

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İMMÜNSUPRESİF HASTALARDA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
SIKLIĞININ ÇEŞİTLİ TANI YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Duygu BEDER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA 2023

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İMMÜNSUPRESİF HASTALARDA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
SIKLIĞININ ÇEŞİTLİ TANI YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Duygu BEDER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 221518022 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2023

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e

Uzmanlık eğitimim sürecinde değerli deneyimlerini, bilgilerini ve emeğini esirgemeyen, kendileriyle çalışmaktan kıvanç duyduğum değerli tez danışmanım Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT'e

Deneyimlerinden ve bilgilerinden her daim faydalandığım Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Prof. Dr. Metin DOĞAN ve Dr. Öğretim Üyesi Selin UĞRAKLI hocalarıma,

Tezimi 221518022 no'lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Paylaşımlarıyla her zaman bana destek olan asistan arkadaşlarıma, mikrobiyoloji laboratuvarımızın tüm teknisyen ve personeline en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Hayatımda olmasından sonsuz mutluluk duyduğum ve her konuda desteğini ve emeğini esirgemeyen sevgili eşim ve canım oğluma;

Her zaman sevgi ve destekleriyle yanımda olan annem, babam ve kardeşime minnet ve şükranlarımı sunarım.

Duygu BEDER

2023

ÖZET

İMMÜNSUPRESİF HASTALARDA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. SIKLIĞININ ÇEŞİTLİ TANI YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

DR. DUYGU BEDER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA 2023

Amaç: Bu çalışmada ishal şikayeti ile başvuran immünsupresif hastalarda *Cryptosporidium* spp. sıklığının mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve kullanılan yöntemlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İmmünsupresif ishalleri hastalardan Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 90 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. *Cryptosporidium* spp. tespiti amacıyla dışkı örneklerine modifiye asit fast boyama, PZR, ELISA testi uygulanmıştır. Pozitif örneklerin de dahil olduğu 51 örnekte DFA yöntemiyle *Cryptosporidium* spp. araştırılmıştır. Bu yöntemlerden herhangi biriyle pozitif saptanan örneklerde ayrıca immünokromatografik kart test çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya alınan 90 örneğin 44 (%48,8)'ü erkek, 46 (%51,2)'si kadın hastalara aittir. Hastaların yaşları 0 ile 81 yaş aralığında olup, yaş ortalaması 37,8 (standart sapma: $\pm 27,5$) olarak bulunmuştur. Çalışmada çocuk hastalara ait 31 (%34,4) numune bulunmaktadır ve bu hastaların yaş ortalamaları 5,3 (standart sapma: $\pm 4,34$) olarak tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemlerin hiçbirinde hastaların pozitiflik durumu ile yaş arasında ve pozitiflik durumu ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Çalışılan dışkı örneklerinde modifiye asit fast yöntemiyle 5 (%5,6), PZR ile 2 (%2,2), ELISA yöntemiyle 1 (%1,1) örnekte pozitiflik tespit edilmiştir. DFA yöntemi ile çalışılan örneklerin 6'sı pozitif bulunmuştur. Bu yöntemlerden herhangi biri ile pozitif bulunan 7 örnek immünokromatografik kart test ile araştırılmış ve 4 örnekte *Cryptosporidium* spp. pozitif saptanmıştır.

Sonuç: Çalışma immünsupresif ishalleri hastalarda *Cryptosporidium* spp.'nin önemli bir etken olduğunu ortaya koymaktadır. DFA yöntemi altın standart yöntem olarak baz alındığında modifiye asit fast yöntemi yüksek duyarlılık ve özgüllükle, rutin tanıda kullanılabilecek bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca yoğun iş akışı olan laboratuvarlarda immünokromatografik tanı testlerinin, pratik kullanımı ve hızlı sonuç alınması nedeniyle faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*, İmmünsupresif, DFA, İshal

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE FREQUENCY OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP IN IMMUNOSUPPRESSIVE PATIENTS BY VARIOUS DIAGNOSTIC METHODS

DR.DUYGU BEDER

THESIS OF MEDICAL SPECIALTY

KONYA 2023

Objective: In this study, it was aimed to investigate the frequency of *Cryptosporidium* spp. in immunosuppressive patients with diarrhea by microscopic, serological and molecular methods and to evaluate the methods used comparatively.

Materials and Methods: Ninety stool samples sent to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Hospital Microbiology Laboratory from immunosuppressive patients with diarrhea were included in the study. For the detection of *Cryptosporidium* spp., modified acid fast staining, PCR and ELISA test was applied to stool samples. *Cryptosporidium* spp was investigated by DFA method in 51 samples including positive samples. Immunochromatographic card test was also studied in cases that were found to be positive by any of these methods.

Results: Of the 90 samples included in the study, 44 (48,8%) were male and 46 (51,2%) were female patients. The ages of the patients ranged from 0 to 81 years, with a mean age of 37,8 (standard deviation: $\pm 27,5$). There were 31 (34,4%) samples of pediatric patients in the study, and the mean age of these patients was 5.3 (standard deviation: ± 4.34). No statistically significant difference was found between the positivity status of the patients and their age, and between the positivity status and gender in any of the methods used.

In the stool samples studied, positivity was detected in 5 (5,6%) samples with the modified acid fast method, in 2 (2,2%) samples with PCR, and in 1 (1,1%) sample with the ELISA method. Positive results were found in 6 of the samples studied with the DFA method. 7 samples that were found positive by any of these methods were investigated with the immunochromatographic card test and *Cryptosporidium* spp. was positive in 4 samples.

Conclusion: The study reveals that *Cryptosporidium* spp. is an important agent in patients with immunosuppressive diarrhea. Based on the DFA method as the gold standard method, the modified acid fast method stands out as a method that can be used in routine diagnosis with its high sensitivity and specificity.. In addition, it is thought that immunochromatographic diagnostic tests will be useful in laboratories with intensive workflow due to their practical use and rapid results.

Keywords: *Cryptosporidium*, Immunosuppressive, DFA, Diarrhea

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLOLAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Taksonomi.....	4
2.3. Yaşam Döngüsü	5
2.3.1. Eksistasyon Dönemi	6
2.3.2. Merogoni Dönemi	7
2.3.3. Gametogoni Dönemi.....	7
2.3.4. Fertilizasyon Dönemi.....	7
2.3.5. Ookist Duvar Oluşum Dönemi.....	7
2.3.6. Sporogoni Dönemi.....	8
2.4. Epidemiyoloji.....	8
2.5. Patogenez	10
2.6. Klinik Bulgular.....	11
2.7. İmmünolojik ve Antijenik Yapı	12
2.8. Laboratuvar Tanı	12
2.8.1. Mikroskopik İnceleme	13
2.8.2. Serolojik Yöntemler	14
2.8.3. Moleküler yöntemler	15
2.8.4. Histopatolojik İncelemeler	15
2.8.5. Kültür Yöntemleri	16
2.9. Tedavi	16
2.10. Korunma	18

3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Etik Kurul ve Proje Desteği Bilgileri	20
3.2. Hasta Populasyonunun Belirlenmesi.....	20
3.3. Laboratuvar Çalışma Basamakları	20
3.4. Mikroskopik İnceleme	21
3.5. ELISA Yöntemi.....	22
3.5.1. Kit İçeriğinde Bulunan Reaktifler	22
3.5.2. Numunelerin Hazırlanması	23
3.5.3. Testin Çalışılması	23
3.5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	24
3.6. Direkt Floresan Antikor (DFA) Yöntemi	25
3.6.1. Test Hazırlık Aşaması.....	25
3.6.2. Test Prosedürü.....	25
3.7. Moleküler Tanı Uygulaması	26
3.7.1 DNA Ekstraksiyonu.....	27
3.7.2. <i>Cryptosporidium</i> İçin In House Gerçek Zamanlı PZR Uygulaması	30
3.7.3. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	31
3.8. Verilerin Analizi.....	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51

TABLÖLAR

Sayfa No

Tablo 2.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. sınıflandırılması	5
Tablo 2.2. İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli <i>Cryptosporidium</i> türleri ve özellikleri (Fayer, Santín ve Trout 2008).....	5
Tablo 4.1. Dışkı numunelerinde mikroskopik inceleme ile saptanan diğer parazitler	32
Tablo 4.2. Hastaların cinsiyet-yaş karşılaştırması	36
Tablo 4.3. Hastaların tanılarına göre dağılımı ve oranları.....	36
Tablo 4.4. Hastaların kliniklere göre dağılımı ve oranları	37
Tablo 4.5. Mikroskopi yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması	37
Tablo 4.6. Mikroskopi yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması	38
Tablo 4.7. PZR yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması	38
Tablo 4.8. PZR yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması	39
Tablo 4.9. ELISA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması	39
Tablo 4.10. ELISA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması	40
Tablo 4.11. DFA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması	40
Tablo 4.12. DFA yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması	41
Tablo 4.13. DFA yöntemi ile elde edilen sonuçların mikroskopi sonuçları ile karşılaştırılması	41
Tablo 4.14. DFA yöntemi ile elde edilen sonuçların PZR sonuçları ile karşılaştırılması ...	42
Tablo 4.15. DFA yöntemi ile elde edilen sonuçların ELISA sonuçları ile karşılaştırılması	42
Tablo 4.16. <i>Cryptosporidium</i> pozitifliği saptanan hastaların özellikleri	43

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 3.1. ELISA kiti.....	22
Şekil 3.2. Çalışmada kullandığımız ELISA plate okuyucu ve otomatik yıkama cihazı	24
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan DFA kiti ve kullanılan IFA mikroskobu	26
Şekil 3.4. QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya)	27
Şekil 3.5. Santrifüj cihazı	29
Şekil 3.6. Termo Çalkalayıcı	29
Şekil 3.7. Gerçek zamanlı PZR cihazı (Roche, İsviçre 2004).....	30
Şekil 4.1. Aside dirençli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile yapılan incelemede <i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri	33
Şekil 4.2. Aside dirençli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile yapılan incelemede <i>Cyclospora cayetanensis</i> ookisti	33
Şekil 4.3. ELISA mikroplyetlerindeki pozitif ve negatif kuyucukların ve pozitif örneğe ait kuyucuğun görünümü.	34
Şekil 4.4. DFA ile pozitif kontrolde görülen <i>Cryptosporidium</i> spp. ookisti ve <i>G.intestinalis</i> kistleri	34
Şekil 4.5. DFA ile yapılan incelemede <i>Cryptosporidium</i> spp. ookisti	35
Şekil 4.6. In House gerçek zamanlı PZR’da <i>Cryptosporidium</i> spp. pozitif örneğin amplifikasyon eğrisi.	35

SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
mm³	: Milimetre Küp
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat Derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	: Acquired Immune Defeciency Syndrome
ATP	: Adenozin trifosfat
DFA	: Direkt FloresanAntikor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbentassay
EZN	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FITC	: Flourescein Isothiocyanate
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFA	: İmmun Floresan Antikor
IFN	: İnterferon
Ig	: İmmunglobulin
IL	: İnterlökin
NK	: Natural Killer
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
MAF	: Modifiye asit-fast
OD	: Optik Dansite
SAF	: Sodyum Asetat-Asetik Asit-Formol
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteri, mantar, parazit ya da kimyasal kontaminasyon ile meydana gelen gıda kaynaklı enfeksiyonların insan sağlığı üzerindeki etkisi hayati öneme sahiptir (Organization 2015).

Parazit enfeksiyonları özellikle gelişmekte olan ülkelerde daha sık tespit edilmektedir. Enfeksiyon hastalıklarının dünya genelindeki dağılımı, ülkelerin coğrafik özellikleri ve iklim koşulları, toplumların kültürel ve sosyoekonomik yaşam özellikleri ile doğrudan ilişkilidir (Chalmers and Davies 2010).

Cryptosporidiosis'e sebep olan *Cryptosporidium* spp; zorunlu, hücre içi (intraseellüler) ve ekstrasitoplazmik bir protozoondur (Cacciò and Putignani 2014). İnsanlar dahil birçok omurgalı konakta hastalığa neden olan enterik bir patojendir (Xiao ve ark. 2004). Parazit sindirim ve solunum yollarında mikrovillüslere yerleşerek enfeksiyona yol açmaktadır (Can ve ark. 2013). Enfeksiyon kozmopolit bir yayılım göstermekle birlikte az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde daha da sık tespit edilmektedir (Dillingham, Lima and Guerrant 2002). Çocuklar ve immün sistemi baskılanmış bireyler arasında ciddi sağlık sorunlarına yol açan etkenler arasında gösterilmektedir (Chalmers and Davies 2010).

Bulaş fekal-oral yolla insan ve hayvan dışkılarında bulunan ookistlerin alınması ile gerçekleşmektedir. Gıda, su ve yüzme havuzları ile alınan bu ookistler su kaynaklı büyük salgınlara da yol açabilmektedir (Beyhan and Yılmaz 2020). *Cryptosporidium* ookistleri morfolojik açıdan düzgün, kalın duvarlı ve renksiz özelliktedir. Ayrıca sporulasyon olduğunda dört sporozoitli yuvarlak veya oval bir görünüme dönüşmektedir (Leitch and He 2011). Dışkı ile çevreye yayılan ookistler soğuk ve nemli hava şartlarında uzun süre canlılığını koruyabilmektedir. Ookistler suda 4 °C'de 6-9 ay, -15 °C'de 8-24 saat canlılık ve enfektivite özelliklerini sürdürebilmektedirler. Ancak, ookistlerin 64,2 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda 2 dk'dan, 18-28 °C sıcaklıkta ise 4 saatten daha uzun süre kaldıklarında bu özelliklerini yitirdikleri bildirilmiştir (Şahin, Ağaoğlu and Alemdar 2018).

Bugüne kadar bu cinse ait 27 farklı tür; memeliler, kuşlar, sürüngenler ve balık türlerinde tespit edilmiştir (Cacciò and Putignani 2014). İnsanlarda tespit edilen *Cryptosporidium* etkenleri; *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* ve *C. horse'dur* (Ryan, Fayer and Xiao 2014). İnsan enfeksiyonlarının çoğundan iki *Cryptosporidium* türü (*C. hominis* ve *C. parvum*) sorumlu

tutulmaktadır. Bu iki tür arasında *C. hominis* yalnızca insanlarda tespit edilirken *C. parvum* insanların yanı sıra sığır başta olmak üzere birçok hayvanda da görülmüştür (Leitch and He 2011). *C. Hominis* Peru, Brezilya, Bangladeş ve Hindistan'da çocukluk döneminde saptanan ishallerin en önemli nedeni olarak raporlanmıştır. *C.hominis*'in genç popülasyonda daha sık tespit edildiği, İngiltere'de yaz sonu ve sonbaharda pik yaptığı bildirilmiştir. *C.parvum* ise ilkbahar aylarında kırsal kesimde tespit edilen bir türdür. (Miman and Saygı 2018). Bu iki türe ek olarak *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* ve *C. canis* gibi türlerde insanlarda raporlanmıştır (Chalmers and Katzer 2013).

Cryptosporidium spp. türlerinin neden olduğu enfeksiyonların şiddeti ve süresi; konağın tipi, immünitesi ve yaşına bağlı olarak değişmektedir (Chalmers and Davies 2010). Cryptosporidiosis, hastalarda jejunum ve ileum tutulumu ile kendini gösterir. Bu nedenle enfeksiyonun en tipik klinik bulgusu ishaldir (Current and Garcia 1991). Daha az sıklıkla tespit edilen diğer klinik bulgular karın ağrısı, bulantı ve kusmadır. Klinik semptomlar kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte sıklıkla atılan ookist miktarı, konağın bağışıklık durumu ve yaşı ile yakından ilişkilidir. Sağlıklı kişilerde genellikle asemptomatik seyir gösteren veya 1-2 haftadan sonra tedaviye gerek duyulmaksızın kendiliğinden iyileşen enfeksiyon, özellikle çocuklar, oral alım yetersizliği olanlar, bağışıklığı baskılanmış ve yaşlı kişilerde daha ağır klinik semptomlara yol açmaktadır (Cacciò and Putignani 2014, Adal, Sterling and Guerrant 1995, Korkmaz and Ok 2011, Özcel, Özbel and Ak 2007). Uzun süre devam eden inatçı ishaller dehidratasyona, sıvı-elektrolit imbalansına ve malnütrisyonu yol açarak ya da diğer organ sistemlerini etkileyerek ölüm ile sonuçlanabilmektedir (Chalmers and Katzer 2013).

İmmüsupresif hastalarda bağırsak parazitlerinin neden olduğu enfeksiyonlar sık görülmektedir. Paraziter etkenler şiddeti değişkenlik gösteren ve mortalite ile sonuçlanabilen ishallere yol açabilmektedir (Dwivedi ve ark. 2007). HIV pozitif kişilerde ölüm nedenlerinde *C. parvum*'un ikinci sırada yer aldığı raporlanmıştır (Sarıkaya 2004). Gelişmekte olan ülkelerde ise immüsupresif hasta popülasyonunda parazitler etkenlere bağlı ishal sıklığının %90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Bu ishallerde *Cryptosporidium*'un en sık tespit edilen patojenlerden biri olduğu rapor edilmiştir (Zorbozan ve ark. 2018).

Cryptosporidium enfeksiyonuna ait bulguların diğer gastroenterit etkenlerinin bulgularıyla benzerlik göstermesi, ishalleri tüm dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. varlığının test edilmemesi ve pek çok ishallerde etkeni saptama adına gelişmiş bir tanı

yönteminin tercih edilmemesi gibi sebepler, bu parazite ait vakaların belirlenememesine sebep olmaktadır. Bu sebeple cryptosporidiosis gözden kaçan klinik durumlardan olabilmektedir (Khalil ve ark. 2016).

Bu çalışmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na risk grubundaki immünsuprese hastalardan gönderilen dışkı örneklerinde, *Cryptosporidium* spp. antijenleri ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), DFA (Direkt Floresan Antikor) ve immünokromatografik kart test ile araştırılmış, parazitin DNA'sını saptamaya yönelik PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği kullanılmış ve modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri aranmıştır. Böylece her bir yöntem ile *Cryptosporidium* pozitiflikleri araştırılmış ve kullanılan yöntemlerin özgüllük ve duyarlılıkları belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Cryptosporidium ilk olarak Ernest Edward Tyzzer tarafından 1907 tarihinde fare mide epitel hücresinde tespit edilmiş ve *Cryptosporidium muris* olarak isimlendirilmiştir (Tyzzer 1907, Tyzzer 1910). İkinci tür olarak farelerin ince bağırsaklarında yaşayan ve *C. muris*'ten daha küçük ookist boyutuna sahip olan *C. parvum* tespit edilmiştir (Tyzzer 1912). Daha sonra hindilerde 1955 yılında *Cryptosporidium* kaynaklı (*C. meleagridis*) ilk ölüm rapor edilmiştir (Slavin 1955). Sığırlarda görülen ishallerin kaynağının *Cryptosporidium* olduğu ise ilk olarak 1971'de bildirilmiştir. İnsanlarda ilk kez, cryptosporidiosis immünsupresif hasta grubunda 1976'da raporlanmıştır. 1982'de ise ABD Hastalık Kontrol Merkezlerinden, 21 AIDS pozitif hastada *Cryptosporidium* tespitinden sonra cryptosporidiosis tüm dünyada büyük yankı uyandırmıştır (Fayer 2004).

