok seroprevalansın belirlendiği epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilir (15).

Ancak, antijen-antikor temeline dayalı olan bu yöntemler, diğer mikroorganizmalarla belli oranda çapraz reaksiyon yapabilme riski taşımaktadır ve yanlış pozitifliğe neden olmaktadır, Ookist canlılığı ve enfektif dozun tespit edilememesi bu tekniklerin dezavantajlarıdır (56,107).

2.7.3. Histopatolojik yöntemler

Cryptosporidium parvum konak hücrenin bağırsak epitel hücre mikrovillus yüzeyine yerleşim gösterir bu bölgeden biyopsi ile alınan şüpheli örneğin mikroskopik incelenmesi parazit ookistinin saptanması için önemlidir. Bu teknikler dokuda var olan parazit ookistinin tanısına olanak sağlar ancak örneğin alındığı bölgede ookist yoksa yalancı negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (108).

2.7.4. Kültür

Cryptosporidium türleri canlı hücre besiyerlerinde *in vitro* çoğaltılabilmektedir. HCT-8 gibi hücre dizileri kullanılarak yapılan hücre kültürlerinde yaşam döngüleri tanımlanabilmektedir. İlk canlı hücre içermeyen besiyeri 2004 yılında tanımlanmıştır. Bu besiyerlerinin dezavantajı; parazitin çok küçük olması ve besiyerinde kümeler halinde bulunması nedeniyle parazitin yaşam evrelerinin tanımlanma güçlüğüdür (109). Hücre kültürünün bir diğer güçlüğü de parazitin ince duvarlı ookistleri *in vitro* ortamda oluşmaması nedeniyle devamlılığın sağlanamamasıdır. *In vitro* kültürdeki zorluklara rağmen, şimdiye dek tanımlanmış yöntemlerle ilaç etkinliği ve ookist dezenfeksiyon yöntemlerinin denenmesi, gen ekspresyonu ve biyolojik özelliklerinin araştırılması mümkün olmaktadır (110, 111).

2.7.5. Moleküler yöntemler

Cryptosporidium türlerini çeşitli klinik materyallerden, çevresel kaynaklardan saptamak ve taksonomisini belirlemek amacıyla PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi kullanılmaktadır (16). Hedef etkenin genetik materyalini saptama temeline dayanır ve bu yöntem içerisinde çok az etken bulunan, donmuş-kötü şartlarda saklanmış örnekler için de uygun bir yöntemdir. Moleküler yöntemler salgınlarda türlerin belirlenmesine olanak

sağlamaktadır (33). Konvansiyonel yöntemlerle elde edilen pozitifliklerin genotip ve tür düzeyinde identifikasyonuna olanak sağlamamaktadır (112). Bu amaçla kriptosporidiyozis olgularında kantitasyona da olanak sağlayan gerçek zamanlı/real-time PCR, çeşitli spesifik gen bölgelerini hedef alan nested-PCR gibi pek çok moleküler yöntem, etkenin tür düzeyinde belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır (113,114).

Real-time PCR; duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, hızlı sonuç vermesi, kantitatif olarak hedef patojenin gen bölgesinin belirlenmesi, kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması, mutasyon analizlerinin belirlenmesi gibi çeşitli özellikleri ile konvansiyonel PCR, nested PCR ve antijen-antikor tabanlı tekniklere göre üstün ve öne çıkan yöntemdir (114,115).

Cryptosporidium türlerinin PCR ile saptanması için; ribozomun küçük alt birimine ait RNA'yı kodlayan 18s SSUrRNA gen bölgesi, β tubulin kodlayan mRNA geni, 70-kDa ısı şok protein kodlayan hsp 70 mRNA gen bölgesi, aminoglikozidaz enzimi kodlayan mRNA geni, T-kompleks protein 1 delta TCP-1-chaperonin gen bölgesi, methionin aminopeptidaz geni, *Cryptosporidium* 1 genin Thrombospondin-related adhesive protein TRAP-C1, *Cryptosporidium* 2 genin Thrombospondin-related adhesive protein TRAP-C2, *Cryptosporidium* ookist duvar proteini (COWP), telomeraz kodlayan gen bölgeleri kullanılmaktadır (116,117).

COWP (*Cryptosporidium* oocyt wall protein) geninin hedeflendiği PCR ve ardından RFLP ya da nükleotid dizi analizi ile *Cryptosporidium* türlerinin ayrımı mümkün olmaktadır (118).

Çok sayıda gastrointestinal etkeni aynı anda saptayabilen ticari multipleks/sendromik testler geliştirilmiştir. Genel olarak hepsinin özgüllük ve duyarlılıkları yüksektir. Ancak maliyetleri yüksektir ve klinik ile uyum göstermeyen sonuç verebilir (22).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Çalışmanın amacı *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılan 'çöktürerek yoğunlaştırma + mikroskopik inceleme' ile yeni ve daha duyarlı olan moleküler yöntemin (PCR) karşılaştırılması ve moleküler yöntemin rutin kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesidir.

Çalışmada Ocak 2021- Eylül 2021 tarihleri arasında kliniklerden Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin parazit araştırması için gönderilen 110 dışkı örneği çalışmaya dahil edildi.

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen gaita numuneleri *Cryptosporidium parvum* ookisti varlığı açısından, %10 formaldehit-etil asetat çözeltisi ile çöktürerek yoğunlaştırma işleminin ardından lam üzerinde yayma preparatı hazırlanarak Kinyoun aside dirençli boyama yöntemiyle mikroskopik olarak incelenmiştir.

Gerçek zamanlı PCR öncesi, gaita örneklerinden DNA izolasyonu spin-kolon yöntemi ile yapılmıştır. Saflaştırılan örnekler PCR testine kadar -80°C'de saklanmıştır. Gerçek zamanlı PCR, ticari test kiti (Nzytech *Cryptosporidium parvum* Real-Time PCR Kit, Katalog No: MD00831, Lizbon, Portekiz) ile yapılmıştır.

3.1.1. Mikroskopik inceleme

Kullanılan Malzeme:

- İmmersiyon yağı
- Parazit kist/yumurta çöktürme kiti (Apacor Midi Parasep SF Faecal Parasite Concentrator, Katalog No: 149900, Berkshire, İngiltere)
- Triton X-100 (Sigma, Katalog No: T8787, St. Louis, ABD)
- Santrifüj, 15 ml tüp için (Heraeus Labofuge 400 Function Line, Hanau, Almanya)
- Işık mikroskobu (Olympus CX41, Nagano, Japonya)
- Plastik gaita karıştırma çubuğu
- Lam ve Lamel

- Kinyoun aside dirençli boyama seti (RTA.K.K.109) (Kinyoun karbol fuksin çözeltisi, Kinyoun metilen mavisi çözeltisi, asit-alkol çözeltisi)

3.1.2. Çöktürme ile konsantrasyondan işlemi

Yoğunlaştırmak amacıyla gaita örneklerini %10 formalin içeren Parazit kist/yumurta çöktürme kiti (Katalog No: 149900, Apacor Midi Parasep SF Faecal Parasite Concentrator, Berkshire, İngiltere) kullanıldı. Üreticinin önerileri doğrultusunda;

- Parazit kist/yumurta çöktürme kiti içeriğinde bulunan 8 ml %10 formalin içeren tüpe sürfaktan olarak 20 mikrolitre Triton X-100 eklendi.
- Tüpe yaklaşık 0,5 gram (bezelye tanesi kadar) gaita eklenerek vorteks ile iyice karışması sağlandı.
- 3.000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant döküldü.
- Dipteki çökeltiden 1 damla, önceden hazırlanmış temiz lama aktarıldı ve kuruması için bırakıldı. Kuruyan preparatlar Kinyoun aside dirençli boyası ile boyanarak mikroskopta incelendi.

