

Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve Modifiye Aside Dirençli Boyama Yöntemi ile Araştırılması

Investigation of the *Cryptosporidium* in Immune Suppressed Individuals by Using Modified Acid-Fast Stain and ELISA Methods

Canan EREN,^a
Ömer METE,^b
Nezahat AKPOLAT,^b
Mutallip ÇİÇEK^b

^aMikrobiyoloji Laboratuvarı,
Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi,
^bTıbbi Mikrobiyoloji AD,
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Diyarbakır

Geliş Tarihi/Received: 22.08.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 12.07.2012

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
09-TF-01 no'lu projeye desteklenmiştir.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Nezahat AKPOLAT
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Diyarbakır,
TÜRKİYE/TURKEY
nakpolat@dicle.edu.tr

ÖZET Amaç: *Cryptosporidium* cinsi protozoon gastroenterit etkenlerinden birisidir. Klora dirençli olması ve içme suyu süzgeçlerinden geçebilmesi nedeniyle parazitlerin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına risk grubundaki immün sistemi baskılanmış hastalardan ve ishal şikayeti nedeniyle, farklı yaş grubundaki immün sistemi normal bireylerden gönderilen dışkılarda *Cryptosporidium* antijenlerinin araştırılması amaçlanmıştır. ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium* türleri antijenleri araştırılmış ve modifiye aside dirençli boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* oookistleri aranmıştır. Çalışmada kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri değerlendirilmiştir. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada; onkoloji (n=156), diyaliz (n=98) ve malnütrüsyonlu çocuklardan (n=21) oluşan toplam 275 immün sistemi baskılanmış hasta ve immün sistemi normal ancak gastroenterit şikayeti ile laboratuvarımıza gönderilen gastroenteroloji hastaları (n=22) ve pediatri hastaları (n=178) olmak üzere 200 hastadan alınan dışkı örnekleri çalışıldı. Ayrıca farklı kliniklerden gönderilen, ishal şikayeti olmayan immün sistemi normal 55 bireyin dışkı örneği kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Makroskobik olarak da incelenen her dışkı örneğine lam-lamel arası preparasyon, modifiye aside dirençli boyama yapılarak *Cryptosporidium* ve diğer bağırsak parazitleri açısından incelendi. Ayrıca dışkı örneklerinde "Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti" (OXOID) ile *Cryptosporidium* türleri antijenleri arandı. **Bulgular:** Çalışmada, toplam 530 dışkı örneğinin 17 (%3,2)'sinde modifiye aside dirençli boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* türleri oookisti saptanırken, ELISA yöntemi ile 31 [31/530 (%5,8)] hastanın dışkısında *Cryptosporidium* türleri antijeni tespit edildi. ELISA yöntemi ile, 40 yaş üstü immün sistemi baskılanmış hastalar, aside dirençli boyama yönteminde olduğu gibi *Cryptosporidium*'un en fazla pozitif olduğu hastalardı. Modifiye aside dirençli boyama yönteminin duyarlılığı %54, 83, özgüllüğü %100; ELISA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü de %100 olarak bulundu. Nativ-lugol preparasyon yöntemiyle örneklerin 61 (%11,5)'inde çeşitli protozoon kistleri ve 3 (%0,5)'ünde de Hymenolepis nana yumurtaları görüldü. **Sonuç:** Sonuç olarak hem immün sistemi baskılanmış hastalarda hem de gastroenterit şikayeti ile gelen normal hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması, ayrıca bölgemizde *Cryptosporidium*'un araştırılmasında, boyama yöntemi ile birlikte immün tansal bir yöntemin de kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*; immünyetmezlik; immünoenzimatik yöntem; boyama ve işaretleme

ABSTRACT Objective: *Cryptosporidium* sp. is a protozoon and one of the causes of gastroenteritis. Since it is resistant to chlorine and passes through the filters of the drinking water, it has a high prevalence in the water sources and it may cause water-borne epidemics due to its ability to cause infection even with only a few numbers of parasites. In this study, in Medical Microbiology Department Laboratory it was aimed to investigate *Cryptosporidium* antigens in the stools of immunocompromised patients who were in the risk group and in the stools of immunocompetent patients who were in different age groups and had diarrhea. In this study, *Cryptosporidium* sp. antigens were investigated by ELISA method and *Cryptosporidium* oocysts were searched for with modified acid-fast staining. The sensitivity and specificity of the methods used in the study were investigated. **Material and Methods:** In this study, fecal samples of 275 immunocompromised patients from oncology (n=156) and dialysis (n=98) departments as well as children with malnutrition (n=21) and fecal samples of 200 immunocompetent patients with the complaints of gastroenteritis from gastroenterology (n=22) and pediatric departments (n=178) were studied. Stool samples of 55 immunocompetent patients without diarrhea from different clinics were enrolled as the control group in the study. Stool samples of each patient was prepared for macroscopic solid-lamella preparation and stained with modified acid-fast stain and examined for *Cryptosporidium* and other intestinal parasites. In addition, *Cryptosporidium* sp. antigens were investigated with Prospect *Cryptosporidium* stool ELISA kit (OXOID). **Results:** In this study, *Cryptosporidium* sp. oocysts were detected using modified acid-fast staining in 17 (3.2%) and *Cryptosporidium* sp. antigen was detected in stools of 31 (5.8%) patients by using ELISA method among 530 stool samples. Most of the patients in whom *Cryptosporidium* sp. detected were immunosuppressed and older than 40 years. The sensitivity of modified acid-fast staining method was 54.83% and its specificity was 100% while both sensitivity and specificity of the ELISA method were detected as 100%. A variety of protozoan cysts were detected in 61 (11.5%) and Hymenolepis nana eggs were detected in 3 (0.5%) of the samples by using Native-Lugol preparation. **Conclusion:** ELISA method together with modified acid fast staining would be suitable for routine use to investigate *Cryptosporidium* in immunosuppressed patients and also in normal patients suffering from gastroenteritis.