2.2. Taksonomi

Cryptosporidium türleri; Apicomplexa grubu, Sporozoasida sınıfı, Coccidiasina alt sınıfı, Eucoccidiorida takımı, Eimeriorina alt takımı ve Crptosporidiidae ailesinde yer almaktadır (Fayer 2010).

Cryptosporidium'un sınıflandırılması Tablo 2.1'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir (Elgun and Koltas 2011).

Cryptosporidium spp. Coccidia protista olarak sınıflandırılmaktadır. Yaşam döngüsü olarak sınıftaki diğer üyelerle benzerdir ancak bazı yönleri ile birtakım farklılıklar göstermektedir (Divers 2008). Bunlar ekstrasitoplazmik intrasellüler yerleşim göstermesi, parazitofor vakuol bulundurması, kalın ve ince duvarlı ookistleri olması ve anti-koksidial ajanlara dirençli olmasıdır (Carreno, Matrin and Barta 1999, Fayer 2010).

Cryptosporidium cinsindeki tüm patojenler hücre içi ökaryotiktir. DNA'larının çoğu çift zarlı olup çekirdekte bulunmaktadır (Xiao and Feng 2008). *Cryptosporidium* cinsinde 27 tür rapor edilmiştir. Bu 27 türün 3'ü (*C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli*) kuşlarda; 19'u (*C. muris*, *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. macropodum*, *C. ryanae*, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. tyzzeri*, *C. viatorum*, *C. scrofarum* ve *C. erinacei*) memelilerde; 1'i (*C. fragile*) amfibilerde; 2'si (*C. serpentis* ve *C. varanii*) reptillerde ve 2'si ise (*C. molnari* ve *C. huwi*) balıklarda tespit edilmiştir (Ryan

ve ark. 2014, Ryan ve ark. 2015). İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli *Cryptosporidium* türleri ve özellikleri Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *Cryptosporidium* spp. sınıflandırılması (Elgun and Koltas 2011).

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik özellikleri
Alem	Animalia	
Şube	Protista	Tek hücreli canlı olup ökaryotiktir
Alt Şube	Apicomplexa	Mikrotübüllerin meydana getirdiği apikal kompleks yapıları mevcuttur. Veziküler çekirdekleri mevcuttur.
Sınıf	Sporozoa	Seksüel ve aseksüel çoğalma, Ookist meydana getirme, hücreye fagosite olan parazitin kayma kontraksiyon şeklinde hareketi gibi özellikleri bulunmaktadır.
Alt sınıf	Coccidia	Biyolojik gelişimi merogoni, gametogoni ve sporogoni olarak ilerler. Hücre içinde Seksüel evre meydana gelir.
Takım	Eucoccidia	Merogoni fazı vertebralı konakta gerçekleşir.
Alt takım	Eimeriina	Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet oluşmaktadır. Her bir makrogamonttan ise bir makrogamet meydana gelmektedir.
Aile	Cryptosporidiidae	Monoksen gelişim görülmektedir. Ookistler sporokistleri bulundurmuyup çıplak dört sporozoit bulundurmaktadır.
Cins	<i>Cryptosporidium</i>	

Tablo 2.2. İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli *Cryptosporidium* türleri ve özellikleri (Fayer, Santín and Trout 2008)

Tür	Konak	Yerleşim Yeri	Kist Boyutu
<i>C.canis</i>	Köpek	İncebağırsak	3.7x5.9µm
<i>C.parvum</i>	Çiftlik hayvanları, insan	İncebağırsak	4.5x5.5µm
<i>C.suis</i>	Domuz	İncebağırsak	4.4x5.1µm
<i>C.felis</i>	Kedi	İncebağırsak	4.5x5µm
<i>C.muris</i>	Rodentler	Mide	5.5x7.4µm
<i>C.andersoni</i>	Sığır	Mide	5.6x7.4µm
<i>C.wreiri</i>	Kobay	İncebağırsak	4.0x5.6µm
<i>C.bovis</i>	Sığır	İncebağırsak	4.2x5.6µm
<i>C.baileyi</i>	Kümes hayvanları	Trakea, Bursa Fabricius, Kloaka	4.6x6.2µm
<i>C.gali</i>	Tavuk, İspinoz	Proventrikulus	6.2x8.5µm
<i>C.ryanae</i>	Sığır	?	3.7x3.2µm

2.3. Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium spp.’nin eşeyli (seksüel) ve eşeysiz (aseksüel) üreme dönemleri altı fazdan oluşmaktadır. Bunlar; eksistasyon (enfektif sporozoitlerin salınımı), merogoni

(konak hücre içinde aseksüel çoğalma), gametogoni (mikro ve makrogametositlerin oluşması), fertilizasyon (döllenme), ookist duvarı oluşumu (bir konaktan diğer konağa bulaşmada çevre şartlarına dirençli ookist duvarı) ve sporogonidir (enfektif sporozoitlerin oluşumu) (Constable 2014, Miman and Saygı 2018). Yaşam döngüleri tek bir konakta tamamlanmaktadır. Bu patojenin konak dışındaki tek evresi ise ookist evresidir (Şahin ve ark. 2018). Ookistler $\geq 4,5$ μm boyutunda oval veya küresel görünümündedir.

Bu evrede kistin, kimyasal ve mekanik etkilere, çevresel şartlara karşı direnci artıran 49 nm kalınlığında üç katmanlı bir çeper yapısı vardır. Bu çeper yapısı yeni enfeksiyonların odağı olacak sporozoitleri çevrelemektedir (Fayer and Xiao 2007, Harris and Petry 1999). Çeperin en dıştaki katmanının kalınlığı 10 nm olup değişkenlik gösterebilmektedir. Orta katmanın kalınlığı 2,5 nm'dir. İç katman ise kendi içinde iki katmana ayrılmakta ve katmanların kalınlıkları 11,6 ve 25,8 nm olarak ölçülmektedir. Rezidüel cisimciğin boyutu 2,4 μm x 2,5 μm 'dir. Birçok granülle kuşatılmıştır. Sporozoitlerin boyutları 4,9 μm x 1,2 μm şeklindedir ve rezidüel cisimciğin yanında yerleşirler (Weber ve ark. 1991). Sporozoitlerin konak hücreye girişte görevli apikal kompleks olarak isimlendirilen bir organeli vardır. Bu organelde rhoptri, mikronem ve granüller mevcuttur. Hareket özelliği olan bu sporozoitler ince bağırsak mukozasının yüzey reseptörlerine birtakım moleküllerle (gp900, CP47, Cpg40/15 gibi) tutunurlar. Tutunma sonrası protozoonlar aktin polimerizasyonu ile ince bağırsak mukozasında çıkıntı meydana getirirler. Bağırsak mukozası sporozoiti çevreler ve mikrovillus katmanında parazitofor vakuol oluşumu gözlenir (Elliott ve ark. 2001, Langer and Riggs 1999). Bu vakuol paraziti konak bağırsak immünitesinden korur. Ayrıca enerji ve beslenme ihtiyacı vakuol sayesinde konaktan karşılanır (Miman and Saygı 2018).

2.3.1. Ekskistasyon Dönemi

Cryptosporidium spp.'nin enfektif özelliği olan sporlu ookist formları dışkı ile çevreye saçılmaktadır. Ookistlerin enfektif konakçıdan çevreye saçılması, fekal-oral bulaş ile konak hücreye alınması ve konakçı bağırsağında açılması ekskistasyon evresi olarak isimlendirilir (Karabey ve ark 2021).

Hayat döngüsünün ilk fazı olan bu ekskistasyon evresinde, konağa giriş yapan ookistin ince bağırsaklarda açılması sonucu dört tane enfektif sporozoit oluşmaktadır (Chalmers and Davies 2010). Kistin açılmasında etkili unsurlar karbondioksit, vücut ısısı,

pankreatik enzimler ve safra tuzlarıdır (Miman and Saygı 2018). Bu sporozoitler bağırsak mukozasına giriş yapmaktadır (Chalmers and Davies 2010).

Bağırsak mikrovillusları protozoonu membran kesesi meydana getirerek sarmaktadır. Böylece, parazit konağın bağırsak epitellerinde intrasellüler-ekstrasitoplazmik bir yerleşim göstermektedir (Chalmers and Davies 2010).

2.3.2. Merogoni Dönemi

Hayat döngüsünün ikinci fazında, sporozoitler önce trofozoitlere, ardından eşeysiz üreme ile Tip 1 merontlara dönüşüm gösterir. Tip 1 merontlardan 6- 8 merozoit meydana gelmektedir. Oluşan merozoitler yeni hücrelere giriş yaparak tekrar eşeysiz üreme ile ya Tip 1 ya da Tip 2 merontlara (4 merozoit) dönüşerek eşeyli üreme döngüsünü başlatmaktadır (Hijjawi ve ark. 2004).

2.3.3. Gametogoni Dönemi

Cryptosporidium spp.'nin hayat siklusunun üçüncü fazı ise gametogonidir. Merogoni sonucunda Tip 2 merontu içinde oluşan bu 4 merozoit hücre parçalanınca yeni epitel hücrelerine girip gametogoniye başlatır. Böylece mikro ve makrogamet oluşur. (Hijjawi ve ark. 2004).

2.3.4. Fertilizasyon Dönemi

Hayat siklusunun dördüncü fazında (fertilizasyon) mikrogametlerin makrogametlerle birleşmesi sonucunda ookist (zigot) meydana gelmektedir (Şahin ve ark. 2018). Zigot 2 aseksüel sporogonik döngü geçirir ve 4 sporozoitli ookist meydana gelir. Dışkı ile atılan bu ookist enfektif özelliktedir (Miman and Saygı 2018).

2.3.5. Ookist Duvar Oluşum Dönemi

Hayat siklusunun beşinci fazında *Cryptosporidium*'un eşeyli üremesi sonucu ince ve kalın çeperli ookistler meydana gelmektedir (Miman and Saygı 2018). Ookistlerin yaklaşık %80'inde iki şeritli ookist duvarı meydana gelirken, %20'sinde ince duvarlı bir yapı görülmektedir (Hijjawi ve ark. 2004).

2.3.6. Sporogoni Dönemi

Hayat siklusunun altıncı fazı olan sporogoni evresi paraziter vakuolde meydana gelmektedir. Mayoz bölünme sonrası ince duvarlı ookistlerde dört tane sporozoit oluşmaktadır. Oluşan bu kistler konak bağırsak lümenine geçiş yapıp açılmaktadır (Şahin ve ark. 2018). Bu tip bulaşma, yuvarlak solucanlardan *Strongyloides stercoralis*'in yaşam döngüsünde olduğu gibi iç otoenfeksiyon olarak adlandırılmıştır. Kalın çeperli ookistler ise sporlanarak konak dışkıları ile çevreye saçılmaktadır. Saçılan bu ookistler dış otoenfeksiyon, kişiden kişiye direkt temas, yada kontamine yiyecekler ile yeni konaklara giriş yaparak yeni bir hayat döngüsü başlatmaktadır (Şahin ve ark. 2018, Miman and Saygı 2018).

2.4. Epidemiyoloji

Parazitin kimyasal ve fiziksel inaktivasyona duyarlı olmaması, az sayıda ookistin enfeksiyona yol açabilmesi ve üremenin hızlı gerçekleşmesi parazitin yayılımını ve taşınmasını kolaylaştıran unsurlardır (Dillingham ve ark. 2002). Ayrıca bu etkenin saptandığı taşıyıcı hasta popülasyonunda devamlı kist yayılımı görülmektedir (Bayramoğlu, Pekmezci and Başarı 2013).

İklim koşullarının elverişli olduğu durumlarda (nemli ve 20°C'nin üzerindeki sıcaklıkta), bu patojen 6 ay kadar canlılığını koruyabilmekte, sonrasında hızlı bir şekilde patojenitesini yitirmektedir. Ookist boyutunun küçük ve çökme hızının az oluşu, su birikintilerinde uzun süre canlılığının devam etmesine neden olmaktadır (Dillingham ve ark. 2002).

Bulaş yiyeceklerle de gerçekleşebilmektedir. İmmün sistemi baskılanmış insanlar için hayvanlar, *Cryptosporidium* enfeksiyonu için odak olabilmektedir. Sinekler ise mekanik vektör görevi görmektedir (Usluca and Aksoy 2006).

Klor karşı direnç: Havuzlardaki klor konsantrasyonunun (2 ppm) ookistleri iki günde etkisiz hale getirebildiği fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ancak havuz suyuna dışkı bulaşı durumunda ise ookistlerin enfeksiyona neden olabileceği tespit edilmiştir. Organik maddelerin (saç, kıl, ter, losyon, idrar, mantar vs), ookistleri klorun inaktivasyonundan koruduğu tahmin edilmektedir (Carpenter ve ark. 1999).

Asidik direnç: Parazitin pH'ı düşük yiyeceklerde özellikle meyve sularında, örneğin elma suyunda saptandığı rapor edilmiştir.

Ookist boyutu: Filtrasyon sistemi *G.intestinalis* ve *E.histolytica* kistlerinin geçişine izin vermese de bu kisterin 1/3'ü kadar bir hacime sahip olan *Cryptosporidium* ookistleri için yetersizdir (Usluca and Aksoy 2006).

Zoonotik özellik: *C. parvum* türünde konak tür seçiciliği tespit edilmemiştir. 152 memeli türünün *C. parvum* veya benzeri bir parazit ile enfekte olabileceği rapor edilmiştir (Fayer, Morgan and Upton 2000).

Enfektif dozun düşüklüğü: Sadece bir buzağı, 6-8 günde 10^{11} ookist saçılımına neden olabilmektedir. Bazı araştırmacılar bir insanda enfeksiyon meydana gelmesi için 30 ookistin gerekli olduğunu rapor ederken, bazı araştırmacılar sadece bir ookistin bile enfeksiyona yol açabildiğini tespit etmişlerdir (Pereira ve ark. 2002).

Cryptosporidium ookistleri, ubiquiter özelliktedir bu sebeple tüm dünyada yaygın enfeksiyon etkenidir. Ancak, gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyonun görülme sıklığı daha fazladır (Cacciò and Putignani 2014, Chalmers and Cacciò 2016). Epidemiyolojik araştırmalar *Cryptosporidium* spp.'nin dünya genelinde dağılımının değişkenlik gösterdiğini raporlamaktadır. Araştırmalar *C. parvum* ve *C. hominis*'in cryptosporidiosis pozitif vakaların %90'ından sorumlu olduğunu göstermektedir (Şahin ve ark. 2018).

C. hominis Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya, Çin, Japonya ve Afrika'da yaygın olarak saptanırken, *C. parvum* öncelikli olarak İngiltere'de görülmekte bunu Avrupa ve Yeni Zelanda takip etmektedir (Shrivastava ve ark. 2017). Ortadoğu ülkelerinde ise *C. parvum* daha sık saptanmaktadır (Xiao 2010).

Bu parazit dünya genelinde görülebilmekte ve temel semptomu ishal olan hastalıkların altında yatan neden olabilmektedir (Sarıkaya 2004). Prematüre ölümleri ve çocukluk dönemindeki büyüme gelişme geriliği ile ilişkili bulunan *Cryptosporidium*, 1990'lı yıllarda ABD Milwaukee'de 400.000 kişide görülen su kaynaklı bir epidemiyeye sebep olmuştur. Günümüzde Antartika dışında hemen her yerde görülebilmektedir. *Cryptosporidium* gelişmiş ülkelerdeki immünkompetan kişilerde %1 oranında saptanırken, sosyoekonomik seviyesi düşük ülkelerde %5-10 görülmektedir. İshal şikayeti ile başvuran çocuklarda ise bu oran %10 ila 25 arasında değişkenlik göstermektedir (Miman and Saygı 2018).

Cryptosporidiosis görülme sıklığının yüksek olduğu yerlerde hastanın immünitesinin normal ya da baskılanmış olmasının hastalık seyrinde önemli bir unsur olduğu belirlenmiştir. HIV pozitif popülasyonda *Cryptosporidium* enfeksiyon sıklığının

gelişmiş ülkelerde %14, gelişmekte olan ülkelerde ise %24 olduğu raporlanmıştır (Dillingham ve ark. 2002). Türkiye’de immünsupresif hastalarda yapılan araştırmalarda *Cryptosporidium* prevalansının % 0-35.5 arasında değiştiği belirtilmiştir (Ok ve ark. 1995, Tanyüksel, Haznedaroğlu and Gün 1995). Ülkemizdeki başka bir çalışmada 106 immünsupresif hasta popülasyonunda pozitiflik oranı %16,9 bulunmuştur (Tanyüksel ve ark. 1995).

2.5. Patogenez

Cryptosporidium, sindirim kanalının herhangi bir bölgesine yerleşebilmekte, ancak en ağır klinik semptomlar etkenin jejunum bölgesine invaze olması neticesinde görülmektedir (Fayer and Ungar 1986, Usluca 2009). *Cryptosporidium* spp.’nin yol açtığı klinik tabloda patojenin enfeksiyona yol açma mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Tzipori and Ward 2002).

Enfeksiyonun meydana gelişinde sıkı bağlantı proteinlerinin ve hücre iskeletinin dejenerasyonu ile sindirim sistemi epitelinde apoptozise neden olan sistein proteaz ve serin gibi mediyatörlerin önemli bir yeri vardır. *Cryptosporidium* proteinazının konakta mide-bağırsak proteinazla aktive olan reseptör 1 (PAR-1)’i aktive ettiği tahmin edilmektedir. Proteinazla aktive olan reseptör 1 (PAR-1) apoptozisi düzenlemekte ve sindirim sistemi epitel hücre geçirgenliğini arttırmaktadır. *C. parvum*’un yol açtığı ishalin ortaya çıkması ile ilişkili olarak, bağırsak emilimini ve sindirimini bozan mikrovillüs dejenerasyonu, *Cryptosporidium*’un salgıladığı enterotoksin, konağa bağlanmayı sağlayan TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) ve CSL (*Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein) gibi tutunma unsurlarını kapsayan birtakım mekanizmaların etkili olabileceği tahmin edilmektedir (Rota and Fidan 2007).

Sindirim sistemindeki villus atrofi sonucunda yitirilen hücrelerin yeniden kazanılması amacıyla kript hiperplazisi meydana gelmektedir (Foster and Smith 2009). Bu sebeple PGE2 ve Cl salgısında artış görülmüştür. Ayrıca lamina propriada inflamatuvar hücrelerde aktivasyon tespit edilmiştir (Clark 1999).

Cryptosporidium’un bağırsak villuslarına yerleşmesiyle sindirim sistemi epitel hücrelerinin işlevleri ve enzim aktiviteleri sekteye uğramaktadır. Besin ve elektrolit emiliminin bozulduğu tespit edilmiştir (Gookin, Nordone and Argenzio 2002, Tzipori and Ward 2002, O’Handley and Olson 2006). Sonuçta sekretuar ve malabsorptif diare görülmektedir (Fahey 2003).