3.1.3. Direkt mikroskopik inceleme

Gönderilen dışkılar *Cryptosporidium parvum* ookisti varlığı açısından Kinyoun aside dirençli boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. Bu amaçla çöktürme ile konsantrasyon sonrası hazırlanan ve kurumaya bırakılan lam yayma preparatlarına Kinyoun aside dirençli boyama işlemi üretici önerileri doğrultusunda yapıldı;

- Yayma üzerine Kinyoun karbol fuksin çözeltisi eklenerek 2-3 dakika bekletildi.
- Su ile yıkandı.
- Preparat asit-alkol çözeltisi ile renksiz sıvı akıncaya kadar yıkandı.
- Su ile yıkandı. Fazla su silkeleyerek uzaklaştırıldı.
- Preparata Kinyoun metilen mavisi çözeltisi eklenerek bu şekilde 20-30 saniye bekletildi.
- Su ile yıkandı. Fazla su silkelenerek uzaklaştırıldı.
- Havada kuruduktan sonra 1 damla immersiyon yağı damlatılarak x100 objektifle mikroskopik olarak incelendi.

3.2. Gerçek Zamanlı PCR

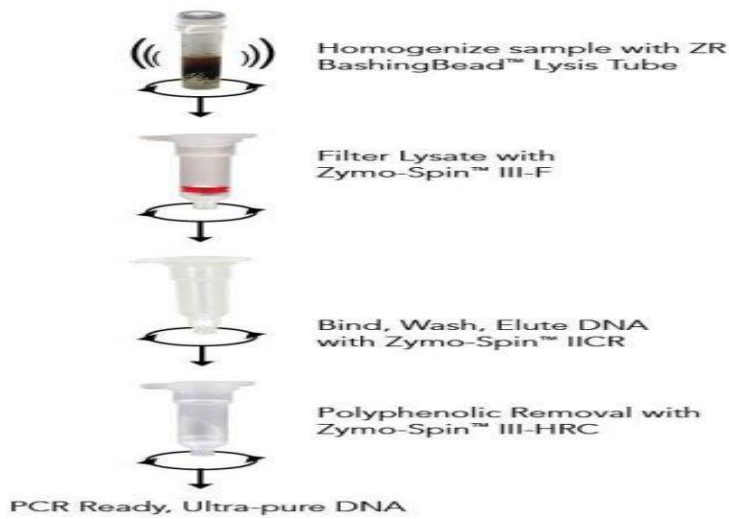
Kontaminasyonu engellemek amacıyla PCR işleminin üç aşaması (PCR karışımının hazırlanması (PCR öncesi), fekal DNA izolasyonu ve PCR karışımına saf DNA'nın eklenmesi (PCR), cihaza yükleme ve görüntüleme (PCR sonrası) ayrı tahsis edilmiş odalarda gerçekleştirildi.

3.2.1. Fekal DNA izolasyonu

Kullanılan Malzeme:

- Fekal DNA izolasyon kiti (Zymo Research Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, Katalog No: D6010, Irvine, ABD)
- Vidalı kapaklı, steril, RNaz-DNaz içermeyen 2 ml tüp (Medpoint, Katalog No: MP-002-CT, Çin)
- Vorteks (Dragon Lab MX-S)
- Mekanik Parçalama Cihazı (Analytikjena SpeedMill P12)
- Mikrosantrifüj
- Plastik gaita kaşığı
- Spektrofotometre (Thermo Nanodrop 2000 Spectrophotometer)

Gaita örneklerinden fekal DNA izolasyonu/ekstraksiyonu için kitin kullanım prosedürü birebir uygulandı:



Şekil 4. Fekal DNA'nın spin-kolon yöntemi ile saflaştırılması (kit kullanım kılavuzundan)

1. Mikroskopik incelemeden sonra izolasyon işlemine dek eksi 80°C’de saklanan gaita örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü.
2. Oda sıcaklığına ulaşan gaita örneklerinden gaita kaşığı yardımı ile ≤ 150 mg (silme gaita kaşığı) **BashingBead™ Lysis** tüpüne aktarıldı ve üzerine 750 μ l **BashingBead™ Buffer** eklendi.
3. Mekanik parçalama cihazında 8 dakika tutularak iri partiküller parçalandı ve homojenize edildi.
4. **BashingBead™ Lysis** tüpü mekanik parçalamadan çıkarılarak 10.000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda tüp içerisinden 400 μ l süpernatant kısmı alınarak **Zymo-Spin™ III-F** filtresine aktarıldı ve **Collection** tüp içinde 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.
6. **Collection** tüpüne geçen filtratın üzerine 1.200 ml **Genomic Lysis Buffer** eklendi ve vortekslenerek iyice karışması sağlandı.
7. Karışım **Zymo-Spin™ IICR** kolonuna aktararak 10.000xg’de 1 dakika santrifüjlendi.
8. **Collection** tüp değiştirilerek **Zymo-Spin™ IICR** kolonun üzerine 200 μ l **DNA Pre-Wash Buffer** eklendi.
9. 10.000xg’de 1 dakika santrifüjlendi.
10. **Collection** tüp değiştirilerek **Zymo-Spin™ IICR** kolonun üzerine 500 μ l **DNA Wash Buffer** eklendi.
11. 10.000xg’de 1 dakika santrifüjlendi.
12. **Zymo-Spin™ IICR** kolonu 2 ml tüpe yerleştirildi.
13. Üzerine 100 μ l **DNA Elution Buffer** eklenerek 10.000xg’de 30 saniye santrifüjlendi.
14. **Zymo-Spin™ IICR** kolondan elüsyonu yapılan sıvı hazırlanmış **Zymo-Spin™ III-HRC** filtresine aktarıldı ve 16.000xg’de 3 dakika santrifüj edildi.
15. Ekstrakta bulunan DNA’nın saflığı spektrometrede değerlendirildi, 260/280 nm absorban oranı 1,8-2,2 aralığında ölçülen filtratlar artık/proteinden arındırılmış kabul edildi. Aralık dışı ölçüm veren örneklerde DNA izolasyon işlemi baştan itibaren tekrarlandı.
16. Saflaştırılmış DNA PCR’da kullanıldı.

3.2.2. Gerçek zamanlı PCR

Kullanılan Malzeme:

- Gerçek zamanlı PCR/Real-time qPCR karışımı (Nzytech *Cryptosporidium parvum* Real-Time PCR Kit, RUO ZPT gene, Katalog no:MD00831, Lizbon, Portekiz)
- Isı döngü cihazı (BioRad CFX96 TOUCH Real-Time PCR Detection, Katalog No: 1855196, ABD)

Gerçek zamanlı PCR testi, gerçek zamanlı PCR/Real-Time qPCR karışımı kiti üreticisinin önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Prosedür:

1. PCR öncesi temiz odada soğuk blok üzerinde; örnek sayısı, negatif kontrol (DNaz-RNaz içermeyen su), pozitif kontrol ve pipetaj kaybı (+1 reaksiyon) göz önünde bulundurularak Tablo 4'e göre reaksiyon karışımı hazırlandı.
Isı döngü cihazına uygun PCR strip tüplerine 15 µl dağıtıldı.

