

# İshalli hastalarda direkt fluorezan antikör-DFA yöntemi ile Giardia ve Cryptosporidium spp. araştırılması

*Investigation of Cryptosporidium spp. and Giardia by direct fluorescent antibody-DFA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea*

**Semra Özçelik\***, Serpil Değerli, Dilara Yıldırım

Parazitoloji Anabilim Dalı (Prof. Dr. S. Özçelik, Prof. Dr. S. Değerli), Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-58140 Sivas, Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Dr. D. Yıldırım), Sivas Numune Hastanesi, TR-58100 Sivas

## Özet

**Amaç.** Cryptosporidium spp. ve Giardia intestinalis insanda ishal nedeni olabilen önemli protozoonlardır. Bu parazitlerin tanısında etkensel tanı yöntemlerinin yanında antijen tarama testleri de kullanılabilir. Çalışmamızda ishallerde konvansiyonel yöntemlerle birlikte Direkt Fluorezan Antikör (DFA) yöntemi ile G.intestinalis ve Cryptosporidium spp. varlığının saptanması ve bu iki protozoonun gastroenterit olgularındaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem.** Sivas il merkezindeki üç hastanenin (Cumhuriyet Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Sivas Numune ve Sivas Devlet Hastanesi) çeşitli servislerine enterit yakınmalarıyla başvuran 32'si kadın, 68'i erkek toplam 100 ishallerde dışkı örneklerinde direkt inceleme ve asit-fast boyama yöntemi ile yapılan mikroskopik incelemelerde parazitlere ait kist ve/veya ookistler, DFA yöntemi ile parazitlere ait antijenler araştırılmıştır. İncelenen grupta yer alan hastalar 0-80 yaş aralığında bulunmaktadır. **Bulgular.** Çalışmada, ishallerde dışkı örneğinin 2'sinde direkt mikroskopide G.intestinalis görülmüştür. Asit-fast boyama ile birinde Cryptosporidium spp. görülürken, DFA ile 4'ünde (%4,0) Cryptosporidium spp., 2'sinde (%2,0) G. intestinalis antijenlerine rastlanmıştır. Cryptosporidium spp. saptanan hastaların erişkin yaş grubunda yer alması ilginç bulunmuştur. **Sonuç.** Cryptosporidium spp. ve G. intestinalis'in ikisini de içeren DFA testleri rutin çalışmalarda ve prevalans araştırmalarında kullanılabilen kolay, duyarlı ve güvenilir bir testtir. Diğer taraftan enterit nedenleri arasında sayılan bu iki protozoon incelenen hasta grubunda toplam %6 oranında bulunmuştur.

**Anahtar sözcükler:** Cryptosporidium spp., giardia intestinalis, DFA, ishal

## Abstract

**Aim.** Cryptosporidium spp. and Giardia intestinalis are important parasitic protozoan causing diarrhea in developing and developed countries. Diagnosis of the Cryptosporidium oocyst in stool samples by conventional microscopy is labor-intensive and time-consuming. Thus, we aimed the presence of these protozoa in patients with diarrhea and to evaluate the usefulness of direct fluorescent antibody (DFA) test in detecting Cryptosporidium spp and G.intestinalis. from fecal specimens. **Methods.** For this aim, microscopy and specific antigen detection methods were used to determine Cryptosporidium spp. and G.intestinalis. One hundred stool specimens were examined taken from patients with diarrhea whose ages ranged from 0 to 80 of applied to Hospital of Cumhuriyet University, Numune and Government Hospital in Sivas. All samples were tested for Cryptosporidium spp. G.intestinalis antigen by DFA and oocysts via gold Standard modified acid-fast staining for Cryptosporidium spp.and G.intestinalis direct microscopy. **Results.** One specimen was found to be positive by modified acid-fast staining method and four specimens by DFA method were found to be positive for cryptosporidiosis. On the other hand two specimens were found to be positive both direct microscopy and DFA for giardiasis. **Conclusion.** The results of DFA test indicate that the simple, rapid, reliable, and standardized test is sensitive and specific for routine diagnosis and may be useful for large-scale epidemiological studies of cryptosporidiosis and giardiasis.