Key Words: *Cryptosporidium*; immunocompromised; enzyme-linked immunosorbent assay; staining and labeling

doi: 10.5336/medsci.2011-26071

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(6):1545-53

preparatlar hazırlandıktan sonra, kalan dışkı örnekleri ELISA çalışılması için ependorf tüplerinde, -20°C'de saklamaya alındı.

Bekletilmeden her dışkı örneğinden;

- Makroskobik inceleme (renk, koku, kıvam, kan, mukus) ve lam lamel arası preparasyonlar

- Hazırlanarak, protozoon trofozoit ve kistleri ile helmint yumurtaları araştırıldı.

- Yayma preparat hazırlanarak havada kurutuldu, alevde tespit edildi. Her bir dışkı örneğinden ikişer preparat hazırlanarak toplam 1060 preparat modifiye aside dirençli boyama yöntemi ile boyandı ve *Cryptosporidium* ookistleri açısından incelendi.

DİŞKİ PREPARATLARININ MODİFİYE ASİDE DİRENÇLİ SICAK BOYAMA YÖNTEMİ İLE BOYANMASI⁴

1. Tespit edilip soğutulan preparatlar üzerine karbol fuksin dökülerek kaynatılmadan hafif duman çıkana kadar 5 dakika ısıtıldı.

2. Nazikçe su ile yıkayıp fazla boyalar döküldükten sonra %1'lik asit-alkol lamlar üzerine dökülerek 1 dakika tutuldu renksizleştirme işlemi yapıldı.

3. Su ile yıkandıktan sonra, metilen mavisi dökülerek 1 dakika bekletildi.

4. Tekrar su ile yıkandıktan sonra oda ısısında kurumaya bırakıldı.

Değerlendirmede her preparat, x 100'lük büyütme ile tarandı. Mavi zemin üzerinde kırmızı-pembe renge boyanan, içinde birden fazla sayıda siyah ve muntazam olmayan granüller bulunan ve 4-6 µm çapında yuvarlak-oval yapılar *Cryptosporidium* ookisti olarak değerlendirildi. Mavi-yeşil boyanan ve ookistlerden daha büyük yapılar ise mantar olarak değerlendirildi. Örneklerin değerlendirilmesinde *Cryptosporidium* türleri antijenlerini belirlemeye yönelik "Prospect *Cryptosporidium* ELISA kiti" (OXOID, LOT 885970) kullanıldı. ELISA çalışması üretici firmasının önerdiği biçimde uygulandı. Kit çalışma prosedürüne göre pozitif ve negatif kontrol kullanılarak çalışılan örneklerin bulunduğu plaklar ELISA okuyucusunda (TECAN SUNRISE) 450 nm dalga boyunda okutuldu. Sonuçlar üretici fir-

manın önerisi doğrultusunda aşağıdaki şekilde değerlendirildi. Ayrıca ELISA test pozitifliği sarı renk oluşumu ile de görülmekteydi

Pozitif Kontrol: Sarı renkli olmalı ve "optimal dansite" (OD) $\geq 0,300$ (450 nm'de) olmalı.

Negatif kontrol: Renksiz olmalı ve "optimal dansite" (OD) $\leq 0,100$ (450 nm'de) olmalı.

Pozitif numune: OD $\geq 0,050$; negatif numune: OD $\leq 0,050$.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistik değerleri için ortalama ve standart sapma kullanıldı. Kesikli değişkenler, frekans ve oranlarla verildi. Modifiye aside dirençli boyama ve ELISA yöntemlerinin duyarlılıkları, özgüllükleri, pozitif ve negatif prediktif değerleri ve testlerin toplam duyarlılık oranları istatistiksel değerlendirmede hesaplanarak gösterildi. Çapraz tablo değerlendirmelerinde Yates düzeltmeli ki-kare testi kullanıldı. Hipotez çift yönlü olup $p \leq 0,05$ olması durumunda, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tanı testlerinin performansının düzeyi McNemar testi ile analiz edildi. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 15,0 for Windows paket program kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmada yer alan hastaların yaş ortalaması $39,97 \pm 24,42$ (min: 1, maks: 76) idi. 530 hastanın 254'ü immün sistemi baskılanmış, 21'i malnütrisyonlu olmak üzere 199'u ishali pediatrik hasta, 22'si gastroenteroloji hastası ve 55'i de ishali olmayan, immün sistemi normal bireylerden oluşmaktaydı. Çalışma grupları, sayıları ve yaş aralıkları Tablo 1'de gösterilmiştir (Tablo 1).