2.6. Klinik Bulgular

Cryptosporidiosis, su kaynaklı önemli enfeksiyonlar arasında gösterilmektedir (Usluca and Aksoy 2006). Bu enfeksiyonda inkübasyon süresi ortalama 7 gün (1-14 gün)'dür. Ancak konağın immünitesine göre semptomların görülme şekli değişmektedir (Chalmers and Davies 2010, Hunter ve ark. 2007).

Cryptosporidiosis kliniğinde diare, kusma, bulantı, karın ağrısı, iştahsızlık, kilo kaybı ve kramp görülmektedir. İmmünitesi güçlü olan hastalarda enfeksiyonun, en fazla iki hafta süren ishal ile daha sonrasında kendini sınırladığı tespit edilmiştir (Cacciò and Putignani 2014).

Günümüzde kanserli vaka sayılarındaki artış, immün yetmezlik, immün sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımının artması ve malnütrisyonlar sonucunda *Cryptosporidium* enfeksiyonu ciddi bir sağlık sorunu olarak kabul görmektedir (Taşar, Güneş and Vezir 2019). İmmüsupresif hastalarda klinik tablo ağır seyretmektedir. Bu hasta grubunda iki aydan daha uzun süren ishal ve buna bağlı şiddetli dehidratasyon ve kilo kaybı görülmektedir (Farthing 2000). Günde 20 litreyi bulan kolera benzeri bu ishal tablosunda dışkı örneklerinde kan ve lökosit bulunmamaktadır (İnceboz, Sarı and Orhan 2002, Dirim Erdoğan, Turgay and Alkan 2003). Uzun süre hastanede yatış ve mortaliteye neden olabilmektedir (Farthing 2000). AIDS gibi immüsupresif hasta grubunda kolesistit, pankreatit, kolanjit gibi ekstraintestinal sistem tutulumu da izlenebilir (Chalmers and Davies 2010).

Çocuklarda genellikle respiratuvar cryptosporidiosis görülmekte, bu durum genelde asemptomatik olmakla beraber pulmoner infiltrasyon ve respiratuvar distress saptanabilmektedir (Miman and Saygı 2018). Akciğer veya trakea tutulumu olduğunda başlıca semptom öksürük olarak bildirilmiştir (Chalmers and Davies 2010). Ayrıca çocukluk döneminde uzun süre devam eden cryptosporidiosis, büyüme ve gelişme geriliğine neden olabilmektedir (Mølbak ve ark. 1997).

Ayrıca asemptomatik enfeksiyonlar da rapor edilmiştir (Cacciò and Putignani 2014). Asemptomatik vakalarda anoreksi, depresyon, myalji, baş ağrısı ve halsizlik raporlanmıştır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere hafif ya da asemptomatik enfeksiyonun, tanı alan hastalardan daha yaygın olduğu tahmin edilmektedir (Robinson ve ark. 2001, Dann ve ark. 2005, Huang and White 2006).

2.7. İmmünolojik ve Antijenik Yapı

Cryptosporidiosis'e karşı immünolojik cevap doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi üzerinden gerçekleşmektedir. Araştırmalar doğal bağışıklık sisteminin etkene yönelik savunmada önem teşkil ettiğini raporlamaktadır. Toll-like reseptörler, antimikrobial peptidler, mannoz-bağlayıcı lektin, kemokin, sitokin ve prostaglandinler doğal bağışıklık sisteminin yapı taşları olarak gösterilmektedir (Robinson and Dorothy 2008).

Cryptosporidiosis'e karşı savunmada hücresel bağışıklığın da önemli olduğu vurgulanmaktadır (Theodos 1998, Riggs 2002). IFN- γ ve CD4⁺ T lenfositler *Cryptosporidium* enfeksiyonunun kontrol altına alınmasında büyük öneme sahiptirler (Sallon ve ark. 1991). *Cryptosporidium*'a karşı meydana gelen bağışıklık sisteminde IFN- γ ve $\gamma\delta$ T hücreleri enfeksiyonun başlangıcından itibaren rol almaktadır. Salgılanan IL-4, IL-5 ve IL-10 önemli ajanlar olarak gösterilmektedir (Theodos 1998, Riggs 2002). Bağırsaklardan sekrete edilen IFN- γ 'nın GIS epitel hücrelerinin aktivasyonu ile ookistlerin dışarı atılmasında görev aldığı böylece enfeksiyonun eliminasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. Diğer bir sitokin olan IL-12 ise IFN- γ 'nın salgılanmasını uyarır ve eksikliğinde enfeksiyonun kronikleştiği bildirilmiştir (Usluca 2009, Laurent ve ark. 1999). Enfeksiyonun progresyonunun engellenmesinde CD4 sayısı büyük önem taşımaktadır. Yapılan araştırmalar CD4 sayısı'nın 180 hücre/mm³ üzerinde iken immünsupresif bireylerde enfeksiyonun kendi kendini sınırladığını, 100 hücre/mm³'ün altında olduğunda ise enfeksiyonun kronik bir hal aldığını göstermiştir. CD4 sayısı 50 hücre/mm³'ün altında olduğunda fulminan enfeksiyon geliştiği raporlanmıştır (Mandel, Bennett and Doli 2005, Laurent ve ark. 1999, Chen and LaRusso 1999).

Humoral bağışıklık sisteminin cryptosporidiosis enfeksiyonundaki mekanizması tam anlamıyla aydınlatılamamasına rağmen *Cryptosporidium* ile enfekte hastaların serumlarında Ig G, Ig M ve Ig A tipi antikorların bulunduğu tespit edilmiştir (Elgün and İS 2009). Özellikle salgı şeklindeki Ig A'nın, klinik semptomların kontrol altına alınmasında büyük rol oynadığı ve yeterli düzeyde olmadığında enfeksiyonun kronikleştiği raporlanmıştır (Köreng 2011).

2.8. Laboratuvar Tanı

Cryptosporidium enfeksiyonlarının tanısında dışkı, balgam ve safra numunelerinde birtakım teknikler uygulanmaktadır (Karabey ve ark. 2021). Bu enfeksiyonun tanısı için

mikroskopi, serolojik yöntemler (ELISA, DFA, İmmünokromatografik kart test), histopatolojik yöntemler ve kültür yöntemi kullanılmaktadır (Ryan, Hijjawi and Xiao 2018, Robertson 2014).

Cryptosporidium tanısı sağlayan ticari ürünler (DFA, ELISA ve İmmünokromatografik kart test) piyasada bulunmaktadır.

2.8.1. Mikroskobik İnceleme

Hastalarda bağırsak parazitlerinin tanısı öncelikle dışkı, daha nadiren duodenal sıvı ya da biyopsi numunelerinde parazitin değişik formlarının tespit edilmesiyle gerçekleşir. Bu sebeple direkt ya da boyalı dışkı örneklerinin mikroskobik incelemelerinin *Cryptosporidium* tanısında önemli bir yeri vardır (Kappus, Juranek and Roberts 1991, Parija and Srinivasa 1999). Dışkıda mikroskobik inceleme özellikle numune doğru bir şekilde hazırlandığında ve yeterli miktarda numune tarandığında yüksek duyarlılığa sahiptir. Işık mikroskobunun ve lam lamel gibi ekonomik araç gereçlerin temin edildiği herhangi bir laboratuvarıda uygulanabilir. Ancak deneyimli ve iyi yetişmiş personele ihtiyaç duyulması ve elde edilen sonuçların subjektif olabilmesi bu yöntemin göz ardı edilmemesi gereken dezavantajlarıdır (Parija and Srinivasa 1999).

Bağırsak parazitlerinin belli periyotlarla dışarı saçılımı sebebiyle en az üç dışkı numunesinin mikroskobik olarak incelenmesi daha doğru bir yaklaşımdır (Vidal and Catapani 2005).

Özellikle dışkıdaki ookist düşük miktarda ise mikroskobik inceleme ile *Cryptosporidium* spp. tanısı koymak son derece güçtür. Tanı konurken dışkı numunelerine asit fast boyama ile bakılması zorunlu olup boyama için kullanılacak materyaller sakıncalı ve toksik özelliktedir. Konsantrasyon uygulamaları ise zaman alıcıdır ve yoğun iş yükü oluşturmaktadır (Control and Prevention 2004, Rosenblatt and Sloan 1993).

Cryptosporidium tanısı amacıyla en çok tercih edilen boyama yöntemleri karbolfuksin boyama (Heine 1982) modifiye Ziehl–Neelsen boyama (Casemore 1991, Henriksen and Pohlenz 1981) ve modifiye Kinyoun (Ma and Soave 1983) boyama olarak gösterilebilir. Bu sayılanlara ek olarak metanolde fiksasyonu yapılmış giemsa boyama (Pohlenz, HW and WJ 1978) metilen mavisi ile safranin boyama (Baxby and Blundell 1983) diğer boyama yöntemleridir.

2.8.2. Serolojik Yöntemler

Günümüzde yüksek hassasiyet ve yüksek spesifite özellikleri sebebiyle antijen tarama testleri en çok kullanılan tanı yöntemleri olarak gösterilmektedir. Bunlar DFA, ELISA ve immunokromatografik yöntemlerdir (Uyar 2009, Özcel ve ark. 2007, Garcia ve ark. 2003).

Bu parazitin yüzey antijenlerini tespit eden DFA yöntemi, mikroskopik incelemelere kıyasla daha duyarlı (%99) ve özgül (%100) olup referans yöntem olarak kabul görmektedir (Control and Prevention 2004). Bu yöntemde etkenin arandığı dışkı örneği lam üzerine yayılarak fiksasyon sağlanır ve FITC işaretli monoklonal antikolar kullanılır. Floresans mikroskopunun kullanıldığı inceleme ile ookistlerin tespiti sağlanır. Bu incelemede konsantre edilmiş veya edilmemiş dışkı numuneleri kullanılabilir (Control and Prevention 2004, Yavuz and Özkan 2009). Ayrıca DFA yöntemi, ELISA kitleri gibi çapraz reaksiyon göstermemektedir (Rosenblatt and Sloan 1993). Bu sebeple avantajlıdır. *Cryptosporidium* ve *Giardia* kistlerinin beraber tespit edildiği DFA kitleri piyasada mevcuttur.

Cryptosporidium antijenlerinin tespitini sağlayan bir başka tanı yöntemi de ELISA yöntemidir. SAF ya da formolde bekletilmiş, dondurulmuş veya hemen alınan dışkı örneklerine uygulanabilmektedir. Ancak PVA'da getirilen dışkı örneklerinde bu yöntem ile tanı konulamamaktadır. Bu yöntemde dışkı örneğinin, numune dilüsyon sıvısı ile emulsifiye edilmesi sağlanır. Sulandırılmış dışkı numunesi ve parazit antijenine özel olan monoklonal antikora sahip konjugat, mikroplyetlerin kuyucuklarına konur. Bu kuyucuklarda *Cryptosporidium* ookist antijenine bağlanacak olan poliklonal antikolar mevcuttur. Eğer dışkı numunesinde ookist mevcutsa mikroplyetlerdeki poliklonal antikolar ve konjugatta yer alan ookiste özel monoklonal antikolar ile birleşir. Özgül olmayan birleşmeler yıkama ile uzaklaştırılır. Substrat eklenince enzim-antikor-antijen kompleksine bağlı renk oluşumu meydana gelir (Control and Prevention 2004).

İmmünokromatografik kart testlerinin özgüllüğü %67,6-97,6 arasında değişmektedir. Hızlı tanı sağlamaları nedeniyle iş yükü fazla olan laboratuvarlarda kullanılmaktadır (Garcia and Shimizu 2000, Johnston ve ark. 2003). *Cryptosporidium* spp, *G. intestinalis* ve *Entamoeba histolytica*'nın ayrı ya da birlikte çok kısa sürede sonuç veren hızlı tanı testleri mevcuttur (Karabey ve ark. 2021).

Ayrıca IgG antikor tespitini temel alan başka serolojik tanı testleri de geliştirilmiştir. *Cryptosporidium* Cp23'e karşı gelişen antikorlar enfeksiyonun uzun zaman önce geçirildiğini, Cp17'ye karşı gelişen antikorlar enfeksiyonun yakın zamanda geçirildiğini, P2'ye karşı gelişen antikorlar ise tekrarlayan enfeksiyonu ifade etmektedir (Miman and Saygı 2018).

2.8.3. Moleküler yöntemler

Günümüzde moleküler tekniklerin uygulamalarının artışı ile *Cryptosporidium* spp.'nin gıdalarda tespit edilme olasılığının yükseldiği, bu tekniğin duyarlılığının ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Checkley ve ark. 2015). Moleküler yöntemler hassas ve hızlıdır ancak kısıtlayıcı birtakım unsurlar bulunmaktadır.

Genetik materyalin ekstraksiyonu gerekli olup dışkıdaki safra tuzları, polisakkarit bileşikler ve diğer materyaller inhibitör özellik teşkil edebilmektedir. Bu sebeple dışkı numunesi kullanılan moleküler çalışmalarda, kontaminasyonun minimum seviyeye indirilmesi ve örnekten ookistlerin itina ile ayrılması gerekir (Fayer ve ark. 2000). Kullanılan yöntemin güvenilirliği ve duyarlılığı uygun primer seçimine bağlıdır. Günümüzde PZR teknolojisinin gelişmesiyle ve genetik materyal ekstraksiyon kitlerinin kullanımı ile inhibitör özellikli materyallerin etkisi azaltılmıştır (Xiao ve ark. 2000).

Tür ayrımının yapılmasında ve genotipin ortaya konulmasında PZR önemli bir yere sahiptir. Bu yöntemler epidemiyolojik çalışmalarda ve konak tespitinde son derece yararlıdır (Usluca and Aksoy 2006). Enfeksiyonun kontrol altına alınmasında moleküler yöntemlerin önemi büyüktür (Sarıkaya 2004).

Multiplex sindirim sistemi parazit panellerinde *Cryptosporidium* spp, *E.histolytica*, *G.intestinalis*, *D.fragilis* beraber araştırılabilmektedir (Miman and Saygı 2018).

2.8.4. Histopatolojik İncelemeler

Cryptosporidium spp.'nin tanısında 1980'li yıllardan önce bu yöntem uygulanmıştı. Bağırsak biyopsilerinde eozin ve hemotoksilen boyaları kullanılarak mikrovilluslarda küçük ve yuvarlak parazit ookistleri aranmakta ancak tür ayrımı yapılamamaktadır. İnvaziv bir yöntem olması ve alınan biyopsilerin hızlı tespiti gereksinim duyması, ekonomik olmaması, uygulama için fazla süre gerekmesi gibi sebeplerle günümüzde çok tercih edilmemektedir (Fayer and Ungar 1986).

2.8.5. Kültür Yöntemleri

Cryptosporidium spp. paraziti, kolon kanser hücrelerinde ve ilioçekal adenokarsinom hücrelerinde saptanmaktadır. Kültür uygulamalarında su numunelerindeki inhibitörlerin etkisine dirençli infektif ookistlerin tespiti mümkündür. Bulguların farelerde yapılan uygulamalarla korele olduğu görülmüştür. Hücre kültür yöntemlerinin ayrıca *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin konsantrasyonunu saptadığı da rapor edilmiştir. Bu pozitif yönlerinin yanı sıra kültür amacıyla çeşitli materyallere gereksinim duyulması, ookist morfolojisinin izlenmesi için 1-3 gün gibi bir zamana gereksinim duyulması gibi negatif yönleri de bulunmaktadır (Persing ve ark. 2006).

2.9. Tedavi

Temel biyolojisi tam anlamıyla kavranamadığı için *Cryptosporidium*'a karşı henüz etkin bir tedavi yaklaşımı oluşturulamamıştır. Bu sebeple enfeksiyon kronikleşip hayati tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir (ner ve ark. 2009, Köreng 2011, Cook ve ark. 2015).

Biyokimyasal ve metabolik yolaklar hakkındaki bilgi eksikliği tedavi kısıtlılığının temelini oluşurmaktadır. Yapılan alışmalar *Cryptosporidium*'un işlevsel bir mitokondrisinin olmadığını ve aktif krebs döngüsünden yoksun olduğunu göstermekte ancak tüm glikolitik enzimleri kodladığını ifade etmektedir. Parazit enerji metabolizmasında öncelikle glikozun anaerobik oksidasyonunu kullandığından, glikolitik yolakta yer alan enzimler ve rol alan diğer ürünler anticryptosporidial ilaçlar için potansiyel hedefler olabilirler. Apikompleksan parazitler ile yapılan başka çalışmalar ise glikoliz inhibisyonu ile antiparaziter tedavi oluşturulabileceğini göstermiştir (ner ve ark. 2009, Cook ve ark. 2015).

ATPazlar, iyon ve aminofosfolipitleri membran boyunca aktif olarak taşıyan bir protein ailesidir. Yapılan alışmalar, *Cryptosporidium*'un hücre içi ve dışı ortamlardan geçişi sırasında homeostazı devam ettirmek amacıyla bir P-ATPaz ailesine gereksinim duyduğunu belirtmektedir. Ayrıca bu etkenin yeni bir P-ATPazı (CpATPase3) karakterize edilmiştir. Bu yolakların ilaç geliştirme amacıyla kullanabileceği düşünülmektedir. (LaGier, Keithly and Zhu 2002).

Birtakım araştırmalar uçucu yağların *C. parvum*'a karşı etkili olabileceğini düşündürmektedir. Karvakrol, linalool, timol ve öjenol gibi uçucu yağ moleküllerinin

antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir fakat antiprotozoal aktiviteleri konusunda ayrıntılı bir çalışma yapılmamıştır (Dominguez-Uscanga ve ark. 2021).

İmmünkompetan hasta grubunda su ve elektrolit replasman tedavisi genellikle yeterlidir (Miman and Saygı 2018). İmmun sistemi baskılanmış hasta grubunda hayatı tehdit eden klinik semptomlara neden olduğu için etkili bir kemoterapötik ajana gereksinim duyulmaktadır (Köreng 2011). Bu hastalarda paramomisin, rifaksimin, rifabutin, HIV proteaz inhibitörleri, makrolidler ve nitozoxanide tedavi için kullanılan ajanlardır. (Miman and Saygı 2018; Xiao ve ark. 2004). Enfeksiyonun tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onay verdiği tek ajan nitozoxanide'tir (Checkley ve ark. 2015; Sparks ve ark. 2015). Yapılan bir araştırmada bu ajanın üç günlük kullanımında gastroenterit semptomlarının dramatik azaldığı tespit edilmiştir (Rossignol ve ark. 2006). Yapılan bir başka çalışmada ise malnutre çocuklarda mortaliteyi önemli ölçüde azalttığı, ishali %56 oranında ortadan kaldırdığı raporlanmıştır (Miman and Saygı 2018). Ayrıca diclazuril, eflornithine ve hiper immune bovine colostrum'un araştırmalarda faydalı oldukları rapor edilmiştir (Altıntaş 1997). Halofuginon ve Toltrazuril ise tedavi edici özelliği değerlendirilen ajanlar arasındadır (Büget ve ark. 2000)

Kullanılan bu ilaçların etkenin olgunlaşması ve ookist saçılımı döneminde çok etkili olamaması, böbreklere toksik etkisi ve sitotoksisite gibi özellikleri nedeniyle bu enfeksiyonun tedavisinde yeni ajanlara gereksinim duyulmaktadır (Gaafar 2012; Inomata ve ark. 2015; Shahiduzzaman and Dauschies 2012).