**Keywords:** Cryptosporidium spp., giardia intestinalis, DFA, diarrhea

**Geliş tarihi/Received:** 14 Ekim 2014; **Kabul tarihi/Accepted:** 08 Aralık 2014

**\*İletişim adresi:**

Dr. Semra Özçelik, Parazitoloji Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-58140 Sivas. E-posta: ozceliksemra@yahoo.com

**Giriş**

Cryptosporidiosis farklı genotipteki *Cryptosporidium* spp.'lerin insan ve hayvanlarda asemptomatik enfeksiyondan akut enterik hastalıklara kadar değişebilen tablolara yol açtığı bilinen bir hastalıktır [1]. İnsanlarda 1982 yılına kadar daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerin enfeksiyonu olarak bilinen cryptosporidiosisin özellikle laboratuvar tanı yöntemlerinin gelişmesiyle bağışıklık sistemi sağlam bireylerde de görülebileceği ve hastalık oluşturabileceği belirlenmiştir [2, 3]. *Cryptosporidium* spp. insandan insana direkt temasla, su veya besin yoluyla, hayvanlarla temas yoluyla, hava yoluyla, toprak ve taşıyıcı konaklarla, indirekt yolla ve seksüel yolla bulaşabilir [2]. *Cryptosporidium* enfeksiyonu ilk defa 1907 yılında Tyzzer tarafından farelerde gösterilerek tanımlanmıştır. 1980 lerde AIDS li hastalarda ölüme yol açan zoonotik bir hastalığın etkeni olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [1-3]; 1990 larda özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde salgınlar oluşturduğu ve sağlam bireylerde de hastalık yapabildiği bildirilmiştir. Ayrıca aynı dönemlerde seyahat ishallerinden sorumlu olduğu belirlenmiştir [4, 5].

Araştırmalarda farklı yöntemler kullanılmış olsa da geri kalmış ülkelerde, 2 yaş altı çocuklarda [6-8], evcil hayvan besleyenlerde [9], gastroenteritlerde [10, 11], beslenme yetersizliklerinde [11], homoseksüellerde, immünyetersiz bireylerde, seyahat edenlerde, sıcak ve nemli ortam ve mevsimlerde enfeksiyonun daha sık görüldüğü bildirilmektedir [2]. Bu çalışmaların bazılarında *Cryptosporidium* ookistlerinin klorlanmış sularla veya herhangi bir işleme tabi tutulmayan sularla enfeksiyona neden olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca infekte insan ve hayvan dışkılarıyla kontamine olmuş havuzlar ve göllerin birer kaynak olabileceği saptanmıştır [12-15].

Cryptosporidiidae ailesine bağlı 22 *Cryptosporidium* türü adlandırılmıştır. *C. parvum* türü ise bazı memeli hayvanlardan ve insandan (genotip 2) bildirilen en yaygın türdür ve 7 farklı genotipinin bulunduğu bildirilmiştir. Zoonoz karakterdeki *C. parvum* ile anthroponotik karakterdeki *C. hominis* insandaki cryptosporidiosisden en sık sorumlu olan etkenlerdir [16].

*G. intestinalis*, enterik bir protozoon olup, sanayileşmiş ve gelişmiş ülkelerde ishal, malabsorpsiyon ve gelişme geriliği nedeni olarak bilinmektedir. Gelişmekte olan ülkelere asemptomatik enfeksiyonlar daha yaygındır ve diyare nedeni olmaları soru işaretleriyle karşılanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise ishal nedeni olmakla birlikte enfeksiyona genel popülasyonda %5 civarında rastlanmaktadır. Çocuklarda ise bu oran %30'lara kadar çıkabilmektedir. Çocuklarda malabsorpsiyonun eşlik ettiği, akut ve persistan diyareye neden olduğunu belirten yayımlar da, akut diyareyle ilişkisi olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır. Deneysel çalışmalarla *G. intestinalis*'in bazı suşlarının gönüllü sağlıklı bireylerde diareye neden olduğu gösterilmiştir [17].