Tablo 4. PCR karışımının hazırlanması

Reagen (mikrolitre)	1 Reaksiyon için miktar (µL)
RNaz-DNaz içermeyen su	4
<i>C. parvum</i> primer/kalıp karışımı	1
Lyo NYZSupreme qPCR master mix (2x)	10
Toplam	15

2. Karışım dağıtılmış PCR strip tüpleri soğuk blok üzerinde PCR odasına taşınarak burada üzerlerine 5 µl saflaştırılmış DNA eklendi.
3. Tüpler, sıcaklık-okuma profili Tablo 5'e göre ayarlanan ısı döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 5. Isı döngü cihazı sıcaklık ve okuma profili

Döngü Sayısı	Sıcaklık ve Süre
1	95°C'de 2 dakika
50	95°C'de 5 saniye
	60°C'de 30 saniye [OKUMA]

4. Cihaz çalışmasını tamamladıktan sonra sonuçlar değerlendirildi. Sigmoidal görünen her eğri pozitif sinyal olarak değerlendirildi. Hedef tüpte negatif veren örnekler internal ekstraksiyon kontrol kanalında pozitif sinyal varlığında negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3. İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelenmiştir. PCR testinin laboratuvar koşullarında alt saptama limitini belirlemek için Probit regresyon analizi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Veriler IBM SPSS versiyon 22 ile değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

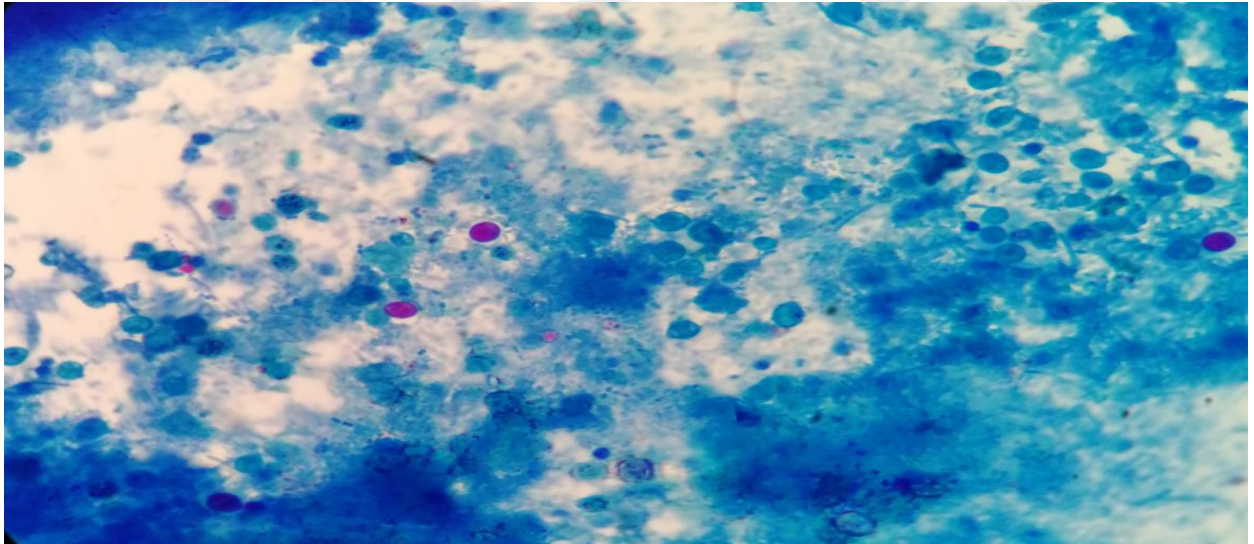
Çalışmada rutin parazitolojik inceleme için gönderilen 110 gaita örneği incelenmiştir. İncelenen örneklerin alındığı hastaların 52'si kadın, 58'i erkek idi; yaş ortalaması 38,3 yıl (yaş aralığı; 0-85) idi. Hastaların demografik özellikleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Çalışma grubunun demografik özellikleri

Cinsiyet	Sayı (%)	Yaş Aralığı	Ortalama Yaş
Kadın	52 (47,3)	5-85	41,3
Erkek	58 (52,7)	0-77	37,3
Toplam	110 (100)	0-85	38,3

4.1. Mikroskopik İnceleme

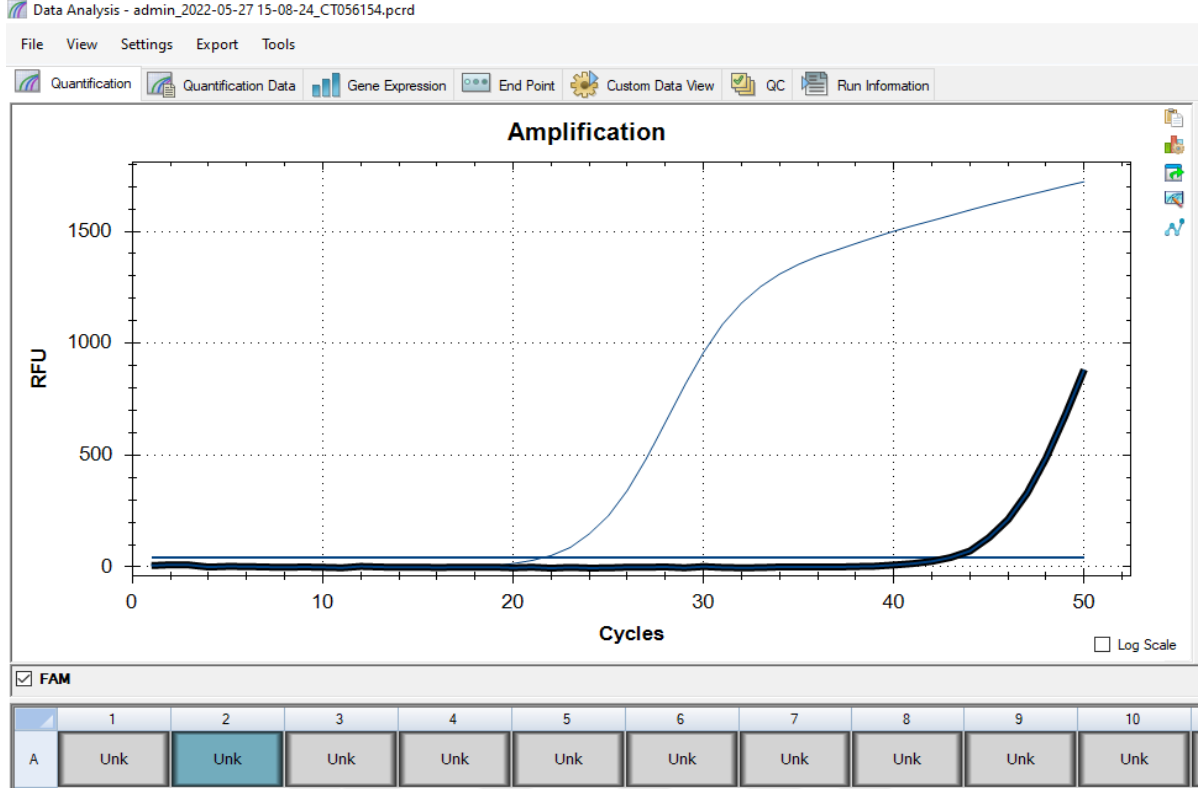
Çöktürme ile konsantrasyon işleminden Sonra Mikroskopik İncelemede; %10 formol asetat ile yapılan çöktürme işlemi ve ardından Kinyoun aside dirençli yöntemi ile boyanarak yapılan mikroskopik incelemelerde 17 (%15,5) örnekte *Cryptosporidium parvum* ookisti saptandı (Resim 1).



Resim 1. Çöktürme ile konsantrasyondan işleminden sonra *Cryptosporidium parvum* ookistleri

4.2. Gerçek Zamanlı PCR (rt-PCR)

Gerçek zamanlı PCR testi ile 5 (%4,5) örnekte *Cryptosporidium parvum* DNA'sı saptanmıştır (Resim 2). Real-Time PCR test sonucu pozitif bulunan örneklerin mikroskopi sonuçları ve hastaların demografik ve klinik özellikleri ile Tablo 7'de gösterilmiştir.