Yapılan bir çalışmada heparin sülfatın bu etkene karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu parazitin yayılımında görevli *C. parvum* elongation factor 1 α proteini (CpEF1 α), heparinle etkileşime girdiğinde *Cryptosporidium*'un etkisinin inhibe edildiği fark edilmiştir. Bu sebeple *Cryptosporidium* tedavisinde heparin sülfatın umut verici bir ajan olabileceği düşünülmektedir (Inomata ve ark. 2015).

İshali olan hastalarda dehidratasyon bulguları görülürse oral veya intravenöz sıvı tedavisine ihtiyaç duyulabilir. Bağırsak pasajı azaltıldığında hastalarda iyileşme gözlemlendiğinden hastalar hekimlerine beslenme şekilleri açısından danışmalıdırlar (Sarıkaya 2004).

HIV için yapılan yeni araştırmalar sonucu bulunan ajanlar ile enfeksiyona bağlı semptomların gerilediği tespit edilmiş, yüksek aktiviteli antiretroviral tedavi (HAART) ile bağırsakta *Cryptosporium* spp.'nin azaldığı görülmüştür (Clark 1999).

2.10. Korunma

Cryptosporidium ookistleri dış çeperi ile dış ortamda canlılığını uzun bir süre koruyabilmektedir. Çevreye saçılan bu ookistler infektif özellikte olup konağa yerleşebilmektedirler (Fayer and Xiao 2007).

Besinlerin üretimi, taşınması ve satışında görevli kişilerdeki asemptomatik taşıyıcılık toplum sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır (Kurtoğlu ve ark. 2007). Bu hastalığa yol açan ookistin enfektif dozu düşük olduğundan asemptomatik taşıyıcıların tespit edilmesi hastalığın kontrol altına alınmasında son derece önemlidir (Putignani and Menichella 2010, Almeida, Pozio and Cacciò 2010). Bu sebeple gıda sektörü işçilerinin 6 ayda bir fekal oral bulaş etkenleri açısından taranması gerekmektedir (Almeida ve ark. 2010).

Gelişmiş ülkelerde, çiftlik ve yaban hayvanlarının yetiştirilmesi, toprak ve su dekontaminasyonu, gübre ve atık kontrolü, biyogüvenlik önlemleri, personel sağlığı gibi konuları baz alan bir protokol uygulanmaktadır (Ryan ve ark. 2018). Besinlerin ookist ile temasının önüne geçilmesi gıda kaynaklı cryptosporidiosis vaka sayısında düşüş ile sonuçlanır. Besinlerin işlenmesi esnasında kullanılan hijyen uygulamaları ile ookist eliminasyonu sağlanır (Çetinkaya 2004).

Özellikle pişirilmeden yenen besinlerin dışkı ile bulaşının önlenmesi, bulaşın gerçekleşmiş olduğu besinlerin iyice yıkanması, beslenme öncesi el hijyeni ve yiyeceklerin titizlikle pişirilmesi korunmadaki başlıca unsurlardır (Thompson ve ark. 2005; Özcel ve ark. 2007).

Bu parazitin kontrol altına alınması için filtreleme ve dezenfekte etme işlemleri beraber uygulanmalıdır. Ookist eliminasyonu için klorlama tekniği tek başına kullanıldığında direnç görülmüştür. Ookist filtrelemesi yapıldıktan sonra atıkların dekontaminasyonunu sağlayan geri yıkama işlemi yapılmalıdır (Fayer and Xiao 2007).

Yapılan bir çalışmada 2 ppm klor 120 dak.'da *C. parvum* ookistlerinin (2x10⁴ ookist/ml) %49,04'ünü; 5 ppm klorin dioksit 90 dak.'da ookistlerin %90,56'sını, 0,24 mg/l ozon ise %100'ünü inaktive etmiştir (Pereira ve ark. 2008). Ayrıca UV ışınlarına sudaki ookistlerin duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Başka bir araştırma UV ışınlarının (250-275 nm) *C. parvum*'un ookistlerinde yaklaşık 2 log'luk düşüşe neden olduğunu raporlamıştır (Linden, Shin and Sobsey 2001).

Şehir sularına dezenfeksiyon ve filtreleme işleminin uygulanması, yüzme havuz sularının ookist ile kontamine olmasının engellenmesi, besinlere yüksek ısı verilmesi, pastörizasyonun yapılması ve temizlik kurallarına uyulması bu parazitin yayılmasının önüne geçilmesinde önemli unsurlardır (Şahin ve ark. 2018).

Bu sebeple dışkı teması sonrası (tuvalet, bebek bezi değişimi vs) ellerin sabunlu su ile yıkanması, sığır gibi hayvanlara temas edilirken eldiven kullanılması, onay verilmiş şişe sularının tercih edilmesi, eğer çeşme suyu içilecekse en az 1 dk kaynatılması bulaşı en aza indirir. Çeşme suyu içilecekse koagulant yada filtre kullanılmalıdır (Sarıkaya 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul ve Proje Desteği Bilgileri

Hazırlanan bu tez 15.04.2022 tarihinde 2022/37555 karar numarası ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığınca değerlendirilip onaylandı. Proje numarası 221518022 olan bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklendi.

3.2. Hasta Populasyonunun Belirlenmesi

Çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesinde transplantasyon sonrası immünsupresif tedavi gören, malign solid tümörü olan yada hematolojik malignitesi nedeniyle kemoterapi alan, hematolojik malignitesi nedeniyle bağışıklığı baskılanan, kortikosteroid tedavisi gören yada immün yetmezlik tanılı olup aynı zamanda ishal şikayeti tarifleyen 90 hasta alındı. Çalışmaya alınan hastalar hematoloji, onkoloji, immünoloji, organ ve doku nakli merkezi, çocuk hematoloji-onkoloji ve gastroenteroloji kliniklerinde takip edilmekteydi. Bu hastalara ait klinik ve demografik verilerin elde edilmesinde laboratuvar bilgi sisteminden faydalanıldı.

Araştırmaya 2021-2022 yılları arasında 31’ü çocuk olan toplam 90 hasta dahil edildi. İmmünsupresif 90 ishalleri hastada *Cryptosporidium* spp. sıklığı araştırıldı. Ayrıca direkt mikroskopik bakı ya da boyalı (modifiye aside dirençli boyama) mikroskopik bakı sırasında tespit edilen parazitler etkenler not edildi.

3.3. Laboratuvar Çalışma Basamakları

Laboratuvarımıza ulaştırılan dışkı örnekleri öncelikle makroskopik ve direkt mikroskopik inceleme ile araştırıldı. Örnekler dışkı konsantrasyonu amacıyla basit çöktürme tekniği uygulandı. Konsantrasyon sonrası boyalı mikroskopik inceleme amacıyla dışkı örneklerinden yayma preparat hazırlanarak modifiye aside dirençli Ziehl-Neelsen boyama yapıldı. Kalan örnekler herhangi bir koruyucu solüsyon ilave edilmeden ELISA, DFA ve moleküler çalışmalar için üçe ayrılarak 1.5 ml’lik eppendorf tüplerine paylaştırıldı. Çalışılacak örnekler -80 °C’de saklanmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

3.4. Mikroskopik İnceleme

Dışkı transfer kaplarında laboratuvara ulaştırılan örnekler makroskopik olarak değerlendirmeye alındı. Dışkının şekli, kan ve mukus içeriği not edildi. Daha sonra serum fizyolojik damlatılarak lam-lamel arası preparat hazırlandı ve x10 daha sonra x40 objektif ile incelendi. Boyalı mikroskopik inceleme öncesi, dışkı konsantrasyonu amacıyla basit çöktürme tekniği uygulandı. Dışkı numunesine bir damla serum fizyolojik eklenerek homojenizasyon sağlandı. Ardından numuneye bir miktar daha serum fizyolojik ilave edildi ve yarım saat bekletildi. Bekleyen numunenin üzerindeki sıvı döküldü yine serum fizyolojik ilave edildi ve dışkı haricindeki materyallerden ayırmak amacıyla çift katlı gazlı bez kullanılarak yeni bir kaba aktarıldı. Aktarılan bu numune santrifüj tüpüne konuldu ve 2000 devirde 1-2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki berrak kısım uzaklaştırılıp çöktürme lam-lamel arası preparat hazırlanarak incelendi. Taze dışkı numunesinden ve konsantrasyon sonrası oluşan örnekten hazırlanan yaymalara modifiye aside dirençli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama işlemi uygulandı.

Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama işlemi

1) Konsantrasyon sonrası dışkı örneği lam üzerine yayıldı ve kurutuldu. Kuruyan örnek 3-4 kez alevden geçirilerek fikse edildi. Hazırlanan preparatlar karbolfuksin içeren şale içerisine alınıp 5 dakika bekletildi.

2) Lamlar 5 dakika boyunca alev yardımıyla alttan ısıtıldı. Kaynamasına izin verilmedi.

3) Boyanın fazlası dökülüp çeşme suyu ile yıkandı.

4) Daha sonra % 5'lik sülfirik asit ile 30-60 saniye dekolazasyon yapıp çeşme suyu ile yıkandı.

5) Preparatlar loefflerin metilen mavisi ile dolu şale içerisine aktarılıp 1 dk boyunca karşıt boyama ile boyandı ve çeşme suyu ile yıkandıktan sonra kurutuldu.

6) Mikroskopik inceleme sırasında bir damla immersiyon yağı damlatılarak x100'lük büyütmede inceleme gerçekleştirildi. Pozitif örneklerin *Cryptosporidium* ookistleri 4-6 µm boyutlarında mavi bir zemin üzerinde pembe veya kırmızı olarak görüldü. Mikrovida hareketi ile bu kistlerin içinde küçük siyah granüller tespit edildi. Boyutu 8-10 µm olan yuvarlak kırmızı ya da pembe görünümde *Cyclospora* ookistleri şeklinde tanımlandı. Mavi- yeşil renkte ve ookistlerden daha büyük görünümde ise mantar

olarak raporlandı. Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyalı tüm saha iki kez tarandı ve *Cryptosporidium* oookistleri tespit edilemediyse negatif olarak değęerlendirildi.

3.5. ELISA Yöntemi

İshal şikayeti olan immünsupresif hastalardan alınan –80°C’de saklanan dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle *C. parvum* ve *C.hominis* antijenleri arandı. Bu tez çalışmasında *Cryptosporidium* (RIDASCREENR, C 1201 r-biopharm) kiti üretici firmanın önerileri dikkate alınarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. ELISA kiti

3.5.1. Kit İçeriğinde Bulunan Reaktifler

1. Her birinde 8 kuyucuğın yer aldığı 12 adet mikroyeylet strip (her bir kuyucuğın yüzeyinde *Cryptosporidium parvum/hominis*’e karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlar bulunmaktadır.

2. Diluent (100 ml, %0.1 Kathon bulunur)

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

4. Pozitif kontrol (1.8 ml, dışkıdan hazırlanan inaktif *Cryptosporidium* antijeni, %0.01 Thimerosal bulunur)

5. Negatif kontrol (2 ml)

6. Konjugat-1 (10 ml, biotin ile konjuge *Cryptosporidium* antijenine karşı hazırlanan antikor, %0.1 Kathon bulunur)

7. Konjugat-2 (10 ml, Streptavidin poli-peroksidaz ile konjuge *Cryptosporidium* antijenine karşı hazırlanan antikor, %0.1 Kathon bulunur)

8. Substrat (10 ml, Üre peroxide-tetrametilbenzidine (TMB))

9. Stop solusyonu (6 ml, 1 N sülfürik asit)

3.5.2. Numunelerin Hazırlanması

Reaktiflerin, pleytin ve -80°C’de saklanan dışkı örneklerinin oda sıcaklığına (25 °C) getirilmesi sağlandı. Wash buffer ile deiyonize su 1\9 oranında karıştırıldı ve yıkama solüsyonu oluşturuldu. Her bir örnek için numara verilmiş eppendorf tüplerine 1ml diluent konuldu. Bu tüplere çalışılacak dışkı nörneklerinden 100 µl eklendi. Vorteks ile dışkı örneklerinin ve diluentin bulunduğu tüpler homojenize edildi. Büyük dışkı partiküllerinin çökmesi için süspansiyon kısa bir süre bekletildi ve berraklaşan süpernatant doğrudan testte kullanıldı. Süpernatantın partikül içermemesine dikkat edildi. Partikül görülen dışkı örnekleri 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi.

3.5.3. Testin Çalışılması

1. Pleytin ilk kuyucuğuna (pozitif kontrol kuyucuğu) pozitif kontrol solüsyonundan 100 µl, ikinci kuyucuğuna (negatif kontrol kuyucuğu) negatif kontrol solüsyonundan 100 µl ve hasta numunelerine ait kuyucukların her birine, hazırlanan dışkı numunelerinin süpernatantından 100 µl konuldu.

2. Pleytin bütün kuyucuklarına 100 µl, biotinle konjuge antikor (konjugat-1) ilave edilip homojenize edildi ve 25 °C ‘de 30 dk bekletildi.

3. Bu içerik hipoklorid bulunan atık kabına döküldü. Daha sonra, kalan nemi çıkarmak için plaka, emici kağıt üzerine vuruldu. Ardından kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

4. Pleytin bütün kuyucuklarına 100 µl, streptavidin poli-peroksidaz ile konjuge antikor (konjugat-2) ilave edilip homojenize edildi ve 25 °C’de 15 dk inkübe edildi.

5. Bu içerik hipoklorid bulunan atık kabına döküldü. Daha sonra, kalan nemi çıkarmak için plaka, emici kağıt üzerine vuruldu. Ardından kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

6. Tüm kuyucuklara 100 µl substrat ilave edildi 25 °C karanlık ortamda ve 15 dakika olmak üzere üçüncü kez inkübe edildi.

7. Daha sonra tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

8. Kuyucuklarda meydana gelen renk değişimi 450 nm (nanometre) dalga boyunda fotometrik yaklaşımla ölçüm yapan cihazda değerlendirildi. Firmanın önerileri dikkate alınarak sonuçlar raporlandı.

3.5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Pozitif Kontrol: Sarı renk içermeli. Optik dansitesi için $(OD) \geq 0.800$ (450 nm de) gereklidir.

Negatif kontrol: Renk içermez ve optik dansitesi için $(OD) \leq 0.200$ (450nm de) gereklidir.

$$\text{Cut off} = \text{Negatif kontrol} + 0.15$$

Numunenin pozitifliğinde renk değişimi tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmada kullandığımız ELISA plate okuyucu ve otomatik yıkama cihazı

3.6. Direkt Floresan Antikor (DFA) Yöntemi

Bu araştırmada Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* (Amerika) kiti kullanıldı, araştırma firmanın önerileri dikkate alınarak değeriendirildi.

3.6.1. Test Hazırlık Aşaması

Kullanılacak reaktifler ve dışkı örnekleri 25 °C oda sıcaklığına getirildi. Konsantre wash buffer yıkama solüsyonunun %5'ini oluşturacak şekilde solüsyon hazırlığı yapıldı. Çalışmamızda 2.5 mL konsantre wash buffer ve 47.5 mL deiyonize su kullanıldı. Hazırlanan bu solüsyon kullanım zamanına kadar oda sıcaklığında bekletildi.

3.6.2. Test Prosedürü

1. Oda ısısına getirilmiş dışkı numunelerinden transfer loop kullanılarak 1 damla dışkı numunesi mikroskop lamının kuyucuklarına damlatıldı. Tüm kuyucuk boyunca numune yayıldı. Slayt yüzeyinin çizilmemesine dikkat edildi. Yayma oda sıcaklığında kurutuldu.

2. Hem negatif hem pozitif kontrol aynı şekilde kuyucuklara damlatıldı ve 30 dk kurumaya bırakıldı.

3. Daha sonra her bir kuyucuğa 1 damla Detection Reagent (*Giardia* kist ve/veya *Cryptosporidium* ookistlerine özđü FITC konuldu.

4. Her kuyucuğa 1 damla Counterstain (Eriochrome solüsyonu) ilave edildi ve homojenize edildi.

5. Tahta bir çubuk yardımıyla reaktifler karıştırıldı ve tüm kuyucuğun yüzeyine yayılması sağlandı.

6. Slayt nemli ve güneş ışınlarını geçirmeyen bir kutu içinde oda sıcaklığında otuz dakika bekletildi.

7. Lam hazırlanan yıkama solüsyonu ile dekolorize olana kadar yıkandı. Durulama sırasında firma önerilerince lam yıkama solüsyonuna batırılmadı. Numunenin dejenere olmaması ve kontaminasyona yol açılmaması amacıyla durulama işlemi dikkatle tamamlandı.

8. Slayt nemi alan bir peçete üzerinde kurumaya bırakıldı.

9. Slaytta yer alan kuyucuklara 1-2 damla mounting medium eklenip üzerine lamel kapatıldı.

10. Lam floresan mikroskopta x40 ve x100 büyütme yapılarak tarandı. Koyu renkteki arka plan üzerinde *Cryptosporidium* ookistleri /*Giardia* kistleri parlak ve yeşil renkte floresan ışımaya yapan yapılar şeklinde tespit edildi. Bu görüntüler pozitif olarak raporlandı.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan DFA kiti ve kullanılan IFA mikroskobu

3.7. Moleküler Tanı Uygulaması

Dışkı numunelerinin DNA ekstraksiyonu amacıyla QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı ve üretici firma önerileri dikkate alınarak çalışma gerçekleştirildi. Daha sonra ekstraksiyonu sağlanan örneklerden in-house gerçek zamanlı PZR çalışması Roche gerçek zamanlı PZR (Roche, İsviçre 2004) cihazında yapıldı.

3.7.1 DNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon kit içeriği

- QIAamp DNA mini Stool column
- InhibitEX Buffer
- Proteinaz K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer ATE



Şekil 3.4. QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya)

Ekstraksiyon Prosedürü

1. 180-220 mg dışkı örnekleri 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Sıvı formda olan dışkı örneklerinden ise 200 µl konuldu.
2. Her bir dışkı örneğine 1 ml InhibitEX Buffer eklendi. Bir dakika boyunca ya da dışkı örneği iyice homojenize olana kadar vorteks uygulandı.