Çalışmada, toplam 530 dışkı örneğinin 17 (%3,2)'sinde modifiye aside dirençli boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* türleri ookistleri saptanırken, ELISA yöntemi ile 31 [31/530 (%5,8)] hastanın dışkısında *Cryptosporidium* türleri antijeni tespit edildi.

Modifiye aside dirençli boyama ve ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* türleri saptanan olguların gruplara göre dağılımı Tablo 2'de görülmektedir. İki yöntemde de *Cryptosporidium* türleri en fazla

TABLO 1: Çalışma grupları, sayıları ve yaş aralıkları.

Grup	Sayı	Yaş aralıkları
Onkoloji	156	18-76
Diyaliz	98	20-76
Gastroenteroloji	22	16-76
Pediyatri	178	0-15
Malnütrüsyonlu çocuk	21	2-15
Kontrol	55	1-70
Toplam	530	

TABLO 2: Modifiye aside dirençli boyama ve ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* türleri saptanan olguların gruplara göre dağılımı.

Hasta grubu	Modifiye aside dirençli boyama (+)	ELISA (+)
	n (%)	n (%)
Onkoloji	8 (1,5)	14 (2,6)
Diyaliz	4 (0,7)	4 (0,7)
Gastroenteroloji	2 (0,3)	2 (0,3)
Pediyatri	3 (0,5)	8 (1,5)
Malnütrüsyonlu çocuk	-	1 (0,1)
Kontrol	-	2 (0,3)
Toplam (n=530)	17 (3,2)	31 (5,8)

onkoloji ve diyaliz hastaları olan immün sistemi baskılanmış bireylerde tespit edildi (18/31; %58,06).

Mikroskopta x100'lük büyütmele objektiflerde tespit edilen 17 preparattaki *Cryptosporidium* türleri ookistleri mavi zemin üzerinde, küçük parlak kırmızı-pembe yuvarlak-oval şekilde ve içlerindeki sporozoit yapıları, örneklerde çeşitli yoğunlukta görüldü (Resim 1).

ELISA pozitif hastaların 8 (%4,5)'i 0-5 yaş grubunda (n=175), 1 (%0,8)'i 6-15 yaş grubunda (n=119), 10 (%14,9)'u 16-40 yaş grubunda (n=67), 12 (%7,1)'si de 40 yaş üstü bireylerde (n=169) tespit edildi. Buna göre 40 yaş üstündeki immün sistemi baskılanmış hastalar, aside dirençli boyama yönteminde olduğu gibi *Cryptosporidium* türleri antijeninin en fazla pozitif olduğu hasta grubuydu. Modifiye aside dirençli boyama yönteminde ookist saptanmayan; 2 kontrol grubu, bir malnütrüsyonlu çocuk, 6 onkoloji hastası ve 5 çocuk hastada ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* türleri antijeni saptandı.

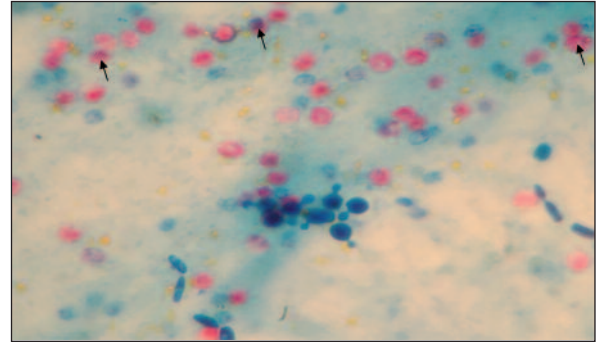
ELISA yöntemi baz alınarak modifiye aside dirençli boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (Tablo 3).

Modifiye aside dirençli boyama yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü belirlendi (Tablo 4).

Tanı testi olarak, ELISA ve modifiye aside dirençli boyama yönteminin McNemar Testi ile yapılan analizinde performanslarının yüksek olduğu görüldü ($p < 0,001$).

Kontrol grubu ile diğer grupların ELISA sonuçları Yates düzeltmeli ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Hipotez çift yönlü olup $p \leq 0,05$ olduğunda anlamlı farklılık kabul edildi. Gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 5).

Ayrıca 5 hastada da birden fazla parazite rastlandı. Dört pediyatrik hastanın 2'sinde *Hymenolepis nana*+*Giardia intestinalis*, birinde *Cryptosporidium* türleri + *Entamoeba histolytica/dispar* ve yine bi-

**RESİM 1:** *Cryptosporidium* türleri ookistlerinin modifiye aside dirençli boyama yöntemiyle görünümü (x100 büyütme).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

TABLO 3: Modifiye aside dirençli boyama sonuçları ile ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.

Test edilen	ELISA	ELISA	Toplam
	pozitif (n)	negatif	
Aside dirençli boyama pozitif	17	0	17
Aside dirençli boyama negatif	14	499	513
Toplam	31	499	530

$p < 0,001$ (McNemar Testi).

Duyarlılık: 54,83

Özgüllük: 100

Pozitif prediktif değer: 100

Negatif prediktif değer: 94,15

Testin doğruluk oranı: 97,35.

