

Cryptosporidium Ookistlerinin Tanısında Kullanılan Direkt Floresan Antikor Testinin Retrospektif Değerlendirmesi †

Akif Koray GÜNEY *, Kemal BİLGİN **, Nevzat ÜNAL ***, Murat HÖKELEK ****, Murat GÜNAYDIN ***

Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu** ve Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı***, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı****

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji laboratuvarında *Cryptosporidium* ookistlerinin tespiti için kullanılan direkt floresan antikor (DFA) testinin üç yıllık sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı, Ocak 2008 ve Kasım 2010 tarihleri arasında parazitoloji laboratuvarına gönderilen 390 dışkı örneğinin kayıtları kullanılarak retrospektif olarak araştırılmıştır.

Bulgular: DFA testi ile 183 örnek (%47) pozitif olarak bulunmuş ve pozitifliğin en fazla olduğu yaş grubu 0-10 yaş olarak tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin en fazla gönderildiği klinik gastroenteroloji kliniği olmuş ve pozitif hastaların %63'ünde herhangi bir bağışıklık sistemi bozukluğu tespit edilmemiştir.

Sonuç: Kriptosporidoz en sık çocuk popülasyonda görülmektedir. Parazit immunkompromize bireylerde ciddi ishallere neden olmakla birlikte, immunkompetan bireylerde de görülmektedir. Hastalığın yayılmasının engellenmesi ve tedavisi için tanıda duyarlılığı yüksek testlerin kullanılması son derece önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium*, direkt floresan antikor testi, dışkı

SUMMARY

Retrospective Evaluation of Direct Fluorescent Antibody Test for the Diagnosis of *Cryptosporidium* Oocysts

Objective: This study was conducted to retrospectively evaluate the results of direct fluorescent antibody (DFA) testing used for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in a 3-year period at Ondokuz Mayıs University Hospital, Samsun, Turkey.

Materials and Methods: A retrospective review of 390 stool samples sent to the parasitology laboratory between January 2008 and November 2010 for the investigation of *Cryptosporidium* spp. was performed by evaluation of the medical records.

Results: One hundred and eighty-three samples (47%) were positive by DFA test. The highest rate of positivity was detected in the 0-10 year- age group. Positive samples mostly belonged to patients admitted to the gastroenterology department. No immunosuppressive condition was detected in 63% of the positive patients.

Conclusion: *Cryptosporidiosis* is most commonly seen in children. Although the parasite causes serious diarrhea in immunocompromised patients, it can also be detected in immunocompetent individuals. Therefore, it is important to use methods with high sensitivity in the diagnosis of *cryptosporidiosis* to prevent the spread of the disease and to guide treatment.

Key words: *Cryptosporidium*, direct fluorescent antibody test, stool

GİRİŞ

Kriptosporidoz, su ve gıda kaynaklı salgınlara neden olabilen zoonotik bir enfeksiyondur ⁽¹⁾. *Cryptospori-*

dium türleri omurgalıların sindirim ve solunum sistemlerinin epitel hücrelerinde çoğalabilen koksidiyan parazitlerdir ⁽²⁾. Bu omurgalıların dışkısı içerisindeki ookistler dış çevreyi kontamine etmektedir ⁽³⁾. Parazit

Alındığı tarih: 01.06.2012

Kabul tarihi: 01.08.2012

Yazışma adresi: Akif Koray Güney, Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kırşehir

e-posta: drakifkorayguney@hotmail.com

†Bu çalışma "4th Eurasia Congress of Infectious Diseases" Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur (1-5 Haziran 2011; Saraybosna-Bosna Hersek)

insana ookistler tarafından kontamine edilmiş su ve gıdalar ile bulaşmaktadır (4). *Cryptosporidium* türleri özellikle çocuklar ve immun yetmezlikli hastalarda ishalin önemli nedenlerindedir (5).