*G. intestinalis*'in infekte bireylerde tanısı, dışkı incelemelerinde mikroskopik olarak, parazitin kist ve/veya trofozoitlerinin görülmesiyle konmaktadır. Kist sayısının az olduğu durumlarda ise bulunamayabilir. Bu ve benzer nedenlerle günümüzde dışkıda antijen arayan ELISA (duyarlılık %90-100, özgüllük %100) ve Direkt Floresan Antikor testi (DFA) (duyarlılık ve özgüllük her ikisi de %100) de tanıda kullanılmaktadır [18].

Bu çalışmadaki amacımız, gastroenterit tanısı alan kişilerde *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp. nin prevalansını DFA yöntemiyle saptamak ve ishallerde bu iki protozoonun rolünü belirlemeye çalışmaktır.

## Gereç ve yöntem

Çalışmada, Nisan 2012 ile Eylül 2012 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Sivas Numune ve Devlet Hastanelerine başvuran 100 ishali hastanın dışkıları incelenmiştir. Hastaların 24'ü 0-16 arası çocuk yaş grubunda yer alırken, 66'sı 17 yaş ve üzerinde bulunmaktaydı.

Dışkı örneklerinin toplanması: Dışkı örnekleri yukarıda belirtilen tarihler arasında toplanmıştır. Dışkı örneği toplanacak kişiler çalışma ile ilgili olarak bilgilendirilmiş ve onayları alındıktan sonra dışkıları toplanmıştır. Dışkılar su çekmeyen dışkı kaplarına alınmış, kutu üzerindeki etiketlere gerekli açıklamalar yazılmış (Hastaların yaşları, cinsiyetleri, geldikleri klinikler v.b.)ve aynı gün incelemeye alınmıştır. Direkt inceleme ve asit fast boyaması için gerekli işlemler bir taraftan yapılırken örneklerin bir bölümü DFA için %10'luk formaline konmuştur.

Toplanan örneklerin incelenmesi: Tüm örnekler öncelikli olarak çoklaştırma yöntemleri uygulanarak;

1. Direkt inceleme: Lam lamel arası, serum fizyolojik ve lugol ile yapılmıştır.
2. Modifiye Asit Fast (MAF) boyama yöntemi için yayma preparatları hazırlanmış ve 100x lik objektifle *Cryptosporidium* spp. yönünden incelenmiştir.
3. DFA testi: Çalışmada immunofluoresan testi (MERIFLUOR® C/G, Cincinnati, Ohio USA) kullanılmıştır. Testler üretici firmanın önerdiği şekilde çalışılmış ve fluoresan mikroskobunda değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Gastroenterit yakınmalarıyla başvuran 100 gastroenteritli hastanın 2'sinde direkt mikroskobide *G. intestinalis* görülmüştür. Aynı hastaların DFA testleri de pozitif saptanmıştır.

Asit-fast boyama ile hastaların birinde *Cryptosporidium* spp. görülürken, DFA ile 4'ünde (%4,0) *Cryptosporidium* spp. antijenlerine rastlanmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1. İshalli hastalarda tanı için kullanılan yöntemler ve saptanan sonuçlar.**

Araştırılan parazit	Araştırılan grup	Araştırma yöntemi									
		Direkt mikroskopi		Asit-fast		DFA					
		+	-	+	-	+	-				
		Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)				
<i>Giardia intestinalis</i>	Gastroenterit n: 100	2	2,0	98	98,0	GMD*	GMD	2	2,0	98	98,0
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Gastroenterit n: 100	GMD	GMD	1	1,0	99	99,0	4	4,0	96	96,0

**GMD:** Görülmedi

Her iki parazit birlikte aynı hastada saptanmamıştır. Bu nedenle her iki protozoon, 100 hastanın 6'sında saptanmıştır. Çalışmaya alınan 24 çocuk hasta Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nden, 66 erişkin hasta ise başta İç Hastalıkları Kliniği'nden olmak üzere İnfeksiyon, Gastreteroloji, Nefroloji kliniklerinden gelmişlerdir. Çalışmada saptanan pozitifliklerin hepsinin 17 yaş ve üstü grupta saptanmış olması ilginç bulunmuştur. Çocuk hastaların hiç birinde herhangi bir paraziter etkene rastlanmamıştır.