TABLO 4: ELISA sonuçlarının Modifiye aside dirençli boyama sonuçları ile karşılaştırılması.

Test edilen	Aside dirençli boyama pozitif		Aside dirençli boyama negatif		Toplam
	n	%	n	%	
ELISA pozitif	17	3,2	14	2,6	31
ELISA negatif	0	0	499	94,2	499
Toplam	17	3,2	513	96,8	530

p<0,001 (McNemar Testi).

ELISA testinin duyarlılığı: $17/(17+0) \times 100 = 100$

ELISA testinin özgüllüğü: $499/(14+499) = 100$

Pozitif prediktif Değeri: 54,83

Negatif prediktif Değeri: 100,00

Testin doğruluk Oranı: 97,36 olarak hesap edilmiştir.

rinde *Cryptosporidium* türleri + *G.intestinalis* görüldü. Diğer gruptan bir hastada da *H. nana* +*G. intestinalis* saptandı. *E.histolytica/dispar* tanısı adezin antijeni arayan ELISA kitleri ile doğrulandı.

Taranan dışkı örneklerinin 25 tanesinde nativ incelemede ve boyamalarda bol miktarda *Candida* türlerine rastlandı. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastaların 17'sinin ve pediatri grubunun 8'inin dışkı örneklerinde *Candida* türleri floraya hakim düzeydeydi.

TARTIŞMA

Son yıllarda kanserli olgu sayılarındaki artış, immün yetmezlik, immün sistemi baskılayıcı ilaçların artan kullanımı, popülasyonun yaşlanması ve malnütrüsyon sonucunda paraziter enfeksiyonlara duyarlılık artmıştır. Kriptosporidiozis de dünyanın birçok bölgesinde giderek yaygın hale gelen, immün yetmezliği bulunan ve bulunmayan bireylerde sağlık problemi oluşturan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca nozokomiyal ishallerde üçüncü en sık patojen (%7,2) olarak yer alması önemini daha da arttırmaktadır.⁵⁻⁷ Çalışmamızda toplam 530 bireyin 31 (%5,85)'inde *Cryptosporidium* türleri antijeni saptandı. Ülkemizde farklı gruplarda yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* görülme oranı %0,13 ila %35,5 arasında bildirilmektedir.^{5,8-10} Kriptosporidiozis ile ilgili çalışmalarda birinci sırayı Human immunodeficiency virus (insan bağışıklık yetmezlik virüsü; HIV) pozitif grup alırken, ikinci sırayı immün sistemi baskılanmış bireyler ve diğer gruplarda yapılan çalışmalar oluşturmuştur. Yapılan çalışma sonuçlarında fark-

TABLO 5: Kontrol grubu ile diğer gruplardaki ELISA (+) hastaların istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Kontrol	ELISA testi	χ^2	p
Kontrol (n=55)	2 (%3,6)	0,979	0,322
Onkoloji (n=156)	14 (%9,0)		
Kontrol (n=55)	2 (%3,6)	0,00	1,000
Diyaliz (n=98)	4 (%4,1)		
Kontrol (n=55)	2 (%3,6)	0,16	0,685
Gastroenteroloji (n=22)	2 (%9,1)		
Kontrol (n=55)	2 (%3,6)	0,00	1,000
Pediatri (n=178)	8 (%4,5)		
Kontrol(n=55)	2 (%3,6)	0,000	1,000
MAL. Çocuk (n=21)	1 (%4,5)		

MAL.: Malnütrisyonu.

lıklar bulunmakta ve bu farklılıklar da; coğrafik yerleşime, laboratuvar yöntemlerine, seçilen grupların farklılığına ve hastalığın farklı safhalarına bağlanmaktadır. HIV pozitif grup için 2002 yılında ortalama %32'lik oran bildirilmiştir.¹¹ Batero ve ark. akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, anti-HIV pozitif ve diğer immün yetmezliği olan 111 olguda en sık rastlanan parazitin *Cryptosporidium* türleri olduğunu bildirmişlerdir.¹² Ülçay ve ark., 2008'de yaptıkları bir çalışmada ishali immün sistemi baskılanmış 36 olgunun 3 (%8,6)'ünde *Cryptosporidium* saptamışlardır.¹³ Tanyüksel ve ark. 116 çeşitli kanserli hastaların 18 (%17,0)'ünde *Cryptosporidium* türleri rapor etmişlerdir.¹⁴ Refik Saydam Hıfzısıhha merkezinde diyaresi olan solid tümörlü 72 olguda *Cryptosporidium* araştırılmış ve kontrol grubu olarak da 50 sağlıklı birey çalışmaya alınmıştır. Hasta grubundaki 72 örneğin %8,3'ünde