Resim 2. Pozitif sonuç veren örnekte gerçek zamanlı PCR cihazı ekran görüntüsü

Tablo 7. PCR testi ve mikroskopi sonuçları ile hastaların demografik özellikleri ve kliniği

Sıra	Mikroskopik İnceleme Sonucu	PCR Sonucu	Yaş	Cinsiyet	Klinik Bulgu
1	Pozitif	Pozitif	5	Erkek	Karın ağrısı, bulantı-kusma, vitamin eksikliği
2	Pozitif	Pozitif	56	Kadın	Ülseratif kolit, gastroözefajeal reflü
3	Negatif	Pozitif	27	Kadın	Fasiyolizis, parazitoz
4	Negatif	Pozitif	36	Erkek	Böbrek transplantasyonu
5	Negatif	Pozitif	19	Kadın	Diabetes mellitus, kronik ülseratif kolit
6	Pozitif	Negatif	12	Erkek	Solid tümör
7	Pozitif	Negatif	26	Erkek	Gastroözefajeal reflü
8	Pozitif	Negatif	33	Erkek	Kolit
9	Pozitif	Negatif	35	Erkek	Ülseratif kolit
10	Pozitif	Negatif	39	Erkek	Peptik ülser
11	Pozitif	Negatif	41	Erkek	Kolit, reflü
12	Pozitif	Negatif	42	Erkek	reflü, vitaminoz, kolit
13	Pozitif	Negatif	60	Erkek	HIV enfeksiyonu
14	Pozitif	Negatif	62	Erkek	Reflü, konstipasyon
15	Pozitif	Negatif	20	Kadın	Reflü, vitaminoz
16	Pozitif	Negatif	21	Kadın	Chrohn hastalığı
17	Pozitif	Negatif	30	Kadın	Yok (Gebe)
18	Pozitif	Negatif	37	Kadın	Kolit, reflü
19	Pozitif	Negatif	48	Kadın	Reflü, kolit
20	Pozitif	Negatif	62	Kadın	Reflü, kolit

Konsantre edilmiş gaita örneklerinde yapılan mikroskopik incelemede *Cryptosporidium parvum* ookisti görülen 2 örneğin rt-PCR testi de pozitif sonuç vermiştir. PCR testinde ek olarak mikroskopisi negatif sonuç veren 3 örnekte daha PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. İki yöntemin karşılaştırmalı sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Mikroskopi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması

		PCR		Toplam
		Pozitif	Negatif	
Mikroskopi	Pozitif	2	15	17
	Negatif	3	90	93
Toplam (n=110)		5	105	110

PCR referans test alınarak hesaplanan duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif tahmini değerler:

Duyarlılık: $2/5 = \%40,0$

Özgüllük: $90/105 = \%85,7$

Pozitif Tahmini Değer: $2/17 = \%11,7$

Negatif Tahmini Değer: $90/93 = \%96,8$

Doğruluk: $92/110 = \%83,6$

Gaita örneğinde PCR negatif, mikroskopi pozitif sonuç veren 15 hastanın kayıtları incelendiğinde; bir hastada HIV enfeksiyonu, bir hastada solid organ kanseri bulunduğu, diğerlerinin immün yetmezlik ile ilişkilendirilemeyecek kliniği bulunan erişkin olduğu gözlenmiştir (Tablo 7).

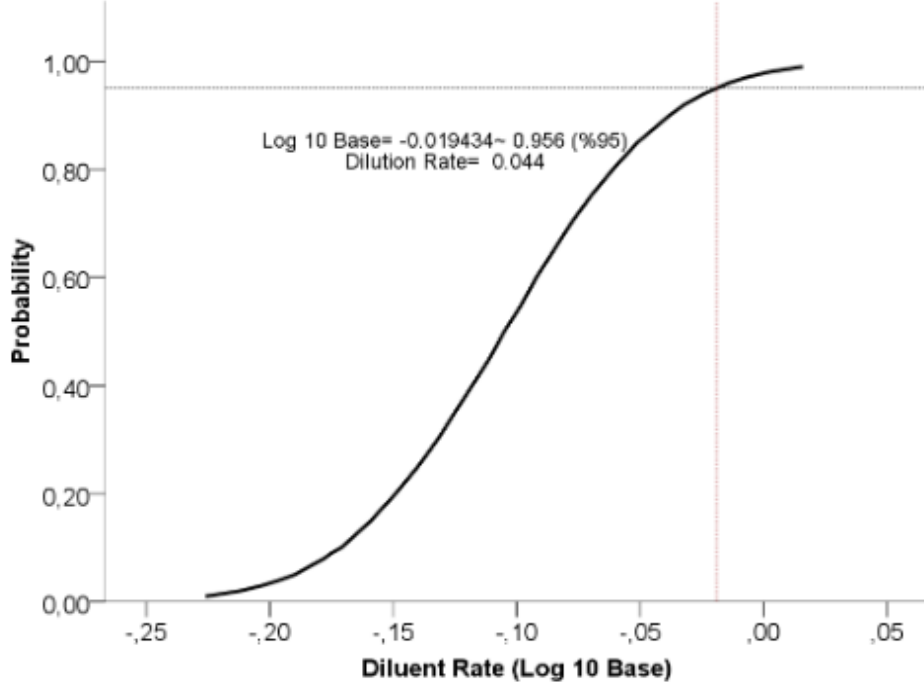
4.3. Probit Analizi

Pozitif kontrolün seri sulandırımı yapılarak her sulandırım 3 kez olmak üzere kantitatif rt-PCR ile çalışılmıştır. Sulandırım oranları ve PCR sonuçları Tablo 9’ da gösterilmektedir.

Tablo 9. Probit analizi öncesi dilüsyon oranları, kist sayısı ve rt-PCR sonuçları

Dilüsyon	1	1/10	1/100	1/1.000	1/100.000	1/1.000.000
Sonuç (Kopya/ μ L)						
1. Çalışma	Pozitif (177,44)	Pozitif (13,1)	Pozitif (6)	Negatif	Negatif	Negatif
2. Çalışma	Pozitif (160,36)	Pozitif (15,65)	Pozitif (0,9)	Pozitif (0,7)	Negatif	Negatif
3. Çalışma	Pozitif (165,68)	Pozitif (34,9)	Pozitif (5,98)	Pozitif (33,88)	Negatif	Negatif

Probit analiz ile testin laboratuvar koşullarında analitik duyarlılığı %95 güven aralığında 7,4 kopya/ μ L olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Probit Analizi Grafiği

5. TARTIŞMA

Kriptosporidiyoz, *Cryptosporidium* türlerinin etken olduğu bir protozoon enfeksiyonudur. İnsanlarda en sık enfeksiyona neden olan türleri, sadece insanların konak olduğu *C. hominis* ile pek çok memeli türünü de enfekte edebilen *C. parvum*'dur (15).

Enfeksiyon en çok çocukları etkilemektedir. Bağışıklık sistemi normal yetişkinlerde çoğu kez kendini sınırlayan diyareye neden olur. Özellikle küçük çocuklarda ise ishal persistan hale gelebilir, hatta malnütrisyonla sonlanabilir. AIDS, solid organ veya kemik iliği transplantasyonu ya da kemo/immünoterapi nedeniyle immün yetmezliği olan kişilerde kronik, ağır seyirli diyareye neden olabilir (15).

Parazitin enfektif ookistlerini, kontamine gıda ve su kaynaklarından, çeşitli klinik örneklerden veya dışkıdan izole etmek ve tanımlamak amacıyla geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Boyama, serolojik teknikler ve moleküler tabanlı PCR gibi teknikler bunların başında gelmektedir. Bu tekniklerin her biri dezavantaj ve avantajlara sahiptir (33,89). Real-time PCR; duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, hızlı sonuç vermesi, kantitatif olarak hedef patojenin gen bölgesinin belirlenmesi, kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması, mutasyon analizlerinin belirlenmesi gibi çeşitli özellikleri ile konvansiyonel PCR, nested PCR ve antijen-antikor tabanlı tekniklere göre üstün ve öne çıkan yöntemdir (114,115).

Gelişmiş ülkelerde ishal vakalarının %7'sinden, gelişmekte olan ülkelerde %12'sinden *Cryptosporidium* parazitlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (119). Kriptosporidiyoz olguları gelişmiş ülkelerde 1-4 yaş çocuklarda daha fazla görülmektedir. Hijyen eksikliğine bağlı daha kolay bulaşın olması ve immün sistemin yeterince gelişmemesi bu yaş grubunda prevalansı artırmaktadır (49).