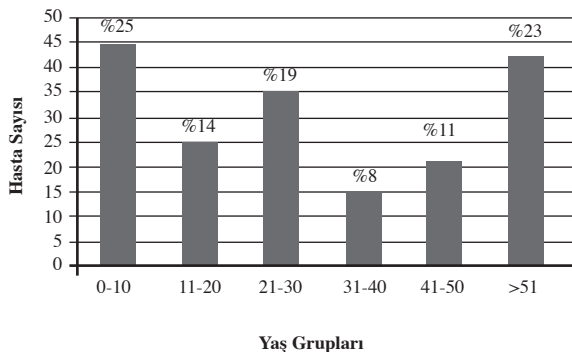
Kriptosporidoz tanısında, Kinyoun'un asit fast boyama yöntemi klasik yöntem olmasına rağmen, organizmanın küçüklüğü ve ookistlerin değişken boyanabilmeleri nedeniyle parazit gözden kaçabilmektedir (6). Ayrıca, yaymaları hazırlamak, boyamak ve incelemek için eğitilmiş mikrobiyolog ve fazlaca zaman ve efor gereklidir (7). Birçok kurumda, rutin tanı prosedür olarak, *Cryptosporidium* dışkı antijenlerinin tespitini sağlayan immun testler klasik yöntemin yerini almıştır (8). Rutinde çok kullanılmamakla birlikte, duyarlı bir yöntem olduğu bildirilen "polimeraz chain reaction" (PCR), kriptosporidoz için alternatif tanı metotları arasında yer almaktadır (9).

Çalışmamızda, *Cryptosporidium* ookistlerinin tespiti için laboratuvarımızda kullanılan direkt floresan antikor (DFA) testinin, Ocak 2008 ve Kasım 2010 tarihleri arasındaki sonuçlarını retrospektif olarak değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Ocak 2008 ve Kasım 2010 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* varlığı retrospektif olarak araştırılmıştır.

Dışkıdaki *Cryptosporidium* ookistlerin varlığı, DFA (Cellabs, Crypto/ Giardia Cel Australia) testi ile tespit edilmiş ve test üreticinin önerileri doğrultusunda



Şekil 1. Dekatlara göre DFA testi pozitif hastaların yaş dağılımı.

çalışılmıştır.

Çalışma dönemindeki toplam hasta sayısı, pozitif hasta sayısı, hastaların genel özellikleri ve klinik verileri hastanemizde kullanılan bilgisayar destekli otomasyon sisteminden elde edilmiş ve tekrar eden örnekler çalışmadan çıkarılmıştır.

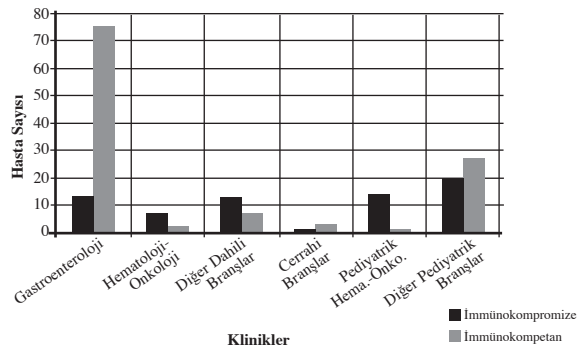
BULGULAR

Üç yıllık dönemde, kriptosporidoz şüphesi ile laboratuvarımıza toplam 390 dışkı örneği gönderilmiş ve bu örnekler arasında 183 örnek (%47) DFA testi ile pozitif olarak tespit edilmiştir. Hastaların 88'i (%48) erkek, 95'i (%52) kadın olup, yaş dekatlarına göre pozitif hastaların dağılımı Şekil 1'de gösterilmektedir.

Pozitif sonuçlar en fazla erişkin gastroenteroloji bölümünden gelen örneklerde saptanırken (88 örnek; %48), bunu çocuk hematoloji bölümü izlemiştir (12 örnek; %7). DFA testi pozitif 183 hastanın 68'inde (%37) bağışıklık sistemi baskılayan bir durum (kanser, AIDS, immünsüpresif ilaçlar, organ nakilleri vb.) mevcut olup, hastaların kliniklere göre bağışıklık durumları Şekil 2'de gösterilmektedir.