Cryptosporidium oookistleri görölürken, kontrol grubundaki hiçbir örnekte *Cryptosporidium* oookistleri saptanmamıştır.¹⁵ Çalışmamızda immün sistemi baskılanmış olarak kabul edilen 98 hemodiyaliz, 156 onkoloji, toplam 254 hastanın 18 (%7,0)'inde *Cryptosporidium* antijeni saptandı. *Cryptosporidium* türleri saptanan 18 vakanın 14'ünü kanserli hastalar, 4'ünü hemodiyaliz hastaları oluşturmaktaydı. Kontrol grubu olarak çalıştığımız 55 sağlıklı bireyin 2 (%3,6)'sinde *Cryptosporidium* antijenleri saptandı. Sarı ve ark. 2003'te hemodiyaliz tedavisi gören 47 kronik böbrek yetmezlikli hasta ve 36 sağlıklı bireyin alındığı çalışmalarımda, *Cryptosporidium* türlerini hasta grubunda %6,4, kontrol grubunda %2,1 olarak bildirmişlerdir.¹⁴ Çalışmamızda 98 hemodiyalizli hastanın %4,08'inde ve kontrol grubunun %3,6'sında *Cryptosporidium* pozitif bulundu. Çalışmada diyaliz hastaları hem boyama hem de ELISA yönteminde pozitif saptandı.

Kontrol grubunda bulduğumuz seropozitiflik oranı (%3,6) çalıştığımız diğer grupların yüzdelere yakın bir orandır. Bunu kontrol grubumuzun sayısının az olmasına ve yine tesadüfen belirtisiz kriptosporidiozis enfeksiyonunun devam ettiği ya da oookist atılımı olmasa da organizmada antijenik ürünlerin olabileceği bireylerin bu grup içinde yer almış olmasına bağlamaktayız. Örneğin Coloroda'da randomize yapılan bir çalışmada %30 bireyin *Cryptosporidium* oookistleri attıkları ve bunların ancak 3 tanesinde semptomatik hastalığın bulunduğu bildirilmektedir.¹⁷ Gülhane Tıp Akademisi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji kliniğinde başka sebeplerle endoskopi uygulanan ancak kriptosporidiozis açısından asemptomatik olan 100 olgunun 3 (%3)'ünde *Cryptosporidium* oookistleri saptandığı bildirilmektedir.¹⁰

İmmün yetmezlik durumunun parazitik enfeksiyonlarına etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. İmmün yetmezlikli hastaların parazitlerin tüm tipleriyle enfekte olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur.¹⁸ *Cryptosporidium* türleri enfeksiyonlarında da immün yanıt tam olarak bilinmemektedir. Bağışık yanıt hakkındaki bilgilerin çoğu hayvan modelleriyle yapılan çalışmalardan öğrenilmiştir. Bu modellerde yapılan çalışmalarda en-

feksiyonun önlenmesinde ve/veya iyileşmesinde CD4 T lenfositleri ve gamma interferonun önemli rol oynadığı bildirilmektedir.¹⁹ HIV ile enfekte hastalarda akut sınırlı enfeksiyona sahip olanlarda CD4 sayısı >180 hücre/mm³, iken fulminant enfeksiyonlularda CD4 sayısının <50 hücre/mm³, olduğu bildirilmiştir.²⁰ Ayrıca sitokinlerden IL-5 ve IL-12'nin azalmasının *Cryptosporidium* enfeksiyonun şiddetlenmesinde etkili olduğu kanaatine varılmıştır.²¹ 1998'de Theodos akut ve kronik kriptosporidiozis kontrolünde CD4 lenfositlere bağımlı sistemik hücresel bağışıklığın önemli olduğuna, Mc Donald ve Boreroft da, hümoral bağışık yanıtın kriptosporidiozisten korunmada rol oynadığına vurgu yapmışlardır.^{22,23} Böylece özellikle HIV pozitif olanlar ile diğer immün yetmezliği olan bireylerde kriptosporidiozisin farklı klinik tablolar oluşturabileceği yorumlanmıştır. Çalışmamızda *Cryptosporidium* pozitifliği en çok kanser hastaları olmak üzere, immün yetmezliği olan hastalarda ve daha çok 40 yaş üstü yaşlarda görülmüştür. İmmün yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium* görülme oranı bu grupta 18 hasta ile (onkoloji+diyaliz, n=254) %7,0 olarak en yüksek oranda tespit edildi, ancak bu hastalarda CD4 T lenfositleri bakılmadı ayrıca bir hastanın dışında ciddi enterit bulgusu yoktu.

Çalışmamızda gastroenterit şikayeti ile gelen 178 çocuğun 8 (%4,49)'inde *Cryptosporidium* türleri saptanmıştır. Yine malnütrisyon tanısı almış 21 çocuğun 1'inde *Cryptosporidium* seropozitifliği saptanmıştır. Malnütrisyonlu çocuklar arasında kriptosporidiozisin daha yaygın olduğu ve daha ciddi seyrettiği bildirilmektedir.¹¹ İsrail'de yapılan bir çalışmada 221 malnütrisyonlu çocuğun %13,5 (n=30)'inde *Cryptosporidium* saptandığı, Hindistan'da diyareli 100 çocuktan 13'ünde *Cryptosporidium* saptandığı ve bu çocuklardan 6'sının malnütrisyonlu çocuklar olduğu bildirilmektedir.^{24,25} 2000 yılında yapılan bir çalışmada 71 malnütrisyonlu çocuğun 7'sinde, malnütrisyonlu 61 çocuğun 3'ünde *Cryptosporidium* oookistleri saptanmış ve malnütrisyonun kriptosporidiozis için risk taşımadığı sonucuna varılmıştır.²⁶ *Cryptosporidium* antijeni saptadığımız malnütrisyonlu çocuğun ishal ve karın ağrısı şikayetleri bulunmaktaydı.