2014 yılında Mısır'da yapılan bir çalışmada 250 çocuğun dışkı örneği incelenmeye alınmıştır ve 56 örnekte (%22,4) oranında PCR pozitifliği saptanmıştır (120).

2014 yılında Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada, ishal şikâyeti olan 175 çocuğun dışkı örneği incelendiğinde 7'sinde (%4) Kinyoun boyama; 48'inde (%27,4) ELISA yöntemi ile pozitiflik bulunmuştur (121).

Türkiye'de 1998-2011 yıllarında Mersin, Malatya, Afyon ve Van'da mikroskopi yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* sıklığı %2,2-%7,1 bulunmuştur (25,77, 78,26,121).

2002 yılında İstanbul'da yapılan çalışmada 0-3 yaş grubu ishallerli çocuklarda mikroskopi ile hiç parazit görülmezken antijen testi ile %15,3 oranında *C. parvum* saptanmıştır (122).

Tamer ve ark.'nın 2008 yılında malignitesi ve eşlik eden diyaresi olan çocuklara ait gaita örnekleri ile yaptıkları çalışmada Kinyoun boyama ve ELISA yöntemleri karşılaştırılmıştır. ELISA ile çalışmaya alınan 89 hastanın 11'i (%12,35), Kinyoun boyama ile 7'si (%7,86) kriptosporidiyoz tanısı almıştır. Malignitesi olan çocukların kriptosporidiyoz yönünden değerlendirilmesinde aside dirençli boyama teknikleri yanında özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek ELISA testinin kullanılmasının gerekli olduğu kanısına varıldığı belirtilmiştir (123).

Sungur ve ark.'nın 2008'de 45 örnekte yaptıkları çalışmada karbol fuksin boyama ile %8,9; nested PCR ile %20 pozitiflik saptanmıştır. Nested PCR yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, karbol fuksin boyama yönteminin özgüllüğü %100, ancak duyarlılığı %44 bulunmuştur (101).

2009 yılında Kinyoun boyama ve konvansiyonel PCR ile yapılan çalışmada, 162 diyaresi olan çocuğa ait gaita örneğinin 18'inde *Cryptosporidium* ookisti görülmüştür. Ookist görülen örneklerin 15'inde ve mikroskopinin negatif olduğu 6 örnekte PCR ile pozitiflik saptanmıştır (63).

2014 yılında immünsüpresif pediatrik ve erişkin grubunda yapılan çalışmada modifiye EZN boyama ile %6,4 ve ELISA yöntemiyle %7,4 *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptanmıştır (108).

İntestinal parazitlerin tanısında yöntemlerin karşılaştırıldığı 2017'de Adana'da yapılan bir çalışmada, gerçek zamanlı PCR yönteminin ELISA ve mikroskopiye göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. *Cryptosporidium* spp. modifiye aside dirençli boyamada %5,1; gerçek zamanlı PCR ile %10,3 oranında pozitif bulunmuştur (124).

2021 yılında solid tümörlü hastalarda yapılan bir çalışmada kriptosporidiyoz tanısında Ziehl-Neelsen, ELISA ve gerçek zamanlı PCR yöntemi karşılaştırılmıştır. Yazarlar kanser hastalarında kriptosporidiyoz tanısının riskli olduğu, doğru ve güvenilir tanı için en az iki yöntemin birlikte kullanılması gerektiği sonucuna varmıştır (125).

Çalışmamız kapsamında parazitolojik inceleme için laboratuvarımıza gönderilen 110 dışkı örneğinde mikroskopik ile incelemede 17 (%15,5) pozitif, gerçek zamanlı PCR yöntemi

ile 5 (%4,5) örnekte pozitif sonuç saptanmıştır. Mikroskopi ile *Cryptosporidium* ookisti görülen 17 örneğin ikisi PCR ile pozitif sonuç vermiştir. Mikroskopisi negatif 3 örnekte PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. PCR referans alınarak yapılan istatistiksel analizde, mikroskopinin duyarlılığı %40, özgüllüğü 85,7 olarak hesaplanmıştır. Pozitif ve negatif tahmini değerleri sırasıyla %11,7 ve %96,8 bulunmuştur. Çalışmada, mikroskopi ile alınan yüksek yalancı pozitif sonucun deneyimsizlik nedeniyle yanlış değerlendirme ve *C. parvum* dışında gaitada bulunabilecek diğer *Cryptosporidium* türlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gaita örneğinde PCR negatif, mikroskopi pozitif sonuç veren 15 hastanın kayıtları incelendiğinde; bir hastada HIV enfeksiyonu, bir hastada solid organ kanseri bulunduğu, diğerlerinin immün yetmezlik ile ilişkilendirilemeyecek kliniği bulunan erişkin olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Çalışmamızda kullandığımız *C. parvum* saptamaya yönelik ticari kantitatif gerçek zamanlı PCR yönteminin alt saptama limiti Probit analizi ile 7,4 kopya / μ L saptanmıştır. Test kitinin kullanım kılavuzunda analitik duyarlılık <100 kopya olarak belirtilmiştir.

Kriptosporidiyoz tanısında mikroskopi ucuz ve kolay uygulanabilir yöntem olmasına karşın düşük duyarlılığa ve düşük özgüllüğe sahip bir testtir. Bu nedenle mikroskopi yerine duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek PCR gibi diğer testlerin tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kriptosporidiyoz özellikle çocukları etkileyerek kronik ve malnütrisyonu neden olan bir hastalıktır. Kalıtsal veya edinsel immün yetmezliği olan kişilerde de ishal ciddi seyretmekte ve kronikleşmektedir.

Kriptosporidiyoz tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olmasına karşın ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmakta olan Kinyoun gibi aside dirençli boyama yöntemleri ile boyanan gaita ookist varlığı açısından mikroskopik olarak incelenmektedir.

Çalışmada *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılan 'çöktürerek yoğunlaştırma + mikroskopik inceleme' ile yeni ve daha duyarlı-özgül olan moleküler yöntemin (gerçek zamanlı PCR) karşılaştırılması ve moleküler yöntemin rutin kullanıma uygunluğu değerlendirilmiştir.

Konsantre edilmiş gaita örneklerinde yapılan Mikroskopik incelemede 17 örnekte *Cryptosporidium parvum* ookisti görülmüştür. Gerçek zamanlı PCR ile ookist görülen örneklerin ikisinde pozitif sonuç alınmıştır. PCR ile ayrıca ookist görülmeyen üç örnekte pozitif sonuç alınmıştır. PCR referans alınarak yapılan karşılaştırmada mikroskopinin düşük özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür.

Kriptosporidiyoz tanısında mikroskopi ucuz ve kolay uygulanabilir yöntem olmasına karşın düşük duyarlılığa ve düşük özgüllüğe sahip bir testtir. Bu nedenle *Cryptosporidium* türlerinin saptanmasında duyarlılık ve özgüllüğü yüksek alternatif testlerin kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Fayer R., Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC press, 2007: 80
2. Xiao L. Molecular Epidemiology of Cryptosporidiosis: An Update. *Exp. Parasitol.* 2010; 124:80-89.
3. Tzipori S., Ward H. cryptosporidiosis: biology, Pathogenesis and Disease, *Microbes and Infection*, 2002; 4:1047-1058.
4. Divers T., Peek S. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. Saunders. Elsevier, 2008.
5. De Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L-M., Abbasi H., Peters J.E., A Review of The Importance of Cryptosporidiosis in Farm Animals. *International Journal for Parasitology*, 1999; 29(8):1269-1287.
6. Hamnes I.S., Gjerde B., Robertson L. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Dairy Calves in Three Areas of Norway. *Veterinary Parasitology*, 2006; 140(3-4):204-216
7. Rommel M., Eckert J., Kutzer E., Körting W., Schnieder T. Founded by Josef Boch and Rudolf Supperer. *Veterinary Medical Parasitology*, 2000; 144-147.
8. Bopp S. B. Calves and Cryptosporidiosis. *Bovine Veterinaria* 2003; 4-8.
9. Betancourt W. Q., Rose J. B. Drinking Water Treatment Processes for Removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, 2004; 126(1-2):219-234.
10. Olson, M. E., Handley O.R.M., Ralston B.J., McAllister T.A., Thompson R.C.A., Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Cattle. *Trends in Parasitology*, 2004; 20(4):185-191
11. Dupont H. L., Chappel C. L., Sterling C. R., Okhuysen P. C., Rose J. B., Jakubowski W. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *N. Eng. J. Med.*, 1995; 332:855-859.
12. Chen X., Keithly J. S., Paya C. V., La Russo N. F. Cryptosporidiosis, *The New England Journal of Medicine*. 2002; 346(22):1723-1731.
13. Griffiths K. J., Balakrishnan R., Widmer G., Tzipori S. Paromomycin and Geneticin Inhibit Intracellular *Cryptosporidium parvum* without Trafficking Through the Host Cell Cytoplasm: Implications for Drug Delivery. *Infection and Immunity*. 1998; 3874-3883.