Erişkin hasta grubunun 28'i kadın, 48'i ise erkek hastalardı. Kadın hastaların ikisinde DFA ile *Cryptosporidium* spp., erkek hastaların da ikisinde *Cryptosporidium* spp. ikisinde *G.intestinalis* saptanmıştır.

Çalışmada direkt mikroskopi incelemelerinde bir hastada *Entamoeba histolytica* trofozoitlerine rastlanmış ve antijen tarama testi(ELISA) ile sonuç doğrulanmıştır. Ayrıca 10 olguda *Blastocystis hominis* de direkt mikroskobik incelemelerde gözlenmiştir.

## Tartışma

İnsanda ilk cryptosporidiosis olgusu 1976 yılında bildirilmiştir. İlk yıllar özellikle immun sağlam bireylerde semptomsuz seyrettiği bildirilmişse de daha sonra yapılan çalışmalarla parazitin bu bireylerde de gastroenterit oluşturabildiği belirtilmiştir. Ancak immun sistemi bozuk bireylerde ölümcül olabilmesi bu bireylerdeki durum üzerine ilgiyi çekmiştir. Cryptosporidiosis AIDS hastalarında ağır seyretmekte olup, yaşamı tehdit edebilmekte, solunum sistemi, karaciğer, safra yolları gibi doku ve organlarda da parazit saptanabilmektedir [1-3].

Tzipori, bu parazit ile ilgili yapmış olduğu deneysel çalışmalarla birçok hayvan ve insanı farklı izolatlarla enfekte edebilmiş, hatta insan ve hayvanlar arasında bazı geçişlerin olabileceğini saptamıştır [2].

Parazitin ookistlerinin normal su şebekelerinde kullanılan su dezenfeksiyonlarına karşı dirençli olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Klorlanan sulardan dahi bulaşma kapasitesi olan ookistlere bağlı olarak birçok su kaynaklı salgınlar da oluşmuştur. 1989 yılında İngilterede oluşan salgında 5000 kişi, 1993'te ABD'de çıkan salgında 400 000 den fazla kişi *Cryptosporidium* spp.den etkilenmiştir. Amerika'da The Center for Disease Control and Prevention (CDC) 1993-1994'te oluşan su kaynaklı salgınların %71'inden *Cryptosporidium* spp. ve *G.intestinalis* 'in sorumlu olduğunu bildirmiştir [4, 5].

Parazitin konak hücreye yapışmasında; apikal bölgeden salınan reseptörlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Başlıca reseptörler; GP900, GP40, Trap-C1, P23, Cpa135, CPS-500, CSL, CP12 ve CP2'dir. Parazit, konak hücre zarına yapıştıktan sonra oluşturulan parasitoforus vakuol içine yerleşmektedir. Bu özellik nedeniyle parazit hücre içinde ancak sitoplazma dışında yerleşmektedir.

Cryptosporidiosis'in prevalansı ülkenin gelişmişlik durumunda göre değişmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki ishallerde hastalarda ortalama %2,2'lik bir oran, gelişmekte olan ülkelerdeki ishallerde hastalarda ise ortalama %6,1'lik bir oran bildirilmiştir [2].