Çocuklarda birçok paraziter etkenin prevalansı gibi *Cryptosporidium* prevalansı diğer yaş gruplarına göre daha yüksektir. Bu yaş grubundaki bireyler arasında fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması, temizlik kurallarına yeterli özenin gösterilmemesi ve immunitenin tam gelişmemiş olması bunun başlıca nedenleri olarak gösterilmektedir. *Cryptosporidium* 12 yaş altındaki çocuklarda, çocuk malnütrüsyonlu veya bağışıklık sistemi baskılanmış değilse, kendiliğinden iyileşen diyare etkenidir. İngiltere’de 867 gastrointestinal şikayeti olan 5 yaş altı çocuklarda *Cryptosporidium* görülme oranı %7 olarak bildirilmektedir.²⁷ Van’da yapılmış bir çalışmada 0-3 yaş grubunda ishali 202 çocuğun 6 (%2,9)’sında boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır.²⁸ Yeni Zelanda’da ishali 36 çocuğun %22’sinde, Hindistan’da 15 yaşından küçük ishali 682 çocuğun %13,1’inde *Cryptosporidium* türleri saptanmıştır.²⁹ Eskişehir’de 0-6 yaş grubunda ishali 607 çocuğun %3,6’sında *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır.³⁰ Çalışmamızda gastroenterit şikayeti ile gelen çoğunluğunu 5 yaş altı çocukların oluşturduğu 178 çocuğun 8 (%4,49)’inde *Cryptosporidium* saptanmıştır.

Çalışmamızda diğer bir grup gastroenterit şikayeti üzerine gastroenterolojiye başvuran bağışık sistemi yeterli erişkin hastalardı. Çalıştığımız 22 diyareli hastanın 2 (%9)’sinde *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır. İnceboz ve ark. aynı gruptaki 225 hastanın %0,4’ünde sadece kinyonun aside dirençli boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* ookistleri saptarken, Malatya’da yapılan diğer bir çalışmada bu oran %1,6’dır.^{23,31,32} Bu grupta saptadığımız iki pozitif vakanın hem ELISA hem de boyama yöntemleri sonucu pozitif idi.

Cryptosporidium enfeksiyonunun tüm dünyada görülebildiği ve sağlıklı bireylerde de salgınlara yol açabildiği ortaya konmuştur.^{33,34} Daha çok su kaynaklı bir patojen olan *Cryptosporidium* ookistleri, hem tatlı hem de tuzlu sularda aylarca enfekte olarak kalabilmektedir. Rutin klorlama ve ozonlamanın ookistler üzerine etkisi çok azdır veya hiç bulunmamaktadır.³⁵ Su kaynaklı kriptosporidiozis salgınlarının büyük bir çoğunluğunun kontamine içme suyuna bağlı olarak geliştiği

bildirilmektedir.³⁶ İngiltere’de salgınlar ile ilgili yapılan bir derlemede 1992-2003 tarihleri arasında su kaynaklı 80 salgının %69’una *Cryptosporidium* neden olduğu bildirilmiştir.³³ Çalışmamızda *Cryptosporidium* görülen hastaların 5’inin içme suyunu kuyu suyundan sağladıkları ve bu hastalardan 4’ünü gastroenterit şikayeti olan çocukların oluşturduğu saptanmıştır. Diğer bireylerden bir tanesi hariç hepsi şebeke suyunu kullanan hastalardı.

Cryptosporidium’un tanı ve türlerini tespit etmek amacıyla doku biyopsisi, dışkı boyama, IFAT, DFA, ELISA, PCR gibi teknikler kullanılabilir. Kriptosporidioziste tanı için en kolay tekniğin boyama ile dışkı taraması olduğu bildirilmektedir. Ookistlerin bolca lipid içermesi *Cryptosporidium*’un aside dirençli boyama yöntemleriyle boyanmasına olanak sağlamıştır. Modifiye aside dirençli boyama yönteminin en iyi yöntemlerden biri olduğu bildirilmektedir. Kırmızı-pembe boyanan ookistlerin mavi zemin üzerinde kolay bir şekilde ayırt edilebilmesi, ookistlerin iç yapısını ayrıntılı görülebilmesi ve kalıcı bir boya olması nedeni ile *Cryptosporidium* ookistlerinin tanısında kullanılması uygun bulunmuştur. Ancak parazitin yaşam döngüsünden dolayı, en az 3 dışkı örneğinin en az 24 saatlik aralarla incelenmesinin daha uygun olduğu bildirilmektedir.^{4,37-40} Çalışmamızda her hasta için bir dışkı örneği çalışılabilmiştir. Her ne kadar DFA testi altın standart olarak kabul edilse de, prospektif ve epidemiyolojik çalışmalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının saptanması ve izlenmesi için ELISA kitlerinin kullanılması önerilmekte, basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren ELISA’nın rutin çalışmalarda kullanılmasının da faydalı olacağı bildirilmektedir.^{8,41-43} Jayalakshmi ve ark. çalışmalarında, ishali olan 89 HIV’li hastanın dışkı örneklerini ELISA ve modifiye aside dirençli boyama yöntemleriyle incelemişler ve 11 (%12,4) örnekte pozitif sonuç elde etmişlerdir.²³ ELISA testinin duyarlılığını %99,9 ve özgüllüğünü %98,7 olarak bulmuşlardır. Tamer ve Gülenç çalışmalarında; gastrointestinal yakınma ile başvuran 80 olgu ve kontrol grubu olarak sağlıklı 65 kişinin dışkı örneklerini kriptosporidiozis yönünden Kinyon aside dirençli boyama yöntemi ve ELISA kiti ile incelemişlerdir.⁸ İncelenen 80 dışkı örneğinin 3