3. Oluşan süspansiyon 70°C’de 5 dakika ısıtıldı. Parçalanması zor olan dışkı numuneleri için sıcaklık 95°C’ye yükseltildi.
4. Isıtıcıdan alınan örnekler 15 saniye vortekslendi ve bir dakika santrifüj edildi.
5. Yeni bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne 15 µl Proteinaz K pipetlendi.
6. Santrifüj edilen örneklerden 200 µl süpernatant alınarak 2 ml’lik Proteinaz K içeren santrifüj tüplerine eklendi.
7. Bu tüplerin içine 200 µl Buffer AL eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
8. 70°C’de 10 dakika inkübe edildi.
9. 70°C’den alınan tüplere 200 µl etanol (%96-100) ilave edildi ve vortekslendi.
10. 600 µl’lik lizat, membran içeren QIAamp spin columna aktarıldı. Spin column kapakları kapatılarak bir dakika santrifüj edildi.
11. Daha sonra filtrat içeren tüpler atıldı ve QIAamp spin column, 2ml’lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
12. QIAamp spin column dikkatle açıldı ve 500’er µl Tampon AW1 eklendi ve spin column kapakları kapatılarak bir dakika santrifüj edildi.
13. Daha sonra filtrat içeren tüpler atıldı ve QIAamp spin column, 2ml’lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
14. QIAamp spin column dikkatle açıldı ve 500’er µl Tampon AW2 eklendi ve spin column kapakları kapatılarak üç dakika santrifüj edildi.
15. Santrifüj sonrası spin column yeni 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi. Üç dakika santrifüj edildi.
16. Spin column yeni 1,5 ml’lik santrifüj tüplerine konuldu ve 200’er µl Tampon ATE eklendi.
17. Oda sıcaklığında bir dakika inkübe edildi. Daha sonra bir dakika santrifüj edildi. Elde edilen izolatlar -20°C’de saklandı.



Şekil 3.5. Santrifüj cihazı



Şekil 3.6. Thermo Çalkalayıcı

3.7.2. *Cryptosporidium* İçin In House Gerçek Zamanlı PZR Uygulaması

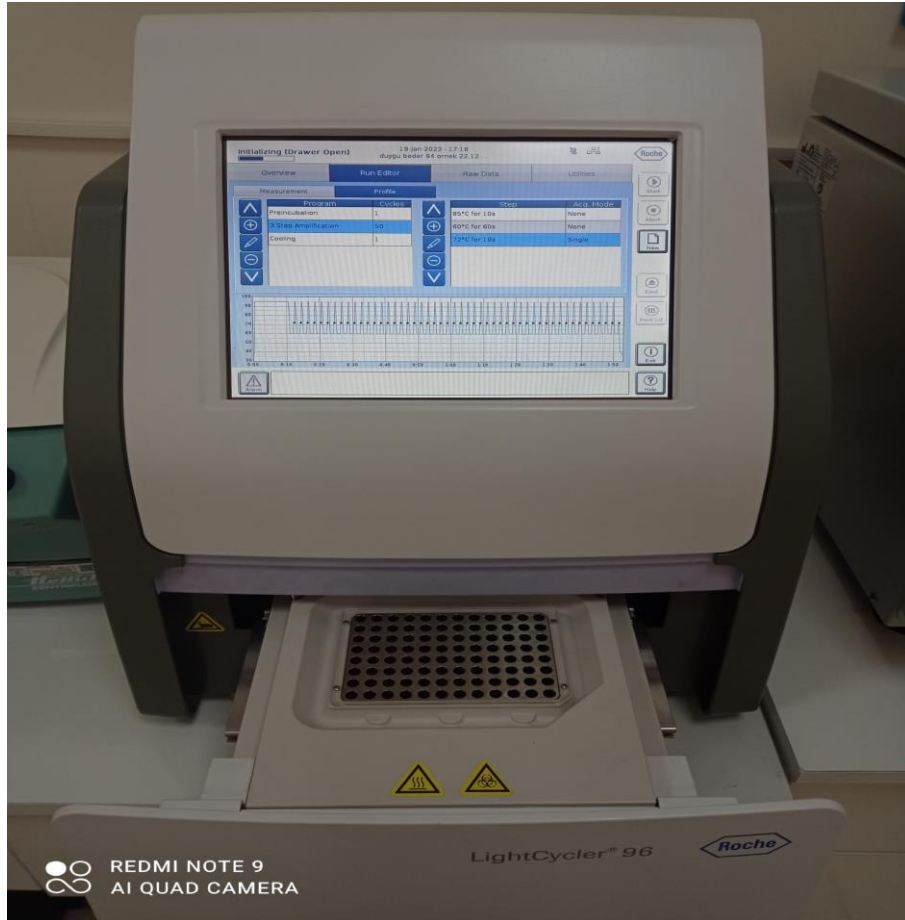
Cryptosporidium için Hadfield ve ark. 2011'in PZR çalışmasında tanımlanan prob ve primer dizileri kullanılmıştır. Bu diziler aşağıda gösterilmektedir.

Forward 5'-GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGG -3'

Reverse 5'-CTGCTTTAAGCACTCTAATTTTCTCAAAG -3'

Probe 5' TACGAGCTTTTAACTGCAACAA-3'

Gerçek zamanlı PZR çalışmasında ilk adımda mix hazırlandı. Mix içeriğinin toplam hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlandı. Mix içeriğinde 0.5 µl F-primer, 0.5 µl R-primer, 0.5 µl prob, 10 µl Master, 3.5 µl ddH₂O (RNAase/DNAase free) ve 5 µl Template DNA bulunmaktadır. Ardından izole edilen örnekler Roche gerçek zamanlı PZR (Roche, İsviçre 2004) cihazına konuldu. Gerçek zamanlı PZR cihazında 94°C'de 15 dakikada ön denatürasyon fazı sonrasında 50 döngü şeklinde 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 60 saniye, 72°C'de 10 saniye şeklinde ayarlanarak amplifikasyon gerçekleştirildi.



Şekil 3.7. Gerçek zamanlı PZR cihazı (Roche, İsviçre 2004)

3.7.3. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sağlıklı bir PZR değerlendirmesi için birtakım kriterler bulunmaktadır. Pozitif kontrolün green kanalda threshold çizgisini kesmesi ve sigmoid bir eğriye sahip olması gerekmektedir. Pozitif örneklerin green kanaldaki grafiğinin threshold çizgisini kesmesi ve pozitif kontrol eğrisiyle paralellik göstermesi gerekmektedir. Kontaminasyonun olmadığından emin olmak için ise negatif kontrolün PZR eğrisinin, green kanalda threshold çizgisini kesmemiş olması (pozitiflik sınırının altında kalması) gerekmektedir. Ayrıca internal kontrolün eğrisinin pozitif olması (yellow kanalda yer alan grafiğin threshold çizgisini kesmesi) gerekmektedir.

3.8. Verilerin Analizi

Çalışma kapsamında istatistik analizler için IBM SPSS Statistics (Versiyon 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılmıştır. Kategorik veriler, sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Katılımcıların cinsiyetlerine ve yaşlarına göre tanı testlerinin değerlendirmelerinin karşılaştırmasında ki-kare testinden yararlanılmıştır. Araştırmada istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

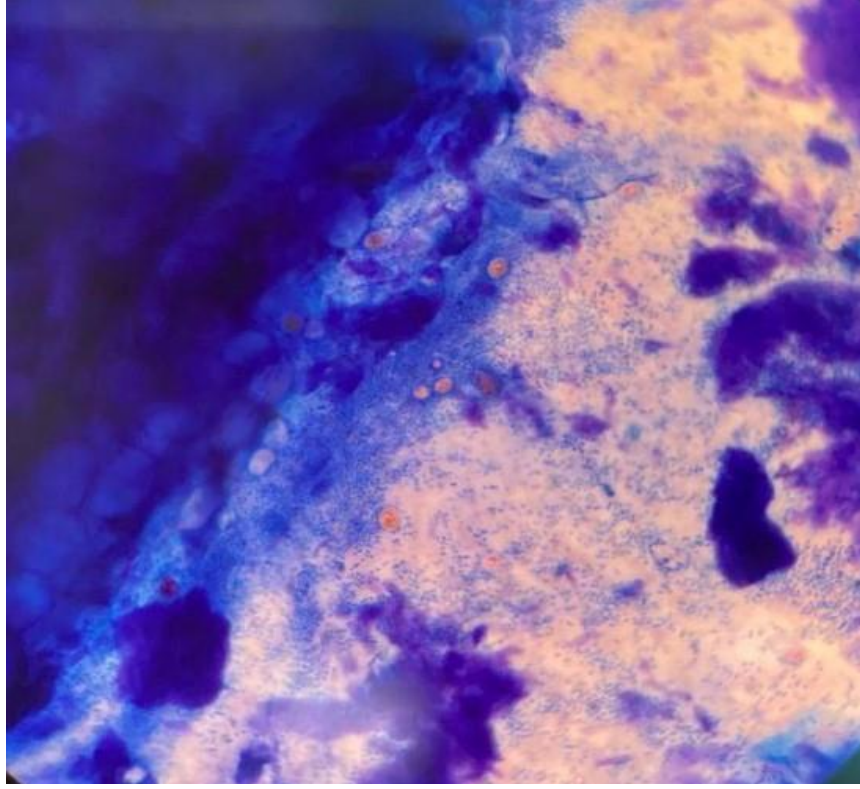
4. BULGULAR

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran immünsupresif 90 hasta üzerinde yapılmıştır. Gelen tüm dışkı örnekleri mikroskopi, ELISA ve PZR ile incelemeye alınmıştır. Bu çalışmalarda pozitif bulunan örneklerin yer aldığı 51 hasta DFA testi ile araştırılmıştır. Tüm bu değerlendirmeler sonucunda herhangi biriyle pozitif saptanan örnekler immünokromatografik kart test ile değerlendirilmiştir. Araştırmamızda 90 dışkı örneğinin 5'inde modifiye aside dirençli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. ookistleri görülmüştür. Serolojik tanı tekniklerinden ELISA yöntemi ile 90 dışkı örneğinde 1, PZR tekniği ile ise 2 örnekte pozitiflik tespit edilmiştir. DFA tanı yöntemi ile bu pozitif örneklerin yer aldığı 51 hasta örneği değerlendirmeye alınmış ve 6 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda herhangi bir tanı testinde pozitif saptanan 7 örneğe immünokromatografik kart test uygulanmış ve 4 örnek pozitif bulunmuştur. Ayrıca mikroskopik değerlendirmede görülen diğer parazitler etkenler kaydedilmiştir (Tablo 4.1).

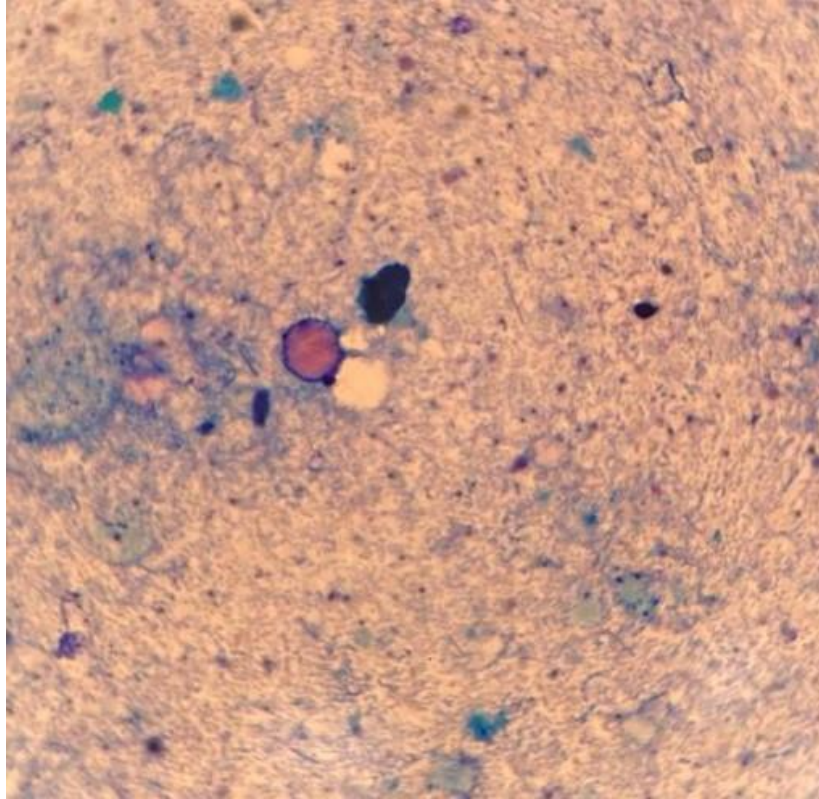
Tablo 4.1. Dışkı numunelerinde mikroskopik inceleme ile saptanan diğer parazitler

Saptanan Diğer Paraziter Etkenler	Sayı	Yüzde (%)
<i>Giardia intestinalis</i>	2	2.2
<i>Blastocystis hominis</i>	26	28.8
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1	1.1

Aside dirençli modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile yapılan mikroskopik incelemede 5 numunede *Cryptosporidium* spp. ookistleri, 1 numunede *C.cayetanensis* ookistleri saptanmıştır. Ayrıca 2 numunede *G.intestinalis* trofozoitleri görülmüştür.

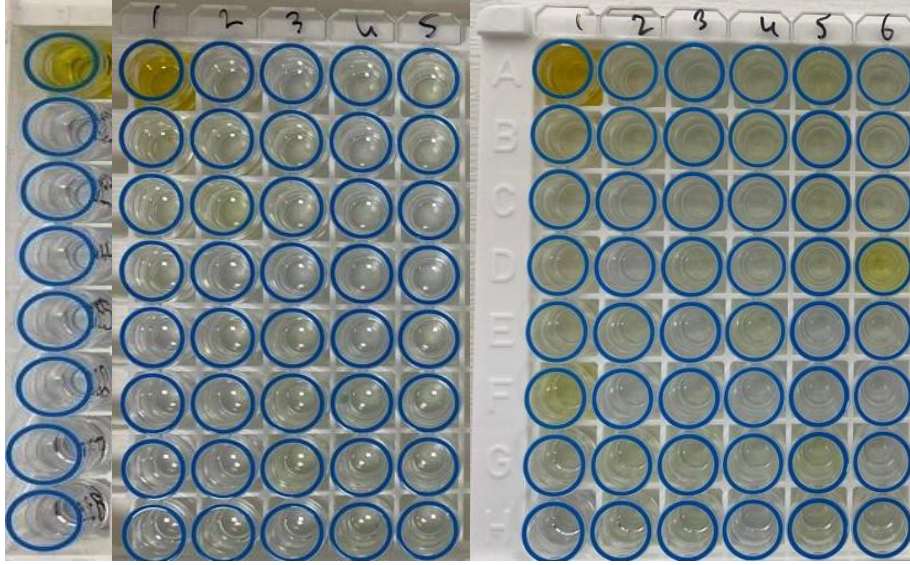


Şekil 4.1. Modifiye aside dirençli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile yapılan incelemede *Cryptosporidium* spp. ookistleri

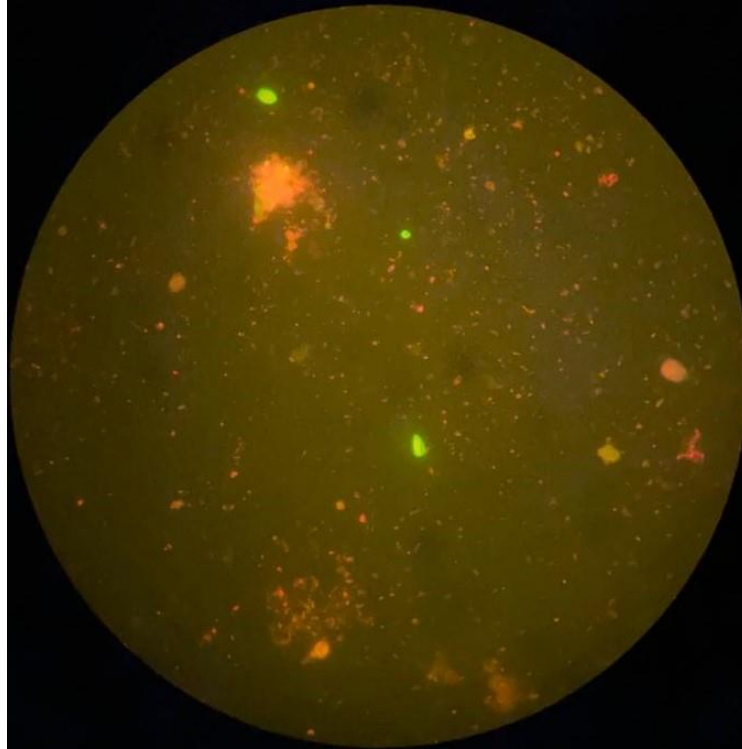


Şekil 4.2. Modifiye aside dirençli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile yapılan incelemede *Cyclospora cayetanensis* ookisti.

ELISA yöntemi ile 1 numunede *Cryptosporidium* pozitifliği saptanmıştır.

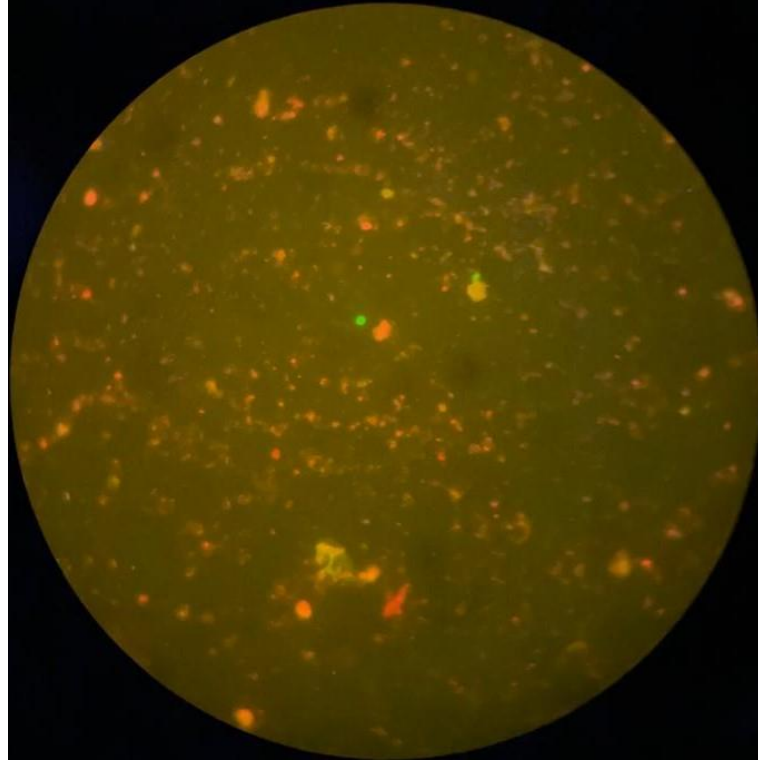


Şekil 4.3. ELISA mikroyerleşimlerdeki pozitif ve negatif kuyucukların ve pozitif örneğe ait kuyucuğun görünümü. (Çalışma 3 fazda gerçekleştirilmiştir)



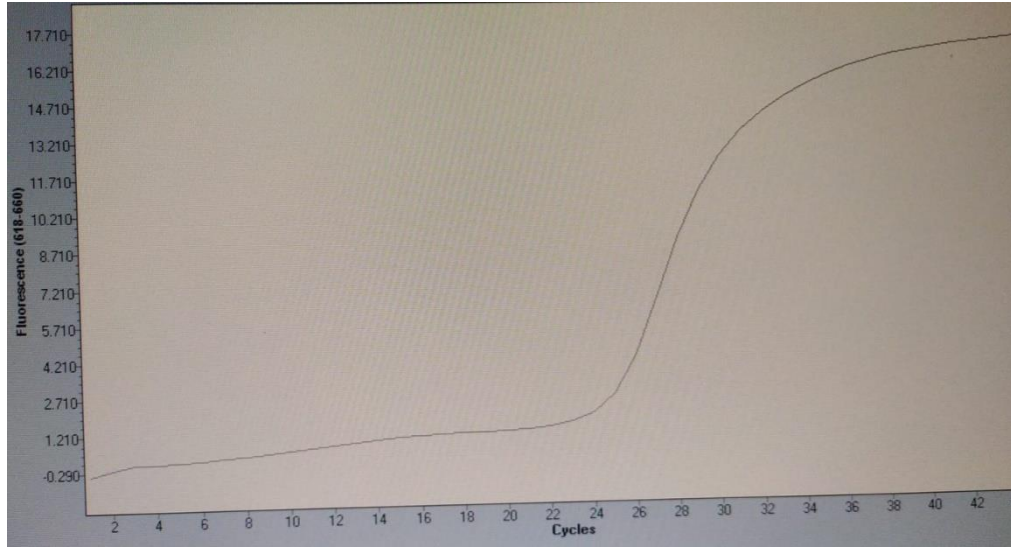
Şekil 4.4. DFA ile pozitif kontrolde görülen *Cryptosporidium* spp. ookisti ve *G.intestinalis* kistleri

DFA yöntemi ile 6 numunede *Cryptosporidium* pozitifliği, 3 numunede *G. intestinalis* pozitifliği saptanmıştır.