Cryptosporidiosis'in ülkemizdeki yaygınlığına yönelik yapılan çalışmalarda farklı yöntemler kullanılarak; ishallerde çocuklarda Elgün ve Koltaş [7] %24,03; Özçelik ve ark. [10] %11,8; Doğan ve Akgün [19] %3,6; Aydın ve ark. [20] tarafından %20, Çeliksöz ve ark. [11] tarafından %19,8 oranında, Sönmez ve ark. [21] %6,25; Yılmaz ve ark. [8] %4,9 saptamışlardır. Bu çalışmalardan bazıları ELISA ve Asit-fast ile elde edilen sonuçlardır. DFA ile elde etmiş olduğumuz %4'lük oran son iki çalışmaya yakın bulunmuştur. Yukarıdaki çalışmaların hiç birinde DFA kullanılmamıştır.

Cryptosporidiosis'in dünyadaki yaygınlığı, yapılan çalışmalardan bazılarında; Avrupa'da ve Amerika'da %1-3, gelişmekte olan ülkelere ise %5-10 arasında değiştiği bildirilmiştir. Su kaynaklı salgınlar ise İngiltere ve Amerika Birleşik Devletlerinden bildirilmiş olup bunlardan 1993 te Milwaukee'de çıkan salgında 403 000 kişinin *C. hominis* ile enfekte olduğu saptanmıştır [4, 5].

*Cryptosporidium* tanısı için çeşitli testler geliştirilmiştir. Mikroskopi yöntemi bunların başında gelir. Dışkı veya dokulardan ookistleri ayırt edici boyama yöntemleri kullanılarak tanıya gidilebilir. Modifiye asid-fast boyama yöntemi bunlar içinde maliyeti ve yöntem kolaylığı nedeniyle en çok tercih edilendir ancak duyarlılığı oldukça düşüktür. Poliklonal ve monoklonal antikorların immun işaretlenmesiyle geliştirilen tanı (DFA, ELISA. gibi) duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek ama daha pahalı tekniklerdir [8, 18, 21, 22].

Son dönemlerde tanıya eklenen PCR yöntemi ise çok daha duyarlı ve özgüldür. PCR amplifikasyon teknikleri, ookist duvar proteinleri, rRNA'nın küçük alt ünitleri, beta tübülün, TRAP-C1, TRAP-C2, ITS1, Poly-T, DHFR veya unknown DNA ve mRNA parçacıklarından oluşturulan primerler kullanılarak tanı konulabilir [23].

Son yıllarda DFA yöntemi *Cryptosporidium* ookistlerinin aranmasında duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu da belirlendiğinden sıklıkla kullanılmaktadır. *Cryptosporidium* için

hazırlanan IFA ya da Direkt fluoressan antikor (DFA) kitleri günümüzde sıkça kullanılmakta olup bu kitler aynı zamanda Giardia intestinalis tanısını da yapabilecek şekilde piyasaya sunulmaktadır. Tanıda fluoressan mikroskopu altında ookistler karanlık zeminde parlak yeşil renkte görülmektedir. Bu yöntemle tür düzeyinde tanı konulamamaktadır [18].

Cryptosporidium'un serolojik testlerde kullanılan moleküler ağırlığı 15-17 kDa olan iki temel hedef antijeni bulunmaktadır. Bunlar Cp17 (gp15)ve 27 kDa antijen olarak da bilinen Cp23 antijenleridir [16].

Giardia intestinalis ise, ılıman bölgelerden tropikal kuşağa kadar insanlarda görülen önemli bir barsak protozoonudur. Birçok hastada asemptomatik görülmesine rağmen, kommensal olarak da adlandırılmamaktadır. Parazite kırsal bölgelerde iyi, yeterli ve dengeli beslenemeyen toplumlarda malnütrisyon ve malabsorpsiyon gibi çocuklarda çok ağır seyredilebilir sorunlar oluşturabilmektedir. Sağlıklı görünen bireylerin bir kısmında yağlı dışkılamaya-steatorhe'ye yol açan G.intestinalis dünyada turist ishali olarak bilinen tablonun da bir üyesidir. Parazit insandan insana fekal oral yolla, kontamine su ve besin maddeleri ile uygun kist formunun ağızdan alınması ile oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ve Amerika dahil birçok gelişmiş ülkede endemik olduğu bilinmektedir. İlk kez Colorado'da bir salgından söz edilmekte ve lağım sularının içme sularına karışması nedeniyle %23 oranında G. intestinalis'e rastlandığı bildirilmiştir. Daha sonra Amerika'dan 95 salgın daha bildirilmiş ve bu salgınlardan 20 000'nin üzerinde insanın etkilendiği rapor edilmiştir [17].