(%3,75)'ünde Kinyoun aside dirençli boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* oookistleri, ELISA ile yapılan değerlendirmelerde ise beş örnekte (%6,25) *Cryptosporidium* türleri özgül antijenlerin saptandığını bildirmişlerdir. *Cryptosporidium* ELISA kitinin bu çalışmada duyarlılığı %85, özgüllüğü %100, negatif prediktif değeri %97,4, pozitif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, boyama yöntemini baz alarak değerlendirdiğimizde, ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü %100, negatif prediktif değeri %100, pozitif prediktif değeri %54,83 olarak saptanmıştır. Testin doğruluk oranı %97,36 olarak hesap edilmiştir.

Çalışmamızda nativ preparasyon ve boyama ile değerlendirdiğimiz örneklerin toplam 25'inde bol oranda *Candida* türleri görüldü. İmmün sistemi baskılanmış grubun 17 (%6,7)'sinde pediatri grubunun 8 (%4)'inde *Candida* türleri her alanda bol oranda bulunmaktaydı. *Candida* türleri normal flora elemanı olarak bulunmaktadır. Ancak

özellikle immün yetmezliği olan bireylerde flora hakimiyeti kazanıp fırsatçı enfeksiyonlar yaptıkları da bilinmektedir.⁴⁴ Nativ-lugol preparasyon yöntemiyle örneklerin 61 (%11,5)'inde çeşitli protozoon kistleri ve 3 (%0,5)'ünde de *H. nana* yumurtaları görüldü. En fazla parazit saptanan grup pediatri grubu idi. Halk sağlığı açısından önemli bir problem olan ve basit yöntemlerle önlenilecek olan parazit hastalıkları, maalesef çocukluk yaş grubunda önemini hala korumaktadır.

Sonuç olarak hem immün sistemi baskılanmış hastalarda hem de gastroenterit şikayeti ile gelen normal hastalarda *Cryptosporidium* türlerinin de araştırılması, ayrıca bölgemizde *Cryptosporidium*'un araştırılmasında, boyama yöntemi ile birlikte direkt floresan antikor testi, ELISA gibi immün tanısal bir yöntemin de kullanılması gerektiği kanaatine varılmıştır. Çalışmamızdan sonra, *Cryptosporidium* araştırılması laboratuvarımızda rutin testler arasına girmiştir.

KAYNAKLAR

- John TJ, Petri AW. Markell and Vogle's Medical Parasitology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2006. p. 68-71.
- Ok ZÜ, Üner A, Korkmaz M. [Cryptosporidiosis]. Özcel MA, editör. İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. 1. Baskı. İzmir: Türkiye Parazitoloji Dern Yayını No 12; 1995. p. 23-42.
- Ok ZÜ, Balcioğlu İC. [Cryptosporidiosis]. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editörler. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1. Baskı. İzmir: Tıbbi Türkiye Parazitoloji Dern. Yayın No 22; 2007. p.363-76.
- Ok ÜZ, Girginkardesler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. [Stool examination methods]. Özcel MA, Altıntaş N, editörler. Parazit Hastalıklarında Tanı. 1. Baskı. İzmir: Türkiye Parazitoloji Dern. Yay No15; 1997. p.1-61.
- Börekeçi G, Otağ F, Emekdaş G. [The prevalence of *Cryptosporidium* in families in a slum District of Mersin, Turkey]. Turkish Journal of Infection 2005;19(1): 39-46.
- Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. [Cryptosporidium incidence in children with acute diarrhea and risk factors]. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2004;13(1): 16-9.
- Ramratnam B, Flanigan TP. Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. Postgrad Med J 1997;73(865):713-6.
- Tamer GS, Gülenç S. [The investigation of the presence of antibodies for *Cryptosporidium* spp. in fecal samples using ELISA]. Türkiye Parazitol Derg 2008;32(3):198-201.
- Çeliksöz A, Çelik S. [University hospital of the republic *Cryptosporidium* spp. gastroenteritis and malnourished patients]. Türkiye Parazitol Derg 2003;27(2):85-8.
- Özdemir ET, Tanyüksel M, Kuştimur S, Araz E, Uygun A,Can C, et al. [Investigation of *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic individuals with cryptosporidiosis]. Gulhane Med J 2002;44(3):249-53.
- Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2002;15(1):145-54.
- Botero JH, Castaño A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2003;45 (4):197-200.
- Ülçay A, Görenek L, Coşkun Ö, Araz E, Acar A, Eyigün CP. [Diagnosis of intestinal protozoa in patients with immune deficiency]. Türkiye Parazitol Derg 2008;32(4):328-33.
- Tanyüksel M, Gün H, Doğançlı L. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. Scand J Infect Dis 1995; 27(1):69-70.
- Yıldız M, Çöplü N, Kılıç S, Babür C, Öncül Ö, Esen B, et al. [Investigation of *Cryptosporidium* in patients with solid tumors who have diarrhea as enteric pathogens.] Türkiye Parazitol Derg 2001;25(1):1-8.
- Sarı C, Sarı K, Ertuğ S. [Patients with chronic renal failure frequency of blastocystis hominis and *Cryptosporidium* spp.]. Türkiye Parazitol Derg 2003;27(3):187-90.
- Diers J, McCallister GL. Occurrence of *Cryptosporidium* in home daycare centers in west-central Colorado. J Parasitol 1989;75(4): 637-8.
- Lewthwaite P, Gill GV, Hart CA, Beeching NJ. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. Curr Opin Infect Dis 2005;18(5): 427-35.
- Chen W, Harp JA, Harmsen AG. Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. Infect Immun 1993;61(9):3928-32.
- White AC. Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, other species). In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennet JE, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone; 2005. p.3215-28.