TARTIŞMA

Kriptosporidoz, çocuklarda ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, ciddi ishallerine neden olabilen zoonotik bir enfeksiyondur (10,11). Kontamine su teması, az endüstriyelmiş bölgelere seyahat, hayvan ve hayvan dışkısı teması, çocuk bakım merkezleri parazit bulaşı için risk faktörleri arasında sayılabilir (5).



Şekil 2. Hastaların klinikleri ve immün durumları.

Kriptosporidoz prevalansı ülkenin gelişmişlik durumunda göre değişmektedir. Bir çalışmada gelişmiş ülkelerdeki ishallerde hastalarda ortalama %2,2'lik bir oran, gelişmekte olan ülkelerdeki ishallerde hastalarda ise ortalama %6,1'lik bir oran bildirilmiştir ⁽¹²⁾. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise, Otağ ve ark. ⁽¹³⁾ Mersin'de ilköğretim öğrencilerinde, modifiye soğuk Kinyoun'un asitte dirençli boyama yöntemi ve Auramin-O boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* prevalansını %5,5 olarak bildirmiştir. Tamer ve ark. ⁽¹⁴⁾ Kocaeli'nde Kinyoun'un asitte dirençli boyama yöntemi ile %3,7'lik, ELISA ile %6,2'lik bir prevalans bildirmiştir. Tanyüksel ve ark. ⁽¹⁵⁾ neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* prevalansını %16,9 olarak bildirirken, Ok ve ark. ⁽¹⁶⁾ solid tümörü olan ishallerde hastalarda %35,5'lik bir prevalans bildirmiştir. Rosenblatt ve ark. ⁽⁷⁾ dışkı örneklerinin %34'ünde ELISA yöntemiyle, %36'sında indirekt floresan antikor (IFA) testi ile *Cryptosporidium* tespit etmiştir. Bialek ve ark. ⁽¹⁷⁾ dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* tespiti için yaptıkları çalışmada, ELISA yöntemi ile %46, DFA testi ile %45 pozitiflik tespit etmiştir. Aynı çalışmada, PCR testlerinin bu tespit oranlarını arttırmadığını saptamışlar ve DFA testinin duyarlılığını %95 bulmuşlardır. Biz de bu çalışmamızda, DFA testinin kullanıldığı üç yıllık periyotta, *Cryptosporidium* pozitifliğini benzer olarak %47 olarak tespit ettik.

İngiltere'de 62421 dışkı numunesi ile yapılan bir çalışmada, *Cryptosporidium* için en yüksek pozitiflik oranı 1-4 yaş grubunda bulunmuştur ⁽¹⁸⁾. Khan ve ark. ⁽¹⁹⁾ ise Bangladeş'te yaptıkları çalışmada, %44'lük bir oranla en yüksek *Cryptosporidium* pozitifliğini iki yaş altı grupta bulmuştur. Yine Davies ve ark. ⁽⁵⁾ özellikle beş yaş altı olmak üzere, kriptosporidozun çocuklarda daha yaygın olduğunu bildirmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan, 28636 hastanın dâhil edildiği üç yıllık bir sürveyans çalışmasında, en yüksek pozitiflik oranı 1-9 yaş grubunda bulunmuştur ⁽²⁰⁾. Biz de çalışmamızda, en yüksek *Cryptosporidium* pozitifliğini %25'lik (n=45) bir oranla 0-10 yaş grubunda tespit ettik (Şekil 1).

Cryptosporidium türleri, AIDS gibi bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde ciddi ishallerde neden olabileceği gibi, immünkompetan bireylerde de bulunabilen enterik patojenlerdir ⁽²¹⁾. Ookist çıkaran genel popülasyonun oranı gelişmiş ülkelerde %1-3, gelişmekte olan ülkelerde %10 olarak bildirilmiştir ⁽²²⁾. Mevcut

çalışmamızda, DFA testi pozitif 183 hastanın 115'inde (%63) bağışıklık sistemini baskılayan herhangi bir durum söz konusu değildi. Bu durum asemptomatik bir taşıyıcılığı işaret edebildiği gibi, akut veya persistan bir durumun varlığı da söz konusu olabilir ⁽²²⁾.