14. Şimşir H. *Cryptosporidium parvum* Genotiplerinin İshalli Çocuklarda Çeşitli Yöntemlerle Tanımlanması. Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006.
15. <https://emedicine.medscape.com/article/215490>
(Erişim Tarihi: 15.11.2022)
16. Chalmers R. M., Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the Application of Advances in Detection and Diagnosis. Trends in Parasitology, 2013; 29(5):237- 251.
17. Ignatius R., Klemm T., Zander S., Gahutu J.B., Kimmig P., Mockenhaupt F.P., Regnath T., Highly Specific Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in Human Stool Samples by Undemanding and Inexpensive Phase Contrast Microscopy. Parasitology Research, 2016; 115(3):1229-1234.
18. Tyzzer E. E. A Sporozoan Found in the Peptic Glands of the Common Mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1907; 5:12–13.
19. Tyzzer E. E. An Extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the Gastric Glands of the Common Mouse. J. Med. Res. 1910; 23:487-510.
20. Tyzzer E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common Mouse. Archives fur Protistenkunde, 26 (1912): 394-412.
21. Chalmers R.M. and Katzer F. Looking For *Cryptosporidium*: The application of advances in detection and diagnosis, Trends in Parasitology, May 2013 Vol.29 No.5 pp.243
22. White A.C. Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* Species). In: Bennett, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book, 9th Edition. Elsevier; 20190808. Retrieved from vbk://978032355027720190808.
23. Constable P., Hinchcliff K., Done S., Gruenberg W. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. Elsevier Health Sciences, 2016.
24. Ryan U. M., feng Y., fayer R., Xiao L. Taxonomy and Molecular Epidemiology of *Crptosporidium Parvum* and *Giardia* – a 50 Year Perspective (1971-2021). International Journal of Parasitology 2021; 51(13-14):1099-1119.
25. Hazer Y. Afyonkarahisar Bölgesindeki Risk Gruplarında *Cryptosporidium parvum* Araştırılması. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Afyon, 2007.

26. Çiçek M. 0-15 Yaş Grubu İshalli Çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve Diğer Bağırsak Parazitlerinin Görülme Sıklığı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Van, 2002.
27. Jenkins M. B., Eaglesham B.S.,Anthony L.C.,Kachlany S.C.,Bowman D.D.,Ghiorse W.C., Significance of Wall Structure, Macromolecular Composition and Surface Polymers to The Survival and Transport of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. Appl. Environ. Microbiol., 2010; 76(6):1926-1934.
28. Armon R., Gold D., Zuckerman U., Kurzbaum E. Environmental Aspects of *Cryptosporidium*. Journal of Veterinary Medicine and Research 2016; 3(2): 1048.
29. Bones A. J., Jossé L., and More C., Miller C. N., Michaelis M., Anastasios T. D. Past and future trends of *Cryptosporidium in vitro* research. Experimental Parasitology 2019; 196: 28-37.
30. Constable P. Cryptosporidiosis. The Merck Veterinary Manual. 2014; 9th ed.
31. Harris J. R., Petry F. *Cryptosporidium parvum*: Structural Components of The Oocyst Wall. J. Parasitol. 1999; 85:839–849.
32. Starling C. R., Arrowood M. J. Cryptosporidia, In: Parasitic Protozoa, Academic Press. 1993; 6(65):159-224.
33. Sears C. L., Kirckpatrick B. D. In: Cryptosporidiosis and Isosporiosis, Principles and Practice of Clinical Parasitology. John Wiley & Sons Ltd. Pres., 2001; 139-164.
34. Reduker D. W., Speer C. A., Blixt J. A. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* Oocysts and Excysting Sporozoites as Revealed by High Resolution Scanning Electron Microscopy. J. Protozool. 1985; 32:708–711.
35. Wetzel D. M., Schmidt J., Kühnenschmidt M. S., Dubey J. P., Sibley L. D. Gliding Motility Leads to Active Cellular Invasion by *Cryptosporidium parvum* Sporozoites. Infect. Immun., 2005; 73:5379–5387.
36. Hunter P. R., Hughes S., Woodhouse S., Syed Q., Verlander N. Q., Chalmers R. M., Morgan K., Nichols G., Beeching N., Osborn K. (2004). Sporadic Cryptosporidiosis Case-Control Study With Genotyping. Emerg. Infect. Dis., 2004; 10:1241–1249.
37. Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K., Matsui T. Electron Microscopic Observation of The Invasion Process of *Cryptosporidium parvum* in Severe Combined Immunodeficiency Mice. J. Parasitol. 2005; 91:1034–1039.
38. Unat E. K, Yücel A., Atlaş K., Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, 1995; 5. Baskı 595-600.

39. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji, Es-Form Ofset Ltd. Şti. 2002; 94-96.
40. Ok Ü. Z., Üner A., Korkmaz M. Cryptosporidiosis. İmmun Yetmezlikte Önemi Artan Hastalıklar. Türkiye Parazitoloji Dergisi 1995; 12:23-42
41. Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R. Cryptosporidiosis of Man and Animals. CRC Press, USA, 1990; 199.
42. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji, Es-Form Ofset Ltd. Şti, Kasım, 2002; 94-96.
43. Yetkin M. A. İmmun Yetmezlikli Hastalarda Enterik Patojen Olarak *Cryptosporidium* Ookistlerinin Araştırılması, Gazi Üniv. Tıp Fak. Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 1998.
44. Tamer Sönmez G., Gülenç S., Dışkı da *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması, Türkiye Parazitoloji dergisi, 2008; 32 (3):198-201
45. Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitapevi, 2002; 2:1919-1920.
46. Ghazy A. A., Abdel-Shafy S, M. Shaapan R. M. Cryptosporidiosis in Animals and Man: 1. Taxonomic Classification, Life Cycle, Epidemiology and Zoonotic Importance. Asian Journal of Epidemiology 2015; 8 (3): 48-63.
47. Özer E. Evcil Hayvanlarda Cryptosporidiosis. Ankara Üniv. Veteriner Fak. Der., 1990; 38(1):20-31.
48. Erdoğan D. D. İnsanlarda Cryptosporidiosis Tanısında Dışkı Örneklerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Yeri. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Uzmanlık Tezi, İzmir, 2003.
49. Current W. L., Bick P. H. Immunology of *Cryptosporidium* spp. Pathol Immunopathol Res., 1989; 8:141-160
50. Current W. L., Reese N. C. A Comparison of Endogenous Development of Three Isolates of *Cryptosporidium* in Suckling Mice. J. Protozool., 1986; 33:98-108.
51. Köktürk O. Parazit Hastalıkları Grup Başk., Toraks Derneği Akciğer Hastalıkları Tanı ve Tedavi Rehberi, Toraks Derg., 2002; Cilt 3, Ek 5.
52. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji, Esnaf Ofset Matbacılık, Kasım, 1998; 78- 80.
53. Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitapevi, 2002; Cilt 2, 1919-1920.
54. Yalçın S. Erzincan ili farklı su kaynaklarından *Cryptosporidium parvum*' un moleküler yöntemlerle tespit edilmesi. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, Erzincan, 2017.

55. Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (1990). *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Pres, USA, 199.
56. Fayer R., Morgan U., Upton S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, Detection and Identification. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30:1305-1322.
57. Terzi G. Gıda Kaynaklı Protozoon Enfeksiyonların İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 2005; 16(2):47-55.
58. Sağlam T., Denizli İl Merkezi'nde Tarımsal Sulama ve İçme Suyu Kaynaklarında Bulunan Bazı Tek Hücreli (Protozoa) Parazitler Üzerine Bir Araştırma. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli, 2018.
59. Nagy B., Pohlenz J. Bovine Cryptosporidiosis Diagnosis and Therapy. *Tierarztl. Prax.*, 1982; 10:163–172.
60. Şenel Y., *Cryptosporidium parvum* ile deneysel enfekte sıçanlar da oral heparin uygulamasının terapötik etkinliğinin lasalosid sodyum ve halofuginon laktat ile karşılaştırmalı değerlendirmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, 2021
61. Leav B. A., Mackay M., Ward H. D. *Cryptosporidium* Species: New Insights and Old Challenges. *Clin Infect Dis*, 2003; 36(7):902-8.
62. Lancet, Guerrant R.L., Kosek M, Alcantara C, Lima AAM, Cryptosporidiosis: an update (2001); 1: 262-269
63. Usluca S. İshalli Dışkılarda *Microsporidium* spp. ve *Cryptosporidium* spp.'nin Saptanması, PCR Yöntemi ile Tür Tayininin Yapılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora, İzmir, 2009.
64. Arslan A.H., *Cryptosporidium parvum* Ookistlerinin Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması ile İncelenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2020.
65. Markell, E., Voge M., John D., Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia, PA *Medical Parasitology*, 1992.
66. Current W.L, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991; p. 325-358.
67. Kar S. *Cryptosporidium parvum*' un hücre kültüründe üretilmesi ve üremenin farklı yöntemlerle belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Ankara, 2007.

68. Farthing M. J. Clinical Aspects of Human Cryptosporidiosis. *Contrib. Microbiol.*, 2000; 6:50-74.
69. Dupont C., Bounoux M. E., Turner L., Rouverix E., Dorra M. Microbiological Findings About Pulmonary Cryptosporidiosis in Two AIDS Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996; 34(1):227-229.
70. Sears C. L., Kirckpatrick B. D. In: *Cryptosporidiosis and Isosporiosis, Principles and Practise of Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons Ltd. Pres. 2001, pp: 139-164.
71. Fahey T. M. D. Cryptosporidiosis. *Infectionus Disease Update*, 2003; 10(2):75-80
72. Lisam Schlein Mary Vallanjon: [Avaible from:]
https://www.who.int/water_sanitation_health/takingcharge.html
73. Vermeulen L. C., Benders J., Medema G., Hofstra N., Global *Cryptosporidium* Loads From Livestock Manure. *Environmental Science & Technology*, 2017; 51(15):8663-8671.
74. Bonilla L. C., Guanipa N., Cano G., Raleigh X., Quijada L. Cryptosporidiosis Among Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome in Zulia State, Venezuela, *J Trop Med Hyg.*, 1992; 47(5):582-586.
75. Spano F., Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: The Many Secrets of a Small Genome, *Int J Parasitol.*, 2000; 30:553-565.
76. Özcel M. A., Özbel Y., Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. *Türkiye Parazitol. Dern. Yayınları*, 2007, Yayın No: 22, İzmir
77. Karaman Ü, Daldal N, Özer A, Engiyurt Ö, Ertürk Ö. Incidence of *Cryptosporidium* spp. in the human population of Malatya in Turkey. *Acta Medica Mediterranea*, 2015, 31: 263-269.
78. Doğan N., Akgün Y. İshalli Olgularda *Cryptosporidium* Ookistlerinin Araştırılması. *T. Parazitol. Derg.*, 1998; 22(3):243-246
79. King B. C., Monis P. T. Critical Processes Affecting *Cryptosporidium* Oocyst Survival in The Environment, *Parasitology Rev.* (2007). 134: 309-23,
80. Babaç D. *Crptosporidium parvum* ile deneysel enfekte buzağılarda serum demir, bakır ve çinko konsantrasyonlarının incelenmesi, Adanan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın,2014.
81. Shahiduzzaman M., Dauschies A. Therapy and Prevention of Cryptosporidiosis in Animals. *Vet. Parasitol.*, 2012; 188:203-214.

82. Checkley W., White Jr A.C., Jaganath D., Arrowood M. J., Chalmers R. M., Chen X. M., Fayer R., Griffiths J. K., Guerrant R. L., Hedstrom L., Huston C. D., Kotloff K. L., Kang G., Mead J. R., Miller M., Petri Jr W. A., Priest J. W., Roos D. S., Striepen B., Thompson R. C. A., Ward H. D., Van Voorhis W. A., Xiao L., Zhu G., Houpt E. R. A review of The Global Burden, Novel Diagnostics, Therapeutics and Vaccine Targets for *Cryptosporidium*. *Lancet. Infect. Dis.*, 2015; 15:85-94.
83. Sparks H., Nair G., Castellanos-Gonzalez A., White A. C. J. Treatment of *Cryptosporidium*: What We Know, Gaps, and The Way Forward. *Curr. Trop. Med. Reports*, 2015; 2:181-187.
84. Rossignol J., Kabıl S.M., El-Gohary Y., Younis A.M. Effect of Nitazoxanide in Diarrhea and Enteritis Caused by *Cryptosporidium Species*. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006; 4:320-324.
85. Reinoso R, Becares E, Smith H.V. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology* 2007; 104(4):980-986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03620.x>
86. Clark D. P. New Insights Into Human Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999; 12(4):554-563
87. Priest JW, Kwon JP, Moss DM, Roberts JM, Arrowood MJ, Dworkin MS, Juranek DD, Lammie PJ. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 1385-1392.
88. Erman N., Beyazıt A., Öz İ. İzmir Yöresinde Kuzu ve Oğlaklarda Cryptosporidiosis'in Yaygınlığı. *Bornova Vet. Kontr. ve Araşt. Ens. Derg.*, 2000; 25(39):33-38.
89. Gasser R. B., O'Donogue O. Isolation, Propagation and Characterisation of *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.*, 1999; 29:1379-1413.
90. Mandel G. L. Bennett J., Dolin R. Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, and other species). In: White AC, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 3215-3228.
91. Aynur Erdem Z. *Trichomonas vaginalis* ve *Cryptosporidium parvum* parazitlerinde bulunan sistein proteaz genlerinin klonlanması ve rekombinant olarak üretilmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Aydın,2020.
92. Casemore D. P., Laboratory Methods For Diagnosing Cryptosporidiosis. *J. Clin.Pathol.*, 1991; 44:445-451.