Şekil 4.5. DFA ile yapılan incelemede *Cryptosporidium* spp. oocisti

PZR yöntemi ile 2 numunede *Cryptosporidium* pozitifliği saptanmıştır.



Şekil 4.6. In house gerçek zamanlı PZR'da *Cryptosporidium* spp. pozitif örneğin amplifikasyon eğrisi.

Çalışmaya alınan 90 örneğin 44 (%48,8)'ü erkek, 46 (%51,2)'sı kadın hastalara aittir. Hastaların yaşları 0 ile 81 yaş aralığında olup, yaş ortalaması 37,8 (standart sapma: $\pm 27,5$) olarak bulundu. Hastaların 31 (%34,4)'ini çocuk hastalar oluşturdu. Çocuk hastaların 18 (%58)'i erkek, 13 (%42)'ü kızdır. Çocuk hastaların yaş ortalaması 5,3 (standart sapma: $\pm 4,34$)'dür. Çalışmadaki 59 yetişkin hastanın 26 (%44)'sı erkek, 33 (%56)'ü kadındır.

Tablo 4.2. Hastaların cinsiyet-yaş karşılaştırması

			CİNSİYET		
			Erkek	Kız	Toplam
Yaş	Çocuk	N	18	13	31
		%	58,1%	41,9%	100,0%
	Yetişkin	N	26	33	59
		%	44,1%	55,9%	100,0%
	Toplam	N	44	46	90
		%	48,9%	51,1%	100,0%

Araştırmaya katılan hastaların %54,4'ü malign solid tümör %14,4'ü lenfoma, %11,1'i primer immün yetmezlik, % 8,8'si multipl myelom %7,7'si lösemi tanısına sahiptir.

Tablo 4.3. Hastaların tanılarına göre dağılımı ve oranları

TANI	f	%
Malign Solid Tümör	49	54,4
Lenfoma	13	14,4
Primer İmmün Yetmezlik	10	11,1
Multipl Myelom	8	8,8
Lösemi	7	7,7
İmmün Trombositopenik Purpura	1	1,1
Aplastik Anemi	1	1,1
Organ nakli	1	1,1
Total	90	100,0

Çalışma kapsamında değerlendirmeye alınan 90 hastanın tedavi gördüğü klinikler **Tablo 4.4'**de sunulmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre; hastaların %30'u çocuk hematoloji-onkoloji haricindeki diğer çocuk sağlığı ve hastalıkları klinikleri, %18,9'u tıbbi onkoloji, %13,3'ü hematoloji, %12,2'si gastroenteroloji, %7,7'si çocuk hemotoloji-onkoloji kliniğinde tedavi görmektedir.

Tablo 4.4. Hastaların kliniklere göre dağılımı ve oranları

	f	%
Çocuk	27	30,0
Tıbbi Onkoloji	17	18,9
Hematoloji	12	13,3
Gastroenteroloji	11	12,2
Çocuk Hematoloji-Onkoloji	7	7,7
Genel Dahiliye	4	4,4
İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları	4	4,4
Radyasyon Onkolojisi	3	3,3
Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi	2	2,2
Nefroloji	1	1,1
Organ ve Doku Nakli Merkezi	1	1,1
Göğüs Hastalıkları	1	1,1
Total	90	100,0

Mikroskopik inceleme ile elde edilen pozitif sonuçlar yaşa göre incelendiğinde; 18 yaş altı grupta (çocuk) %9,7 oranında pozitiflik saptanırken, 18 yaş üzeri grupta (yetişkin) %3,4 oranında pozitiflik saptanmıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların yaşlarına göre dışkı örnekleri arasında mikroskopik tanı yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.5. Mikroskopik tanı yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

		Mikroskopi			x ²	p	
		Negatif	Pozitif	Toplam			
Yaş	Çocuk	n	28	3	31	1,531	0,236
		%	%90,3	%9,7	%100,0		
	Yetişkin	n	%57	2	59		
		%	%96,6	%3,4	%100,0		
	Toplam	n	85	5	90		
		%	%94,4	%5,6	%100,0		

Mikroskopik tanı yöntemi sonucu elde edilen sonuçlar cinsiyete göre incelendiğinde; erkek hastalarda %6,8 oranında pozitiflik saptanırken, kadın hastalarda %4,3 oranında pozitiflik saptanmıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların

cinsiyetlerine göre dışkı örnekleri arasında mikroskopi yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Mikroskobik tanı yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması

		Mikroskopi		Toplam	x²	p
		Negatif	Pozitif			
Cinsiyet	Erkek	n	41	3	44	0,262
		%	%93,2	%6,8	%100,0	
	Kadın	n	44	2	46	
		%	%95,7	%4,3	%100,0	
	Toplam	n	85	5	90	
		%	%94,4	%5,6	%100,0	

PZR yöntemi sonucu elde edilen pozitif sonuçlar yaşa göre incelendiğinde; 18 yaş altı grupta hiç pozitiflik tespit edilmezken, 18 yaş üzeri grupta (yetişkin) %3,4 oranında pozitiflik saptanmıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların yaşlarına göre dışkı örnekleri arasında PZR yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.7. PZR yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

		PZR		Toplam	x²	p
		Negatif	Pozitif			
Yaş	Çocuk	n	31	0	31	1,071
		%	%100,0	%0,0	%100,0	
	Yetişkin	n	57	2	59	
		%	%96,6	%3,4	%100,0	
	Toplam	n	88	2	90	
		%	%97,8	%2,2	%100,0	

PZR yöntemi sonucu elde edilen sonuçlar cinsiyete göre incelendiğinde; erkek hastalarda %4,5 oranında pozitiflik saptanırken, kadın hastalarda hiç pozitiflik saptanmamıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların cinsiyetlerine göre

dışkı örnekleri arasında PZR yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.8. PZR yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması

		PZR		Toplam	x ²	p	
		Negatif	Pozitif				
Cinsiyet	Erkek	n	42	2	44	2,138	0,144
		%	%95,5	%4,5	%100,0		
	Kadın	n	46	0	46		
		%	%100,0	%0,0	%100,0		
	Toplam	n	88	2	90		
		%	%97,8	%2,2	%100,0		

ELISA yöntemi sonucu elde edilen sonuçlar yaşa göre incelendiğinde; 18 yaş altı grupta hiç pozitiflik tespit edilmezken, 18 yaş üzeri grupta (yetişkin) %1,7 oranında pozitiflik saptanmıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların yaşlarına göre dışkı örnekleri arasında ELISA yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.9. ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

		ELISA		Toplam	x ²	p	
		Negatif	Pozitif				
Yaş	Çocuk	n	31	0	31	0,531	0,466
		%	%100,0	%0,0	%100,0		
	Yetişkin	n	58	1	59		
		%	%98,3	%1,7	%100,0		
	Toplam	n	89	1	90		
		%	%98,9	%1,1	%100,0		

ELISA yöntemi sonucu elde edilen sonuçlar cinsiyete göre incelendiğinde; erkek hastalarda %2,3 oranında pozitiflik saptanırken, kadın hastalarda hiç pozitiflik saptanmamıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların cinsiyetlerine göre dışkı örnekleri arasında ELISA yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.10. ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması

		ELISA		Toplam	x ²	p	
		Negatif	Pozitif				
Cinsiyet	Erkek	n	43	1	44	1,057	0,304
		%	%97,7	%2,3	%100,0		
	Kadın	n	46	0	46		
		%	%100,0	%0,0	%100,0		
	Toplam	n	89	1	90		
		%	%98,9	%1,1	%100,0		

DFA doğrulama yöntemi ile 51 hastanın dışkı örneği yeniden incelenmiştir. DFA testi sonucu elde edilen sonuçlar yaşa göre incelendiğinde; 18 yaş altı grupta (çocuk) %16,7 oranında pozitiflik saptanırken, 18 yaş üzeri grupta (yetişkin) %9,1 oranında pozitiflik saptanmıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların yaşlarına göre dışkı örnekleri arasında DFA yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.11. DFA yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

		DFA		Toplam	x ²	p	
		Negatif	Pozitif				
Yaş	Çocuk	n	15	3	18	0,644	0,422
		%	%83,3	%16,7	%100,0		
	Yetişkin	n	30	3	33		
		%	%90,9	%9,1	%100,0		
	Toplam	n	45	6	51		
		%	%88,2	%11,8	%100		

DFA doğrulama yöntemi sonucu elde edilen sonuçlar cinsiyete göre incelendiğinde; erkek hastalarda %20 oranında pozitiflik saptanırken, kadın hastalarda %6,5 oranında pozitiflik saptanmıştır. Yapılan istatistiki test sonucuna göre; katılımcıların cinsiyetlerine

göre dışkı örnekleri arasında DFA doğrulama yöntemine dayalı tanı testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.12. DFA yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitifliğinin cinsiyete göre karşılaştırılması

		DFA		Toplam	x ²	p	
		Negatif	Pozitif				
Cinsiyet	Erkek	n	16	4	20	2,150	0,143
		%	%80,0	%20,0	%100,0		
	Kadın	n	29	2	31		
		%	%93,5	%6,5	%100,0		
	Toplam	n	45	6	51		
		%	%88,2	%11,8	%100,0		

DFA yöntemi baz alınarak mikroskopik tanı yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

Duyarlılık : %83,33

Özgüllük : %100,0

Pozitif prediktif değeri : %100,0

Negatif prediktif değeri : %97,82

Testin doğruluk oranı : %98,03

Tablo 4.13. DFA yöntemi ile elde edilen sonuçların mikroskopik bakı sonuçları ile karşılaştırılması

		Mikroskopi		Toplam
		Negatif	Pozitif	
DFA	Negatif	45	0	45
	Pozitif	1	5	6
		46	5	51

DFA yöntemi baz alınarak PZR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmiştir.

Duyarlılık : %33,3

Özgüllük : %100

Pozitif prediktif değeri : %100

Negatif prediktif değeri : %91,83

Testin doğruluk oranı : %92,15

Tablo 4.14. DFA yöntemi ile elde edilen sonuçların PZR sonuçları ile karşılaştırılması

		PZR		Toplam
		Negatif	Pozitif	
DFA	Negatif	45	0	45
	Pozitif	4	2	6
		49	2	51

DFA yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

Duyarlılık : %0

Özgüllük : %97,77

Pozitif prediktif değeri : %0

Negatif prediktif değeri : %88,0

Testin doğruluk oranı : %86,27

Tablo 4.15. DFA yöntemi ile elde edilen sonuçların ELISA sonuçları ile karşılaştırılması

		ELISA		Toplam
		Negatif	Pozitif	
DFA	Negatif	44	1	45
	Pozitif	6	0	6
		50	1	51

İmmünokromatografik kart test ile diğer tanı testlerinden herhangi biriyle pozitif saptanan 7 hastanın dışkı testi yeniden incelenmiştir. Bu yöntem sonucu 4 örnek pozitif saptanmıştır.

Tablo 4.16. *Cryptosporidium* pozitifliği saptanan hastaların özellikleri

YAŞ	CİNSİYET	TANI	Mikroskopi	PZR	DFA	ELISA	Kart Test
0	E	Lenfoma	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
0	K	ALL	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
7	E	Solid Tümör	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif
54	E	Solid Tümör	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
61	E	Lenfoma	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
67	K	Solid Tümör	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
77	E	Primer İmmün Yetmezlik	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif

5. TARTIŞMA

Cryptosporidium spp. apikompleks şubesinde coccidia grubunda yer alan ve günümüzde insan patojeni olarak bilinen bir protozondur. Enfeksiyöz diareye yol açan etkenler arasında yer alan *Cryptosporidium* spp. en sık jejunum, daha az sıklıkta ise akciğer, safra kesesi ve karaciğer gibi organlara yerleşerek çoğunlukla ileri yaştaki kişilerde yada çocuklarda, immünsupresif hasta grubunda ve malnutrisyonu olan kişilerde mortalite ile seyredabilen fırsatçı bir ajandır (Akalin 2018). Önce immünsupresif hastalarda sulu ishale sebep olması ile dikkat çekmiştir. Daha sonra immünkompetan bireylerde daha selim seyirli gastroenterit tablosuna neden olduğu görülmüştür (Gülay and Şengöz 2006). *Cryptosporidium* nazokomiyal ishale neden olan patojenler içinde üçüncü (%7,2) sırada rapor edilmiştir (Koturoğlu ve ark. 2004).

Cryptosporidiasise ait semptomların diğer gastroenterit semptomlarına benzerlik göstermesi, ishal şikayetiyle başvuran hastaların dışkı örneklerinin *Cryptosporidium* açısından rutin değerlendirmeye alınmaması ve bir çok olguda gelişmiş tanı tekniklerinin uygulanmaması gibi sebepler neticesinde bu etkene ait olgular yeterli düzeyde tespit edilememektedir (Akalin 2018; Khalil ve ark. 2016).

Enfeksiyonun temel bulaş şekli fekal-oral yoldur. Yapılan çalışmalar bulaşa kontamine besinler, kaynak suları ve özellikle içme sularının önemli bir yere sahip olduğunu vurgulamaktadır (Kar 2007). *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin diğer patojenlere göre klora daha dirençli olması ve içme suyu filtrelerinden geçebilmesi, enfektif dozunun düşük olması, parazitin kaynak sularındaki prevalansının yüksek olması, cryptosporidiosisin yayılımını kolaylaştırmakta ve kontamine içme suyu kullanımı su kaynaklı epidemilere neden olmaktadır (Hazer 2007, Leav ve ark. 2003). Su kaynaklı salgınlara araştırıldığı bir çalışmada 1992-2003 tarihleri arasında yaşanan 89 salgının %69'una *Cryptosporidium*'un neden olduğu raporlanmıştır. Bu protozoonun görüldüğü 62 salgının %33,8'ine şehir şebeke suyunun, %9,6'sına ambalajlı içme sularının ve %51,6'sına yüzme havuzlarının yol açtığı belirtilmiştir (Smith ve ark. 2006). Yakın geçmişte İngiltere başta olmak üzere Kanada, Avusturalya ve Avrupa'da da su kaynaklı 39 *Cryptosporidium* salgını rapor edilmiştir (Jex ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda ise hastaların içme suyu olarak şehir şebeke suyu kullanıp kullanmadıkları ve genel hijyen kurallarına uyumları sorgulanamamıştır.

Cryptosporidiosis insidansı iklim şartlarına ve coğrafik konuma göre farklılık göstermektedir. Bu etkenin daha çok ılıman iklim özelliklerinin görüldüğü dönemlerde klinik semptomlara yol açtığı bildirilmiştir. Bu dönemlerde yağış nedeniyle patojenin kaynak ve içme sularına geçme olasılığının arttığı, bazı besinleri daha çok kontamine ettiği bildirilmiş, ülkemizdeki çalışma verilerine göre cryptosporidiosisin Eylül ve Ekim aylarında pik yaptığı rapor edilmiştir (Harp and Goff 1998; Doğan ve ark. 2010) Cryptosporidiasisin (Bern ve ark. 2000) yaptığı araştırmada ılıman iklim şartlarının yaşandığı mevsimlerde, (Dietz and Roberts 2000) yaptığı çalışmada ise Temmuz-Ağustos aylarında daha sık görüldüğü raporlanmıştır. Yaptığımız araştırmada Mart-Ağustos ayları arasında toplanan dışkı örnekleri kullanılmıştır. Numune toplama bir tam yıl boyunca devam etmediğinden mevsimler arasında kıyaslama yapılamamıştır. Bu sebeple iklim şartlarının cryptosporidiasis görülme sıklığı üzerine etkisi konusunda bir yorumda bulunulamamıştır.

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde cinsiyet farkı ile *Cryptosporidium* insidansı arasında ilişki olmadığı görülmüştür (Kar 2007). Yaptığımız bu çalışmada da *Cryptosporidium* saptanmasında cinsiyetin herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* çocukluk yaş grubu ishallerinin önemli sebeplerinden biri olarak bilinmektedir ve parazitin çocuk hastalarda daha çok semptomatik seyrettiği bildirilmektedir (Miman ve Saygı 2018). Bu çalışmada çocuk hastalarda erişkin yaş grubuna göre pozitiflik oranı daha yüksek bulunmuştur ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Parazitin sıklığına dair hasta popülasyonu, iklim şartları gibi birçok değişkene bağlı olarak farklı veriler sunulmaktadır. Yapılan çalışmalarda ishalleri dışkı örneklerine modifiye asit fast boyama yöntemi uygulanmış, Mersin’de (Atambay ve ark. 2003) 500 örnekte %1,6, Van yöresinde (Çiçek and Yılmaz 2011) 450 örnekte %2,2 oranında *Cryptosporidium* spp. pozitifliği bildirmişlerdir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda bu patojene daha sık rastlanıldığı için epidemiyolojik çalışmalar daha çok ishali olan immünsupresif hastalar üzerinde yapılmıştır (Beyhan and Yılmaz 2020). Bu çalışmalar neticesinde birbiri ile büyük farklılıklar gösteren veriler elde edilmiştir. Bu farklılığın, enfeksiyonun evresine, araştırılan hasta popülasyonunun özelliklerine ve sayısına, tanı tekniklerinin duyarlılığına ve yerleşim yerinin iklim şartlarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Başustaoğlu 2009; Brooks ve ark. 2014).

Yapılan bir araştırmada immünsupresif bireylerde *Cryptosporidium* spp. insidansının %1,3 ila %17 arasında değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Sreedharan, Jayshree and Sridhar 1996; Tanyüksel, Gün and Doganci 1995).