21. Urban JF Jr, Fayer R, Chen SJ, Gause WC, Gately MK, Finkelman FD. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *J Immunol* 1996;156(1):263-8.
22. Theodos CM. Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Adv Parasitol* 1998;40:87-119.
23. McDonald V, Bancroft GJ. Chemical immunology and allergy. In: Liew FY, Cox FEG, eds. *Immunology of Intracellular Parasitism*. 1st ed. Basel: Karger; 1998. p.103-23.
24. Sallon S, Deckelbaum RJ, Schmid II, Harlap S, Baras M, Spira DT. *Cryptosporidium*, malnutrition, and chronic diarrhea in children. *Am J Dis Child* 1988;142(3):312-5.
25. Jaggi N, Rajeshwari S, Mittal SK, Mathur MD, Baveja UK. Assessment of the immune and nutritional status of the host in childhood diarrhoea due to *cryptosporidium*. *J Commun Dis* 1994;26(4):181-5.
26. Solórzano-Santos F, Penagos-Paniagua M, Meneses-Esquivel R, Miranda-Novales MG, Leaños-Miranda B, Angulo-González D, et al. [*Cryptosporidium parvum* infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a Mexican rural population]. *Rev Invest Clin* 2000;52(6):625-31.
27. Marshall AR, Al-Jumaili IJ, Fenwick GA, Bint AJ, Record CO. *Cryptosporidiosis* in patients at a large teaching hospital. *J Clin Microbiol* 1987;25(1):172-3.
28. Çiçek M, Yılmaz H. [Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and other intestinal parasites in children with diarrhea]. *Dicle Med J* 2011;3(1):70-5.
29. Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and *cryptosporidiosis*. *Microbiol Rev* 1986;50(4):458-83.
30. Doğan N, Akgün Y. [Investigation of patients with diarrhea, *Cryptosporidium* oocysts]. *Türkiye Parazit Derg* 1998;22(3):243-6.
31. İnceboz T, Sarı B, Orhan V. [Investigation of *Cryptosporidium* in patients with gastrointestinal complaints]. *Türkiye Parazit Derg* 2002;26(2):149-50.
32. Atambay M, Daldal N, Çelik T. [Investigation of *Cryptosporidium* spp diarrheic stools in Malatya]. *Türkiye Parazit Derg* 2003;27(1):12-4.
33. Smith A, Reacher M, Smerdon W, Adak GK, Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect* 2006;134(6):1141-9.
34. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994;331(3):161-7.
35. Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol* 1998;84(6):1165-9.
36. Leav BA, Mackay M, Ward HD. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clin Infect Dis* 2003;36(7):903-8.
37. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. 1st ed. New York: CRC Press; 1990. p.199.
38. Sears CL, Kirkpatrick BD. *Cryptosporidiosis and isosporiosis*. In: Gillespie SH, Pearson RD, eds. *Principles and Practise of Clinical Parasitology*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 2001. p.139-64.
39. Kehl KS, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 1995;33(2):416-8.
40. Emre Z, Alabay M, Düzgün A, Çerçi H. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal spesimens. *Turk J Vet Anim Sci* 1997;21(4):293-6.
41. Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian J Pathol Microbiol* 2008;51(1):137-8.
42. Kuştimur S, Al Doğruman F, Tuncer C, Çamurdan Duyan A, Dalgıç B, Alagözlü H, et al. [Investigation of some protozoans with different diagnostic methods in patients with gastrointestinal discomfort]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(5):1260-6.
43. Srijan A, Wongstitwilairoong B, Pitarangsi C, Serichantalergs O, Fukuda CD, Bodhidatta L, et al. Re-evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp from stool specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36 (Suppl 4):26-9.
44. Alıcı Ö, Akbaş E, Alıcı S. [Opportunistic infections in cancer patients]. *Turkish Journal of Oncology* 2008;23(3):153-62.