Ülkemizde 1982-1996 yılları arasında yayınlanmış yayınların değerlendirilmesi ile hazırlanan bir çalışmada mikroskopik olarak araştırılan 316 095 dışkı örneğinin 38 822'sinde (%12,28) G.intestinalis görüldüğü belirtilmiştir. Yaş gruplarına göre değerlendirme yapıldığında 0-15 yaş grubunda %13,8; erişkin yaş grubunda ise %11,2 oranında G. intestinalis saptanmış olduğu görülmektedir [24]. Bu bulgulardan aslında erişkin ve çocuk yaş gruplarındaki farkın önemli olmadığı görülmektedir. Ancak çalışmada hastalıkla ilgili bulgu ve klinik ile ilgili verilere yer verilmemiştir. Günümüzde bu oranların daha da azalmış olduğu son taramalarla da görülmektedir [18]. Bu nedenle çalışmış olduğumuz grupta görülen %2 oranı yine bölgemizde yapılan çalışmalarda saptanan genel sıklığı yansıtmaktadır.

Çocuk yaş grubunda hiç rastlanmamış olması ve sadece iki hastada görülmüş olması incelediğimiz grupta ishal etkeni olarak bu parazitin sorumlu olamayacağı düşüncesini doğurmaktadır.

Giardiosisli hastalarda klinik olarak sıkça ishal, zaman zaman kabızlık görülür. Dışkı gevşek ve sulu, nadiren kanlı ve zaman zaman da yağ içermektedir. Abdominal ağrı, bulantı, kusma, iştahsızlık, karında gaz, şişkinlik, yorgunluk hali gibi belirtiler görülebilmektedir. Laboratuvar tanısında etkensel tanının yanında indirekt tanı yöntemleri de kullanılabilir [17, 25, 26]. İmmunodiagnostik amaçla kullanılan kitler, direkt fluoressan antikor testi (DFA), ELISA ve immünokromatografik dipstick testlerdir. Koproantijenik tanı yöntemleri kolay ve kısa zamanda sonuç veren testlerdir. Bu testlerin mikroskopi ile birlikte kullanılması önerilmektedir [27, 28].

Giardia'nın plazma membranı bütünüyle VSP(variant yüzey protein) ile kaplıdır. Hücre iskeletinde ise alfa-1 Giardin, 7,3 Giardin, Beta-Giardin ve beta-tubulin gibi çeşitli antijenik özellikteki proteinler bulunmaktadır. Bunlara karşı geliştirilen monoklonal antikorlar da antijen tarama testlerinde kullanılmaktadır [17].

Sonuç olarak; cryptosporidium spp. ve G. intestinalis 'in ikisini de içeren DFA testleri rutin çalışmalarda ve prevalans araştırmalarında kullanılabilen kolay, duyarlı ve güvenilir bir testtir. Diğer taraftan enterit nedenleri arasında sayılan bu iki protozoon bu olgularda bakteriyolojik ve viral etkenlerin yanında mutlaka araştırılmalıdır.