93. MacPherson D. W., McQueen R. Cryptosporidiosis Multiattribute Evaluation of Six Diagnosis Methods. *J Clin Microbiol*, 1993; 31(2):198-202.
94. Garcia L.S., Bruckner D. A. *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM Pres, Washington DC, Third edition, 1997 :59-63
95. Mtombo M. M. A., Nash A. S., Blewett D. A., Wright S. Comparison of Staining and Concentration Techniques For Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Cat Faecal Specimens. *Vet. Parasitol.*, 1992; 45:49-57.
96. Rekha M., Puttalakshamma G.C., D'Souza P.E. Comparison of different diagnostic techniques for the detection of cryptosporidiosis in bovines. *Veterinary World* 2016; 9: 211-215.
97. Crandall I. Sequential Haematoxylin/Acid-Fast Stain For Routine O&P Including *Cryptosporidium* & *Cyclospora*. MSH/TML Shared Microbiol. Serv. Policy & Proc. Manual. 2000, p. 147.
98. Reisner B.S., Spring J. Evaluation of a Combined Acid-Fast-Trichrome Stain for Detection of *Microsporidia* and *Cryptosporidium parvum*", *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124:777-779.
99. Kehl K. S. C., Cicirello H., Havens P. L. Comparison of Four Different Methods for Detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33(2):416-418.
100. Uyar Y., Özkan A. T. Amebiyazis, Giardiyazis ve Kriptosporidiyazis Tanısında Antijen Tarama Yöntemlerinin Yeri. *Türkiye Parazitol. Derg.*, 2009; 33:140-150.
101. Sungur T., Kar S., Güven S., Aktaş M., Karaer Z., Vatansever Z., Detection of *Cryptosporidium spp.* in Feces With Nested PCR and Carbol Fuchsin Staining Method. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, 2008; 32(4):305-308.
102. Cole D. J., Snowden K., Cohen N.D., Smith R., Detection of *Cryptosporidium parvum* in Horses: Thresholds of Acid-Fast Stain, Immunofluorescence Assay, and Flow Cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999; 37(2):457-460.
103. www.duzen.com.tr/artfiles/parazitoloji Erişim Tarihi: 10.09.2008
104. Arslan Ö., Ekinci A. İ. Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium parvum* Subtiplerinin Belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012; 18.
105. Priest J. W., Kwon J. P., Moss D.M., Roberts J.M., Arrowood M.J., Dworkin M.S., Juranek D.D., Lammie P.J., Detection by Enzyme Immunoassay of Serum Immunoglobulin G Antibodies That Recognize Specific *Cryptosporidium parvum* Antigens. *J Clin Microbiol.*, 1999; 37:1385-1392.

106. 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.
107. Rochelle P. A., Fergusson D. M., Handojo T. J., De Leon R., Stewart M. H., Wolfe R. L. An Assay Combining Cell Culture With Reverse Transcriptase PCR to Detect and Determine the Infectivity of Waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997; 63(5):2029-2037.
108. Alabdeen A. Z., İshalli Hastalarda *Cryptosporidium spp.*'in Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi, ELISA ve İmmunokromatografik Yöntem ile Araştırılması. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep, 2014.
109. Boxell A., Hijjawi N., Monis P., Ryan U. Comparison of Various Staining Methods for the Detection of *Cryptosporidium* in Cell-Free Culture. *Experimental Parasitology*, 2008; 120(1):67-72.
110. Yılmaz A. İshalli İmmünesupresif ve immünkompetan olgularda mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerle *Cryptosporidium spp.*'nin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Erzurum, 2015.
111. Thompson, R.C.A., Armson, A., Ryan, U.M., Hijjawi N. *Cryptosporidium*: In vitro Cultivation and Development of *Cryptosporidium* in Cell Culture, from molecules to disease. Amsterdam: Elsevier, 2003, pp: 233-253.
112. Jex A. R., Smith H. V., Monis P. T., Campbell B. E., Gasser R. B. *Cryptosporidium* Biotechnological Advances in the Detection, Diagnosis and Analysis of Genetic Variation. *Biotechnol Adv.* 2008; 26(4):304-17.
113. Wu Z., Nagano I., Boonmars T., Takahashi Y. Further Evidence That Genotype I and Genotype II of *Cryptosporidium parvum* Are Distinct. *Trop Med Health*, 2004; 32(1):5-14.
114. Jothikumar N., da Silva A. J., Moura I., Qvarnstrom Y., Hill V.R. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by Dual TaqMan assays. *J Med Microbiol.*, 2008; 57(9):1099-105.
115. Calderaro A., Montecchini S., Gorrini C., Dettori G., Chezzi C. Similar Diagnostic Performances of Antigen Detection and Nucleic acid Detection of *Cryptosporidium spp.* in a Low-Prevalence Setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70(1):72-7.

116. Fayer R., Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second Edition. CRC press, New York, London. 2008.p.15
117. Mojarad E. N., Keshavarz A., Taghipour N., Haghighi A., Kazemi B., Athari A (2011). Genotyping of *Cryptosporidium spp.* in clinical samples: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C2 gene. *Gastroenterol Hepatol BedBench*, 2011; 4(1)29-33.
118. Kato S., Lindergard G., Mohammed H.O. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. *Veterinary Parasitology* 2003; 111 (2-3): 153-159.
119. Koturoglu G., Bayram S., Kurugöl Z., Turgay N., Mutluba G. F. Akut İshalli Çocuklarda *Cryptosporidium* Sıklığı ve Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi*, 2004; 13:1-19.
120. Fathy M. M., Abdelrazek N. M., Hassan F. A., El-Badry A. A. Molecular Copro-Prevalence of *Cryptosporidium* in Egyptian Children and Evaluation of Three Diagnostic Methods. *Indian Pediatrics*, 2014; 51:727-729.
121. Bera P., Das S., Saha R., Ramachandran V. G., Shah D. *Cryptosporidium* in Children With Diarrhea: a Hospital-Based Study. *Indian Pediatrics*, 2014; 51:906-908.
122. Arslan, L. İshalli Olgularda Enterik Patojen Dağılımı ve Bu Dağılımda *Cryptosporidium parvum* ve *Cyclospora cayatanensis*'in Yeri., Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2002.
123. Sönmez Tamer G., Balıkcı E., Arbay A. Lösemi ve Lenfoma Tanısı Alan Çocuklarda Cryptosporidiosis Prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008; 32(3): 192-197.
124. Koltas, I.S., Elgun, G., Eroglu, F., Demirkazık, M. The importance of Real-Time Polymerase Chain Reaction method in diagnosis of intestinal parasites in cases with diarrhea. *Tropical Biomedicine* 2017; 34(4): 895-902.
125. Karabey M., et al. *Cryptosporidium spp.* during chemotherapy: a cross-sectional study of 94 patients with malignant solid tumor. *Ann Saudi Med* 2021; 41(5); 293-298. DOI: 10.5144/0256- 4947.2021.293

8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

8.1. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>C. parvum</i> ookist duvar yapısı için önerilen model	6
Şekil 2. <i>C. parvum</i> 'un yaşam siklusu	7
Şekil 3. <i>C. Parvum</i> 'un bulaşma yolları ve epidemiyolojisinde rol alan faktörler	11
Şekil 4. Fekal DNA'nın spin-kolon yöntemi ile saflaştırılması (kit kullanım kılavuzundan) .	20
Şekil 5. Probit Analizi Grafiği	27

8.2. RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. Çöktürme ile konsantrasyondan işleminden sonra <i>Cryptosporidium parvum</i> ookistleri.....	24
Resim 2. Pozitif sonuç veren örnekte gerçek zamanlı PCR cihazı ekran görüntüsü	25

9. TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. <i>Cryptosporidium</i> türleri, araştırıcı-tarih ve yerleştiği konaklar.....	4
Tablo 2. <i>Cryptosporidium</i> cinsinin taksonomideki yeri	5
Tablo 3. Parazit ookistlerin farklı boyama yöntemlerinde mikroskopi görünümü.....	14
Tablo 4. PCR karışımının hazırlanması.....	22
Tablo 5. Isı döngü cihazı sıcaklık ve okuma profili	22
Tablo 6. Çalışma grubunun demografik özellikleri.....	24
Tablo 7. PCR testi ve mikroskopi sonuçları ile hastaların demografik özellikleri ve kliniği..	25
Tablo 8. Mikroskopi ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	26
Tablo 9. Probit analizi öncesi dilüsyon oranları, kist sayısı ve rt-PCR sonuçları	26

10. EKLER DİZİNİ

Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu	45
-------------------------------------	----



11. EKLER

Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu



12. ÖZGEÇMİŞ