Yapılan bir çalışmada (Abaza ve ark. 1995) 427 bağışıklığı baskılanmış ishalleri hastanın %6,3'ü, başka bir araştırmada ise (Sulżyc-Bielicka ve ark. 2012) kolorektal malignitesi bulunan ishalleri 87 hastanın %12,6'sı *Cryptosporidium* spp. pozitif bulunmuştur. Sane ve ark. (Sane, Thakar and Mehendale 2009) diare görülen 137 HIV hastasının %12'sini *Cryptosporidium* spp. açısından pozitif raporlamışlardır. Jayalakshmi ve ark. (Jayalakshmi, Appalaraju and Mahadevan 2008) 84 ishalleri immünsupresif hasta üzerinde yaptıkları çalışmada %12,4 oranında pozitiflik bildirmişlerdir.

Ülkemizde bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonunda *Cryptosporidium* spp. sıklığının araştırıldığı çalışmalarda; Tanyüksel ve ark. (Tanyüksel ve ark. 1995a) malignitesi olan 106 hastanın %16,9'unda, Sarı ve ark. (Sarı, Sarı and Ertuğ 2003) yine kronik böbrek yetmezliği tanılı 47 hastanın %6,4'ünde *Cryptosporidium* spp. pozitifliği raporlamışlardır. Karabey ve ark. (Karabey ve ark. 2021) kemoterapi alan malign solid tümörlü 5 günden uzun süre ishal şikayeti olan 94 immünsupresif hastada %5,3 oranında, Yıldız ve ark. (Yıldız ve ark. 2001) ise yine ishalleri immünsupresif hastaya ait 72 dışkı örneğinde %8,3 oranında *Cryptosporidium* spp. pozitifliği tespit etmişlerdir. Bizim araştırmamızda immünsupresif ishal şikayeti tarifleyen 90 hastanın 7 (%7,8)'sinde kullanılan yöntemlerden en az biri ile *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir.

Cryptosporidiosis tanısı histolojik ve moleküler yöntemler, mikroskopik inceleme, DFA ve ELISA gibi serolojik teknikler ile konabilmektedir (Sears and Kirkpatrick 2001). En sık tercih edilen yöntem ise mikroskopik incelemedir (Morgan ve ark. 1998). Ancak direkt mikroskopik bakılarda *Cryptosporidium* ookistlerinin boyutsal olarak küçük olmaları ve mayalara çok benzemeleri nedeniyle değerlendirilmesi zordur. Aside dirençli boyama sonrasında mikroskopik bakı tanıda asgari yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu tanı yöntemi ucuz olması, ookistlerin iç yapısının değerlendirilmesine imkan vermesi ve kalıcı boyama sayesinde preparatların uzun süre saklanabilmesi sebebiyle kıymetlidir. Fakat değerlendirme için uzun bir zaman ve tecrübe gerekmesi, tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi dezavantajları sebebiyle farklı tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Öte yandan preparatların ciddi teknik tecrübeye sahip kişilerce incelenmesi ile birçok etken mikroorganizma için altın standart olarak kabul gördüğü bilinmektedir (Usluca, Babur and Kilic 2020).

DFA yöntemi, modifiye aside dirençli boyama yöntemine göre *Cryptosporidium* tanısında daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğundan günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir. ABD ve Avrupa'nın referans laboratuvarlarında da altın standart test olarak kullanılmaktadır (Miman ve Saygı 2018). Dışkı örneğinin 1 ml'inde 100 ookistin bulunması DFA tanı testi için yeterlidir. Çünkü yöntemin duyarlılığı birçok çalışmada yaklaşık %100 olarak raporlanmıştır (Clark 1999). Yapılan bir araştırmada ishalleri 100 dışkı numunesinde *Cryptosporidium* spp. aside dirençli boyama ile %1 oranında, DFA tanı yöntemi ile ise %4 oranında pozitif bulunmuştur (Özçelik, Değerli and Yıldırım 2014). Dezavantaj olarak DFA yoğunlaştırma yöntemlerinden ve dışkıdaki diğer materyallerden etkilenebilir (Leng ve ark. 1996). Ayrıca maliyeti fazla ve testin yapılması zahmetlidir. (Carey, Lee and Trevors 2004). Bu verilere dayanarak çalışmamızda DFA altın standart olarak kabul edilmiş ve diğer testler DFA baz alınarak karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada DFA baz alındığında modifiye aside dirençli EZN boyama yönteminin duyarlılığı %83,33, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. DFA testlerinin maliyetlerinin yüksek olması rutin laboratuvarlarda kullanımını sınırlayan en önemli sorundur. Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan modifiye EZN boyama, daha maliyet etkin bir yöntem olarak, deneyimli laboratuvarlarda özellikle immünsupresif ve çocuk hastalar gibi hassas gruplarda kullanılabilir.

Formalin ile fiksasyon sağlanan yada stoklama koşullarına dikkat edilmeyen numunelerde DFA ve ELISA gibi tanı yöntemleri ön plana çıkmaktadır (Gasser and O'Donoghue 1999). Fakat ELISA yönteminde etkinlik ticari kite göre değişkenlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada PZR'ın ELISA yöntemine kıyasla 10^3 - 10^4 kat daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Leng, Mosier and Oberst 1996). Ayrıca başta apikompleksan parazitler olmak üzere birçok patojende bulunan ortak antijenlere karşı oluşan çapraz etkileşimler neticesinde yalancı pozitif sonuçlar görülebilmektedir (Beyhan and Yılmaz 2020). Bu yöntemin bir başka dezavantajı ise pahalı bir tanı yöntemi olup numunelerin biriktirilerek çalışılması gerekmektedir (Karabey ve ark. 2021). Çalışmamızda ELISA ile yalnızca bir hastada pozitiflik saptanmış ve bu pozitiflik diğer tanı yöntemleriyle doğrulanamamıştır.

Tamer ve ark'ları sindirim sistemi yakınmaları ile başvuran 80 dışkı örneğini değerlendirmişler ve asit fast boyama yöntemi ile üç örnekte (%3,75), ELISA serolojik testi ile ise beş örnekte (%6,25) *Cryptosporidium* spp. pozitifliği tespit etmişlerdir. Asit fast boyama ile pozitif saptanan üç numune ELISA tekniği ile de pozitif bulunmuştur

(Tamer and Gülenç 2008). Yine aynı yakınmalarla başvuran hasta popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada ELISA yöntemi ile 723 dışkı örneğinin %2,8'inde *Cryptosporidium* spp. pozitif saptanmıştır (Beyhan and Yılmaz 2020).

Moleküler yöntemler nükleik asit analizini baz alarak genotiplendirme yapabilmesi, hızlı tanı ve birçok numuneyi kolaylıkla değerlendirme imkanı sunması, tedavi aşamasında yol gösterici olması gibi sebeplerle son yıllarda sık tercih edilen yöntemlerdir (Yılmaz 2016). Dışkı numunesinde çok az sayıda ookist bulunduğunda ve bu ookistlerin dışkının tamamına homojen dağılmadığı durumlarda moleküler tekniklerin mikroskopik incelemeye göre daha az sayıda pozitif numuneyi saptadığı raporlanmıştır (Usluca 2009; Magi ve ark. 2006; Amar, Dear and McLauchlin 2004). Dışkıda yer alan polisakkaritler, safra tuzları yada bilirubinler PZR çalışmasını inhibe edebilmektedir (Usluca 2009). DNA izolasyonu öncesinde ookist hasarı meydana geldiyse PZR, *Cryptosporidium* etkenini saptayamayacak ve mikroskopik inceleme verileri ile PZR arasında uyumsuzluk görülecektir (Magi ve ark. 2006; Amar ve ark. 2004). Moleküler tekniklerin rutin tanıda yer almasının ancak bu problemlerin çözülmesi ve belli bir standardizasyonun sağlanması ile mümkün olacağı bildirilmiştir (Usluca 2009; Magi ve ark. 2006).

Moleküler tekniklerin mikroskopik değerlendirmelere göre az sayıda numune ile yapılan çalışmalarda çok daha fazla maliyete yol açtığı bilinmektedir. Ancak çok sayıda numuneye aynı anda uygulanması ile maliyet azaltılabilmektedir. Aside dirençli boyamanın yapılması PZR'a göre daha az zaman gerektirmektedir. Fakat yaymanın değerlendirilmesi tecrübeli bir uzman gerektirirken, PZR'da grafikler kolayca değerlendirilebilmektedir. PZR yüksek spesifivite ve sensitiviteye sahiptir. Ayrıca genotip tayini ile tür ayırımı yapılabilir. Bu sebeple epidemiyolojik çalışmalar adına ümit verici bir tanı metodudur (Morgan ve ark. 1998).

Çalışmamızda yalnızca iki hasta PZR ile pozitif olarak bulunmuş ve DFA testi baz alındığında duyarlılık %33,3, özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır. PZR çalışmasında dışkı örneğindeki inhibitörler yalancı negatifliklere sebep olabileceği gibi, çalışmada primer prob kullanılmasından dolayı optimizasyon ile ilgili sorunların oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Literatürde de PZR'nin mikroskopik değerlendirmeye göre düşük duyarlılıkta kaldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Ülkemizde diare görülen 36 immünsupresif hasta üzerinde yapılan bir çalışmada modifiye aside dirençli boyama ile mikroskopik inceleme, moleküler teknikler ve direkt floresan antikör testi ile *Cryptosporidium* etkeni araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre aside dirençli boyama ile 1, DFA yöntemi ile 3 örnek pozitif bulunmuştur. Kullanılan moleküler teknik ile ise pozitif numune tespit edilememiştir (Ülçay ve ark. 2008). Yapılan başka bir çalışmanın 80 kişilik diare görülen immünsupresif hasta grubunda, mikroskopik inceleme ile 3, ELISA tanı yöntemi ile 5, DFA ile ise 4 pozitif numune bulunmuşken PZR ile pozitiflik saptanılmamıştır (Yılmaz 2016).

Çalışmamızda 90 immünsupresif hastanın dışkı örneklerinde mikroskopik inceleme ile 5, ELISA yöntemi ile 1, PZR ile 2 pozitiflik tespit edilmiştir. ELISA ile tespit edilen pozitif numune dışındaki diğer pozitif numuneler DFA ile de pozitif olarak bulunmuş, toplamda çalışılan 51 örneğin 6 'sında DFA pozitifliği tespit edilmiştir. Yöntemlerden herhangi biri ile pozitif bulunan 7 örnekte immünokromatografik hızlı tanı testi çalışılmış ve 4 örnek hızlı tanı testi ile de pozitif olarak saptanmıştır. Hızlı tanı testlerinin örnek akışı yoğun laboratuvarlarda özellikle kronik ishali olan hassas gruplarda hızlı tanıda faydalı olacağı düşünülmektedir. Çalışmada ayrıca bir hastada fırsatçı bir diğer patojen olan *Cyclospora cayetanensis* ookistleri ve 3 hastada önemli bir ishal etkeni olan *Giardia intestinalis* trofozoitleri saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ishali olan 90 immünsupresif hastanın dışkı örneği *Cryptosporidium* spp. tespiti amacıyla farklı tanı yöntemleri ile incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda modifiye aside dirençli boyama ile %5,5; PZR ile %2,2 ve ELISA ile %1,1 oranında *Cryptosporidium* spp. pozitif bulunmuştur. DFA ile 51 hastanın 6'sında pozitiflik saptanmıştır.

Çalışmamız özellikle ishalleri immünsupresif hastalardan gelen dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. bulunma ihtimalinin göz ardı edilemeyeceğini göstermiştir. İmmünsupresif hasta sayısının günümüzde her geçen gün arttığı da göz önünde bulundurulduğunda, laboratuvarların rutin çalışmalarında özellikle immünsupresif hasta grubu için bu etkenin hızlı ve güvenilir tespiti son derece önemlidir. Bu sebeple immünsupresif hasta takibi fazla olan 2. ve 3. basamak hastanelerde, *Cryptosporidium* spp. tanısına yönelik tanı algoritmaları oluşturulmalıdır.

Cryptosporidium ookistlerinin tespiti amacıyla uygulanan tanı yöntemlerinin birbirlerine üstünlükleri olduğu gibi her birinin kendi içinde dezavantajları da bulunmaktadır. Referans yöntem olan DFA baz alındığında modifiye aside dirençli boyamanın duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir ancak iş gücü ve teknik deneyim gerektirmektedir. Örnek akışı yoğun laboratuvarlarda gelen tüm dışkı örneklerinde modifiye asit fast boyama yapmak ve değerlendirmek mümkün olmayabilir. Ancak riskli hasta gruplarında asgari tanı olarak modifiye aside fast boya ile örneklerin değerlendirilmesi *Cryptosporidium* tanısı için faydalı olacaktır. Ayrıca yine yoğun iş akışı olan laboratuvarlarda immünokromatografik tanı testlerinin, pratik kullanımı ve hızlı sonuç alınması nedeniyle faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abaza, S. M., L. M. Makhlouf, K. El-Shewy & A. El-Moamly** Intestinal opportunistic parasites among different groups of immunocompromised hosts. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 1995; 25, 713-727.
- Adal, K., C. Sterling & R. Guerrant** Cryptosporidium and related species. *Infections of the gastrointestinal tract*, 1995; 1107-1128.
- Akalın, B.** Kütahya ili çevresinde buzağlarda Cryptosporidium (Tyzzer, 1907) türlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi 2018.
- Almeida, A., E. Pozio & S. M. Cacciò** . Genotyping of Giardia duodenalis cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010; 76, 1895-1901.
- Altıntaş, K.** *Tıbbi genel parazitoloji ve protozooloji*. Medical Network-Nobel. 1997. pp 167–170
- Amar, C., P. Dear & J. McLauchlin** Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of Cryptosporidium species from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 2004; 38, 217-222.
- Atambay, M., N. Daldal & T. Çelik** Malatya'da ishalleri dışkıları Cryptosporidium spp. araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003; 27, 12-14.
- Başustaoglu, A.** Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology). 9. baskı. *Ankara, Atlas Yayınları*, 2009; 415.
- Baxby, D. & N. Blundell** Sensitive, rapid, simple methods for detecting Cryptosporidium in faeces. *The Lancet*, 1983; 322, 1149.
- Bayramoğlu, Ö., D. Pekmezci & F. Başarı** Adana ili gıda çalışanlarında giardia ve cryptosporidium prevalanslarının farklı yöntemler ile araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2013; 37, 4-8.
- Bern, C., B. Hernandez, M. B. Lopez, M. J. Arrowood, A. M. De Merida & R. E. Klein** The contrasting epidemiology of Cyclospora and Cryptosporidium among outpatients in Guatemala. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2000; 63, 231-235.
- Beyhan, Y. E. & H. Yılmaz** Dışkı Örneklerinde Cryptosporidium spp. Antijen Varlığının Elisa Yöntemi ile Araştırılması: Dokuz Yıllık Değerlendirme. *Türkiye Parazitol Derg*, 2020; 44, 68-71.
- Brooks, G., K. Carroll, J. Butel, S. Morse & T. Mietzner** Jawetz, Melnick, Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. O. Şadi Yenen (Çeviri Ed.), *Nobel Tıp Kitapları*. 2014.
- Büget, E., Ö. Büyükbaba-Boral & H. Kırkoyun-Uysal** Türkiye'de Bir AIDS Hastasında ilk Mikrosporidiaz ve Solunum Sistemini Tutan ilk Kriptosporidiaz Olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2000; 30: 166-70.
- Cacciò, S. M. & L. Putignani.** Epidemiology of human cryptosporidiosis. In *Cryptosporidium: parasite and disease*, 2014; 43-79.
- Can, H., A. Caner, M. Döskaya, A. Değirmenci, S. Karaçali, Y. Gürüz & Ü. Ahmet** Demonstration of Cryptosporidium parvum in immune suppressed rats using nested PCR. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2013; 37, 165.
- Carey, C., H. Lee & J. Trevors** Biology, persistence and detection of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis oocyst. *Water research*, 2004; 38, 818-862.

- Carpenter, C., R. Fayer, J. Trout & M. J. Beach** Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging infectious diseases*, 1999; 5, 579.
- Carreno, R. A., D. S. Matrin & J. R. Barta** *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. *Parasitology Research*, 1999; 85, 899-904.
- Casemore, D.** ACP Broadsheet 128: June 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of clinical pathology*, 1991; 44, 445.
- Chalmers, R. & S. Cacciò** Towards a consensus on genotyping schemes for surveillance and outbreak investigations of *Cryptosporidium*, Berlin, June 2016. *Eurosurveillance*, 2016; 21, 30338.
- Chalmers, R. M. & A. P. Davies** Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental parasitology*, 2010; 124, 138-146.
- Chalmers, R. M. & F. Katzer** Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in parasitology*, 2013; 29, 237-251.
- Checkley, W., A. C. White Jr, D. Jaganath, M. J. Arrowood, R. M. Chalmers, X.-M. Chen, R. Fayer, J. K. Griffiths, R. L. Guerrant & L. Hedstrom** A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *The Lancet Infectious Diseases*, 2015; 15, 85-94.
- Chen, X.-M. & N. F. LaRusso** Human intestinal and biliary cryptosporidiosis. *World journal of gastroenterology*, 1999; 5, 424.
- Clark, D. P.** New insights into human cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999; 12, 554-563.
- Constable, P.** Cryptosporidiosis. *The Merck Veterinary Manual*. 9th ed. 2014. Available from: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp>.
- Control, C. f. D. & Prevention** Diagnostic Procedures for Stool Specimens. 2004. : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>.
- Cook, W. J., O. Senkovich, A. Hernandez, H. Speed & D. Chattopadhyay** Biochemical and structural characterization of *Cryptosporidium parvum* Lactate dehydrogenase. *International journal of biological macromolecules*, 2015; 74, 608-619.
- Current, W. L. & L. S. Garcia** Cryptosporidiosis. *Clinical microbiology reviews*, 1991; 4, 325-358.
- Çetinkaya, F.** *Cryptosporidium parvum*'ün bulaşmasında su ve gıdaların rolü. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med 23 (2004), 1-2-3: 103-109
- Çiçek, M. & H. Yılmaz** İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve diğer barsak parazitlerinin yaygınlığı. *Dicle Tıp Dergisi*, 2011; 38, 70-75.
- Dann, S. M., H.-C. Wang, K. J. Gambarin, J. K. Actor, P. Robinson, D. E. Lewis, S. Caillat-Zucman & A. C. White Jr** Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan cryptosporidium. *The Journal of infectious diseases*, 2005; 192, 1294-1302.
- Dietz, V. J. & J. M. Roberts** National surveillance for infection with *Cryptosporidium parvum*, 1995-1998: what have we learned? *Public Health Reports*, 2000; 115, 358.
- Dillingham, R. A., A. A. Lima & R. L. Guerrant** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and infection*, 2002; 4, 1059-1066.
- Dirim Erdoğan, D., N. Turgay & M. Z. Alkan** Bir Cryptosporidiosis olgusunun kinyoun Asit-fast boyası ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile takibi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003; 27, 237-239.