## Kaynaklar

1. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 2004; 6: 773-85.
2. Tzipori S, Widmer G. A hundred year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* 2008; 24: 184-9.
3. Mosier DA, Oberst RD. Cryptosporidiosis. A global challenge. *Ann NY Acad. Sci* 2000; 916: 102-11.
4. Richardson AJ, Frankenberg RA, Buck AC, Selcon JB, Colbourne JW, Mayon-White RT. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiol. Infect* 1991; 107: 485-95.
5. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Eng J Med* 1994; 331: 161-7.
6. Çiçek M, Yılmaz H. İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve diğer barsak parazitlerinin yaygınlığı, *Dicle Medical Journal* 2011; 38: 70-5.
7. Elgun G, Koltas IS. Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitol. Res* 2011; 108: 395-7.
8. Yılmaz H, Tas Cengiz Z, Cicek M. Investigation of cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Med J* 2008; 29: 526-59.
9. Ozcelik S, Poyraz Ö, Kalkan K, Malatyali E, Degerli S. The investigation of *Cryptosporidium* spp. prevalence in cattle and farmers by ELISA. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*. SA 2012: 61-4.
10. Özçelik S, Dökmetaş S, Sümer Z, İçağasioğlu D, Dökmetaş İ. Gastroenteritlilerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı *Türk. Parazitol. Derg* 1996; 20: 333-7.
11. Çeliksöz A, Çelik S. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde gastroenteritli ve malnütrisyonlu hastalarda *Cryptosporidium* spp. Araştırması. *Türk Parazitol Derg* 2003; 27: 85-8.
12. Graczyk TK, Kacprzak M, Neczaj E, Tamang L, Graczyk H, Lucy EF, Girouard AS. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. *Environmental Research* 2008; 106: 27-33.
13. LeChevalier, MW, Norton, WD, Lee, RG. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57: 2610-6.
14. Lonigro A, Pollice A, Spinelli R, Berrilli F, Di Cave D, D'Orazi C, Cavallo P, Brandonisio O. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72: 7916-78.
15. Madore, MS, Rose, JB, Gerba, CP., Arrowood, MJ, & Sterling, CR. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *Journal of Parasitology* 1987; 73: 702-5.
16. Üner A, Tanrıverdi S, Caner A, Değirmenci A. *Cryptosporidium*'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar. Moleküler Parazitoloji içinde. Ed. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, Meta Basım, İzmir 2009; 22.
17. Ak M, Türk M, Güneş K. Giardiosis. Tıbbi Parazit Hastalıkları içinde. Ed: MA Özcel. Meta basım, İzmir 2007; 323-44.
18. Uyar Y, Özkan AT. Amebiyazis, giardiyazis ve kriptosporidiazis tanısında antijen tarama yöntemlerinin yeri. *Türkiye Parazitoloji Derg* 2009; 33: 140-50.
19. Doğan N, Akgün Y. İshalli olgularda *Cryptosporidium* oocistlerinin araştırılması. *Türk. Parazitol. Derg* 1998; 22: 243-6.

20. Aydın F, Katircioğlu İ, Köseahmet F, Bakır T, Bingöl R. Kronik diyareli hastaların dışkı örneklerinde Kriptosporidiumun belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg.* 1995; 9: 151-5.
21. Sönmez TG, Gülenç S. Diskida *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2008; 32: 198-201.
22. Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 274-9.
23. Melrose W, Johnson K, Nimmo G. Use of multiplex real-time PCR to improve the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human faecal samples. *Amer.Soc. Trop. Med & Hygiene* 2007; 77: 76.
24. Özçelik S, Değerli S. Türkiye’de Giardiosis. *T.Parazitol. Derg* 1998; 22: 292-8.
25. Muhsen K, Levine MM. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin.Infect Dis* 2012; 55: 271-93.
26. Veenemans J, Mank T, Ottenhof M, Baidjoe A, Mbugi E, Demir AY, Weilders JP, Savelkoul HF, Verhoef H. Protection against diarrhea associated with *Giardia intestinalis* is lost with multi-nutrient supplementation: A study in Tanzanian Children. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: 1158.
27. Doğruman Al F, Kuştimur S, Özekinci T, Balaban N, İlhan MN. The use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Direct Fluoresan Antibody (DFA) methods for diagnosis of *Giardia intestinalis*. *Acta Parasitologica Turcica* 2006; 30: 275-8.
28. Weitzel T, Dittrech S, Möhl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Eur Soc Clin Micro Inf Dis* 2006; 12: 656-9.