Laboratuvarımıza *Cryptosporidium* ookistlerinin tespiti için gönderilen dışkı örneklerinde, zaman alıcı ve deneyimli personel ihtiyacına neden olması nedeniyle, rutin olarak Kinyoun'un asitte dirençli boyaması çalışılmamaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda DFA testinin başka diğer bir yöntem ile karşılaştırması yapılamamıştır.

Sonuç olarak, çocuk yaş grubu ve immün yetmezlikli bireyler başta olmak üzere, hastaların dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin uygun bir şekilde tespit edilmesi, hem parazitin yayılmasının engellenmesi hem de kriptosporidoz tanısı ve tedavisi için son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **Current WL, Garcia LS.** Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:325-58. PMID:1889046 PMCID:358202
2. **Fayer R, Ungar BL.** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev* 1986; 50:458-83. PMID:3540573 PMCID:373083
3. **Fayer R.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veit Parasitol* 2004; 126:37-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.004> PMID:15567578
4. **Duffy G, Moriarty EM.** *Cryptosporidium* and its potential as a foodborne pathogen. *Anim Health Res Rev* 2003; 4:95-107. <http://dx.doi.org/10.1079/AHR200357> PMID:15134293
5. **Davies AP, Chalmers RM.** Cryptosporidiosis. *BMJ* 2009; 339:b4168. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.b4168> PMID:19841008
6. **Newman RD, Jaeger KL, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL.** Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2080-4. PMID:8370732 PMCID:265700
7. **Rosenblatt JE, Sloan LM.** Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1468-71. PMID:8314988 PMCID:265563
8. **Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causser L, Wilkins PP.** Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41:623-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.623-626.2003> PMID:12574257 PMCID:149727
9. **Dirim Erdoğan D, Dağci H, Turgay N, Akarca US, Alkan MZ.** Taze ve formaldehitte saklanmış dışkı örneklerinde kriptosporidozun moleküler tanısı. *Türkiye Parazit Derg* 2009; 33:120-4. PMID:19598087
10. **Tzipori S, Widmer G.** A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* 2008; 24:184-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2008.01.002> PMID:18329342 PMCID:2716703
11. **Chalmers RM, Giles M.** Zoonotic cryptosporidiosis in the

- UK-challenges for control. *J Appl Microbiol* 2010; 109:1487-97.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04764.x>
PMid:20497274
12. **Collinet-Adler S, Ward HD.** *Cryptosporidiosis*: environmental, therapeutic, and preventive challenges. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:927-35.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-0960-9>
PMid:20521158
 13. **Otağ F, Aslan G, Emekdaş G, Aydın E, Taylan Özkan A, Çeber K.** Mersin ilinde ilkököl öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2007; 31:17-9.
PMid:17471406
 14. **Sönmez Tamer G, Gülenç S.** Dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32:198-201.
 15. **Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H.** Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 1995; 19:56-63.
 16. **Ok ÜZ, Kavaklı K, Çetingül N.** Kemoterapi uygulanan tümörlü çocuklarda barsak parazitlerinin sıklığı. *Türkiye Parazitol Derg* 1995; 19:385-90.
 17. **Bialek R, Binder N, Dietz K, Joachim A, Knobloch J, Zelck UE.** Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:283-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00408-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00408-X)
 18. **Cryptosporidiosis** in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. Public Health Laboratory Service Study Group. *BMJ* 1990; 30:774-7.
 19. **Khan WA, Rogers KA, Karim MM et al.** Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71:412-9.
PMid:15516636
 20. **Yoder JS, Harral C, Beach MJ.** Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ* 2010; 59:1-14.
PMid:20535094
 21. **Meinhardt PL, Casemore DP, Miller KB.** Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiol Rev* 1996; 18:118-36.
<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017920>
PMid:9021307
 22. **Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF.** Cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 2002; 346:1723-31.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra013170>
PMid:12037153