- Doğan N.** & Sağlık İ. Uzamış İshalli Hamile Bir Kadında *Cylospora Cayetanansis* Ve *Cryptosporidium Parvum* Koenfeksiyonu. *Mikrobiyol Bul*, 2010; 44, 155-159.
- Dominguez-Uscanga, A.,** D. F. Aycart, K. Li, W. H. Witola & J. E. A. Laborde Anti-protozoal activity of Thymol and a Thymol ester against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2021; 15, 126-133.
- Dwivedi, K. K.,** G. Prasad, S. Saini, S. Mahajan, S. Lal & U. K. Baveja Enteric opportunistic parasites among HIV infected individuals: associated risk factors and immune status. *Japanese journal of infectious diseases*, 2007; 60, 76.
- Elgun, G.** & I. S. Koltas Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitology research*, 2011; 108, 395-397.
- Elgün, G.** & K. İS İshalli Dışkı Örneklerinde *Cryptosporidium* Sp. Antijenin Elisa Yöntemi ile Araştırılması', *Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi*. 2009.
- Elliott, D. A.,** D. J. Coleman, M. A. Lane, R. C. May, L. M. Machesky & D. P. Clark *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization. *Infection and immunity*, 2001; 69, 5940-5942.
- Fahey, T.** Cryptosporidiosis. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 2003; 10, 75-80.
- Farthing, M. J.** Clinical aspects of human cryptosporidiosis. *Contributions to microbiology*, 2000; 6, 50-74.
- Fayer, R.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology*, 2004; 126, 37-56.
- Fayer, R.** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental parasitology*, 2010; 124, 90-97.
- Fayer, R.,** U. Morgan & S. J. Upton Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International journal for parasitology*, 2000; 30, 1305-1322.
- Fayer, R.,** M. Santín & J. M. Trout *Cryptosporidium ryanae* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 2008; 156, 191-198.
- Fayer, R.** & B. Ungar *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological reviews*, 1986; 50, 458-483.
- Fayer, R.** & L. Xiao. General biology. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC press. 2007. pp. 1-42
- Foster, D.** & G. W. Smith Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2009; 25, 13-36.
- Gaafar, M. R.** Efficacy of *Allium sativum* (garlic) against experimental cryptosporidiosis. *Alexandria Journal of Medicine*, 2012; 48, 59-66.
- Garcia, L. S.** & R. Y. Shimizu Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38, 1267-1268.
- Garcia, L. S.,** R. Y. Shimizu, S. Novak, M. Carroll & F. Chan Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *Journal of clinical microbiology*, 2003; 41, 209-212.
- Gasser, R.** & P. O'Donoghue Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. *International journal for parasitology*, 1999; 29, 1379-1413.
- Gookin, J. L.,** S. K. Nordone & R. A. Argenzio Host responses to *Cryptosporidium* infection. *Journal of veterinary internal medicine*, 2002; 16, 12-21.

- Gülay, O.** & G. Şengöz HIV/AIDS hastalarında ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* türlerinin sıklığının araştırılması. *Balıkesir Medical Journal*, 2006; 2, 70-82.
- Hadfield, S. J.**, G. Robinson, K. Elwin & R. M. Chalmers Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 2011; 49, 918-924.
- Harp, J. & J. Goff** Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal of dairy science*, 1998; 81, 289-294.
- Harris, J. R.** & F. Petry *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *The Journal of parasitology*, 1999; 839-849.
- Hazer, Y.** Afyonkarahisar bölgesindeki risk gruplarında *Cryptosporidium parvum* araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi 2007.
- Heine, J.** Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 1982; 29, 324-327.
- Henriksen, S. A.** & J. F. L. Pohlenz Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta veterinaria scandinavica*, 1982; 22, 594.
- Hijjawi, N., B. Meloni, M. Ng'Anzo, U. Ryan, M. Olson, P. Cox, P. Monis & R. Thompson** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International journal for parasitology*, 2004; 34, 769-777.
- Huang, D. B.** & A. C. White An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology Clinics*, 2006; 35, 291-314.
- Hunter, P. R., S. J. Hadfield, D. Wilkinson, I. R. Lake, F. Harrison & R. M. Chalmers** Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging infectious diseases*, 2007; 13, 82-88.
- Inomata, A., F. Murakoshi, A. Ishiwa, R. Takano, H. Takemae, T. Sugi, F. Cagayat Recuenco, T. Horimoto & K. Kato** Heparin interacts with elongation factor 1 α of *Cryptosporidium parvum* and inhibits invasion. *Scientific reports*, 2015; 5, 1-11.
- İnceboz, T., B. Sarı & V. Orhan** Gastrointestinal şikayetleri olan olgularda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2002; 26, 149-150.
- Jayalakshmi, J., B. Appalaraju & K. Mahadevan** Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 2008; 51, 137.
- Jex, A. R., A. Pangasa, B. E. Campbell, M. Whipp, G. Hogg, M. I. Sinclair, M. Stevens & R. B. Gasser** Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *Journal of clinical microbiology*, 2008; 46, 2252-2262.
- Johnston, S. P., M. M. Ballard, M. J. Beach, L. Causer & P. P. Wilkins** Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of clinical microbiology*, 2003; 41, 623-626.
- Kappus, K. K., D. D. Juranek & J. M. Roberts** Results of testing for intestinal parasites by state diagnostic laboratories, United States, 1987. *Morbidity And Mortality Weekly Report: CDC Surveillance Summaries*, 1991; 25-46.
- Kar, S.** *Cryptosporidium parvum* un hücre kültüründe üretilmesi ve üremenin farklı yöntemlerle belirlenmesi, Ankara Üniv. SBE Parazitoloji AD. Doktora Tezi. 2007.

- Karabey, M.,** H. Can, T. Ö. Öner, M. Döşkaya, S. E. Alak, A. D. Döşkaya, M. Karakavuk, A. E. Köseoğlu, C. Ün & A. Y. Gürüz. 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
- Khalil, S.,** B. R. Mirdha, J. Paul, A. Panda, G. Makharia, R. Chaudhry & S. Bhatnagar Development and evaluation of molecular methods for detection of Cryptosporidium spp. in human clinical samples. *Experimental Parasitology*, 2016; 170, 207-213.
- Korkmaz, M.** & Ü. Ok Parazitolojide laboratuvar. *Izmir: Meta Basim.* 2011.
- Koturoğlu, G.,** S. Bayram, Z. Kurugöl, N. Turgay & F. Mutlubaş Akut ishali çocuklarda Cryptosporidium sıklığı ve risk faktörleri. *Türkiye Clin J Pediatr*, 2004; 13, 16-9.
- Köreng, B.** Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar, Giardia lamblia ve Cryptosporidium spp. Tanısında Mikroskopi, Triage ve ElisaYöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, 2011; 71s.
- Kurtoğlu, M. G.,** H. Korkoca, M. Çiçek & Z. Taş Cengiz Van yöresinde gıda sektörü çalışanlarında bağırsak parazitlerinin yaygınlığı. *Türkiye Parazitol Derg*, 2007. 31.
- LaGier, M. J.,** J. S. Keithly & G. Zhu Characterisation of a novel transporter from Cryptosporidium parvum. *International journal for parasitology*, 2002; 32, 877-887.
- Langer, R. C. & M. W. Riggs** Cryptosporidium parvum apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 1999; 67, 5282-5291.
- Laurent, F., D. McCole, L. Eckmann & M. F. Kagnoff** Pathogenesis of Cryptosporidium parvum infection. *Microbes and Infection*, 1999; 1, 141-148.
- Leav, B. A.,** M. Mackay, H. D. Ward & D. Acheson Cryptosporidium species: new insights and old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, 2003; 36, 903-908.
- Leitch, G. J. & Q. He** Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of biomedical research*, 2011; 25, 1-16.
- Leng, X., D. A. Mosier & R. D. Oberst** Simplified method for recovery and PCR detection of Cryptosporidium DNA from bovine feces. *Applied and environmental microbiology*, 1996; 62, 643-647.
- Linden, K.,** G. Shin & M. Sobsey Comparative effectiveness of UV wavelengths for the inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts in water. *Water Science and Technology*, 2001; 43, 171-174.
- Ma, P. & R. Soave** Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 1983; 147, 824-828.
- Magi, B.,** V. Canocchi, G. Tordini, C. Cellesi & A. Barberi Cryptosporidium infection: diagnostic techniques. *Parasitology research*, 2006; 98, 150-152.
- Mandel, G.,** J. Bennett & R. Doli Cryptosporidiosis in: Principles and Practise of Infectious Diseases. *Philadelphia: Churchill Livingstone Inc.* 2005. p: 3215-3228.
- Miman, Ö. & G. Saygi** Temel tıbbi parazitoloji. *İstanbul Tıp Kitabevi*, 2018; 241-248.
- Molbak, K.,** M. Andersen, P. Aaby, N. Højlyng, M. Jakobsen, M. Sodemann & A. Da Silva Cryptosporidium infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, west Africa. *The American journal of clinical nutrition*, 1997; 65, 149-152.
- Morgan, f. U.,** L. Pallant, B. Dwyer, D. Forbes, G. Rich & R. Thompson Comparison of PCR and microscopy for detection of Cryptosporidium parvum in human fecal specimens: clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36, 995-998.

- O'Handley, R. M. & M. E. Olson Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 2006; 22, 623-643.
- Ok, Ü.**, K. Kavaklı, N. Çetingül, S. Öztop, G. İşli, A. Üner & M. Özcel Kemoterapi uygulanan tümörlü çocuklarda barsak parazitlerinin sıklığı. *Türk Parazitol Derg*, 1995; 19, 385-391.
- Ozcel MA**, Özbel Y, Ak M Ozcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği YayınNo:22İzmir, 2007; pp363-376.
- Özçelik, S.**, S. Değerli & D. Yıldırım İshalli hastalarda direkt fluoresan antikor-dfa yöntemi ile giardia ve cryptosporidium spp. araştırılması. *Cumhuriyet Medical Journal*, 2014; 36, 422-428.
- Parija, S.** & H. Srinivasa The neglect of stool microscopy for intestinal parasites and possible solutions. *Tropical Medicine & International Health*, 1999; 4, 522-524.
- Pereira, J. T.**, A. O. Costa, M. B. de Oliveira Silva, W. Schuchard, S. C. Osaki, E. A. de Castro, R. C. Paulino & V. T. Soccol Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana State, Southern Brazil. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2008; 151, 464-473.
- Pereira, S. J.**, N. E. Ramirez, L. Xiao & L. A. Ward Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *The Journal of infectious diseases*, 2002; 186, 715-718.
- 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
- Pohlentz, J., H. W. Moon**, N. F. Cheville, and W. J. Bemrick. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978; 172:452-457.
- Putignani I**, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010;2010. doi:pii: 753512. Riggs, M. W. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and infection*, 2002; 4, 1067-1080.
- Robertson, L.J.** Transmission routes and factors that lend themselves to foodborne transmission. In *Cryptosporidium as a Foodborne Pathogen*; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 11-12.
- Robinson, A. C.-G.** & E. Dorothy Intestinal Immune Response to Human. *Infect. Immun*, 2008; 76, 23.
- Robinson, P., P. C. Okhuysen**, C. L. Chappell, D. E. Lewis, I. Shahab, A. Janecki & A. C. White Jr Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 β in jejunum of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infection and immunity*, 2001; 69, 1172-1174.
- Rosenblatt, J.** & L. M. Sloan Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993; 31, 1468-1471.
- Rossignol, J. F.**, S. M. Kabil, Y. El-Gohary & A. M. Younis Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006; 4, 320-324.
- Rota, S.** & I. Fidan Noninflammatory ishallerin patogenezi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2007; 37, 234-241.
- Ryan, U.**, R. Fayer & L. Xiao *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 2014; 141, 1667-1685.
- Ryan, U.**, N. Hijjawi & L. Xiao Foodborne cryptosporidiosis. *International journal for parasitology*, 2018; 48, 1-12.

- Ryan, U.,** A. Paparini, K. Tong, R. Yang, S. Gibson-Kueh, A. O'Hara, A. Lymbery & L. Xiao *Cryptosporidium huwi* n. sp.(Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, 2015; 150, 31-35.
- Sallon, S.,** R. El Showwa, M. El Masri, M. Khalil, N. Blundell & C. Hart *Cryptosporidiosis in children in Gaza. Annals of tropical paediatrics*, 1991; 11, 277-281.
- Sane, S. S.,** M. R. Thakar & S. M. Mehendale *Opportunistic parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea by the level of immunosuppression. Indian J Med Res*, 2009; 130, 63-66.
- Sarı, C.,** K. Sarı & S. Ertuğ *Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda Cryptosporidium spp. ve Blastocystis hominis sıklığının araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2003; 27, 187-190.
- Sarıkaya, R.** *Cryptosporidium Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme. Ahi Evran Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 2004; 5(2), 13-26.
- Sears, C. L. & B. D. Kirkpatrick** *Cryptosporidiosis and isosporiosis. In. Principles and Practice of Clinical Parasitology*, 2001; 139-164.
- Shahiduzzaman, M. & A. Dausgies** *Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. Veterinary Parasitology*, 2012; 188, 203-214.
- Shrivastava, A. K.,** S. Kumar, W. A. Smith & P. S. Sahu *Revisiting the global problem of cryptosporidiosis and recommendations. Tropical parasitology*, 2017; 7, 8.
- Slavin, D.** *Cryptosporidium meleagridis (sp. nov.). Journal of comparative pathology and therapeutics*, 1955; 65:262-270.
- Smith, A.,** M. Reacher, W. Smerdon, G. Adak, G. Nichols & R. Chalmers *Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. Epidemiology & Infection*, 2006; 134, 1141-1149.
- Sparks, H.,** G. Nair, A. Castellanos-Gonzalez & A. C. White *Treatment of Cryptosporidium: what we know, gaps, and the way forward. Current tropical medicine reports*, 2015; 2, 181-187.
- Sreedharan, A.,** R. Jayshree & H. Sridhar *Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 1996; 211-213.
- Sulzyc-Bielicka, V.,** L. Kołodziejczyk, S. Jaczewska, D. Bielicki, J. Kładny & K. Safranow *Prevalence of Cryptosporidium sp. in patients with colorectal cancer. Polish Journal of Surgery*, 2012; 84, 348-351.
- Şahin, S.,** S. Ağaoğlu & S. Alemdar *Cryptosporidium Ve Cryptosporidiosis. Türkiye Klinikleri*, 2018; 35-41.
- Tamer, G. S. & S. Gülenç** *Dışkıda Cryptosporidium spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. Türkiye Parazit Derg*, 2008; 32, 198-201.
- Tanyuksel M,** Gun H, Doganci L. *Prevalence of Cryptosporidium sp. in patients with neoplasia and diarrhea. Scand The Journal of Infectious Diseases*, 1995, 27: 69-70.
- Tanyüksel, M.,** T. Haznedaroğlu & H. Gün *Neoplastik hastalarda Cryptosporidium spp. araştırılması. Türkiye Parazit Derg*, 1995; 19, 56-63.
- Taşar, M.,** A. Güneş & E. Vezir *A Rare Complication of Acute Diarrhoea Caused by Cryptosporidium: Possible Hepatobiliary System Involvement in a Child without Immunodeficiency. Mikrobiyoloji Bulteni*, 2019; 53, 464-471.
- Theodos, C. M.** *Innate and cell-mediated immune responses to Cryptosporidium parvum. Advances in Parasitology*, 1998; 40, 87-119.

- Thompson, R. A.,** M. Olson, G. Zhu, S. Enomoto, M. S. Abrahamsen & N. Hijawi Cryptosporidium and cryptosporidiosis. *Advances in parasitology*, 2005; 59, 77-158.
- Tyzzer, E.** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1907; 5, 12-13.
- Tyzzer, E.** Cryptosporidium parvum (sp. nov.), a Coccidium. *Archiv für Protistenkunde*, 1912; 26: 394.
- Tyzzer, E. E.** An extracellular coccidium, Cryptosporidium muris (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of medical research*, 1910; 23, 487.
- Tzipori, S. & H. Ward** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and infection*, 2002; 4, 1047-1058.
- Usluca S.** İshalli Dışkılarda Microsporidium Spp. ve Cryptosporidium Spp.'nin Saptanması PCR Yöntemi ile Tür Tayininin Yapılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2009.
- Usluca, S. & Ü. Aksoy** Su kaynaklı bir parazit: Cryptosporidium. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2006; 20, 65-74.
- Usluca, S., C. Babur & S. Kilic** Current Status in Intestinal Parasitic Infections: A Reference Laboratory Results/Barsak Paraziti Enfeksiyonlarında Son Durum: Bir Referans Laboratuvarı Sonuçları. *KLİMİK Journal*, 2020; 33, 307-314.
- Uyar, Y.** Antigen detection methods in diagnosis of amebiasis, giardiasis and cryptosporidiosis. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 2009; 33, 140-150.
- Ülçay, A., L. Görenek, Ö. Coşkun, E. Araz, A. Acar & C. P. Eyigün** İmmün yetmezlikli hastalarda intestinal protozoonların tanısı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2008; 32, 328-333.
- Üner, A., Tanrıverdi, S., Caner, A., Değirmenci, A.** Cryptosporidium'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar. Moleküler Parazitoloji Kitabı. Özcel, A., Tanyüksel, M., Eren, H (Ed.). Türkiye Parazitoloji Derneği, 2009; Yayın No: 22. 631-647.
- Vidal, A. M. B. & W. R. Catapani** Enzyme-linked immunosorbent assay immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Medical Journal*, 2005; 123, 282-285.
- Weber, R., R. T. Bryan, H. S. Bishop, S. P. Wahlquist, J. J. Sullivan & D. D. Juranek** Threshold of detection of Cryptosporidium oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991; 29, 1323-1327.
- World Health Organization (WHO).** WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. In Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015.
- Xiao, L.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology*, 2010; 124, 80-89.
- Xiao, L., K. Alderisio, J. Limor, M. Royer & A. A. Lal** Identification of species and sources of Cryptosporidium oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and environmental microbiology*, 2000; 66, 5492-5498.
- Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan & S. J. Upton** Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews*, 2004; 17, 72-97.
- Xiao, L. & Y. Feng** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008; 52, 309-323.

- Yavuz, U. & A. T. Özkan.** Amebiyazis, giardiyazis ve kriptosporidiyazis tanısında antijen tarama yöntemlerinin yeri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2009; 33 (2): 140 - 150, 2009
- Yıldız, M., N. Çöplü, S. Kılıç, C. Babür, Ö. Öncül & B. Esen** İshali plan solid tümörlü olgularda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2001; 25, 1-8.
- Yılmaz, A.** The InvestIgatIon Of *CryptosporIdlum* Spp. In PatIents WIth DIarrhea by MIcroscopIc And ElIsa Methods. *Selcuk Medical Journal*, 2016; 32, 61-64.
- Zorbozan, O., G. Quliyeva, V. Tunalı, A. Özbilgin, N. Turgay & A. D. Gökengin** HIV ile Enfekte Olguların Bağırsak Protozoonları Açısından Retrospektif Olarak İncelenmesi. *Turkiye Parazitol Derg*, 2018; 42, 187-90.

