

## İshalli Hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemleriyle Araştırılması

### Investigation of *Cryptosporidium parvum* by ELISA and Modified Ehrlich-Ziehl-Neelsen Stain Methods in Patients with Diarrhea

Şahin DİREKEL<sup>1</sup>, İbrahim Halil ÖZEROL<sup>2</sup>, Rıza DURMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

<sup>2</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

#### Özet

**Amaç:** *Cryptosporidium* türleri gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ishale neden olan parazitler arasında önemli bir yere sahiptir. Özellikle *Cryptosporidium parvum*, immun sistemi baskılanmış kişilerde ölümcül ishalleri neden olabilmektedir ve ayrıca içme sularıyla taşınabildiği için halk sağlığını tehdit edebilmektedir. Bu çalışmada *Cryptosporidium parvum*'un saptanması için kullanılan iki yöntemin karşılaştırılması amaçlandı.

**Yöntem:** Bu çalışmada, Malatya Huzurevi sakinleri ile İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'ne başvuran ishalleri toplam 92 kişiden alınan dışkı örneklerinde, ELISA yöntemiyle *Cryptosporidium parvum* koproantijenleri ve modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle ookistleri araştırılmış; iki yöntem istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Toplam beş örnekte hem ELISA ile hem de modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır. ELISA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü bu çalışmada %100 olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Özellikle immun yetmezlikli ishalleri hastalarda *Cryptosporidium parvum* tanısında hızlı, ucuz, kolay uygulanabilen bir yöntem olan modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen yönteminin rutin uygulamalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *Cryptosporidium parvum*, ELISA, modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen, ishal.

#### Abstract

**Objective:** *Cryptosporidium spp* are important agents causing diarrhea in developing and developed countries. The agent causes severe life-threatening diarrhea especially in immunocompromised hosts. Furthermore, transmission of *Cryptosporidium parvum* by of drinking water threatens public health. The aim of this study was to compare the two methods used in determining *Cryptosporidium parvum*.

**Method:** In this study 92 stool specimens from inhabitants of Malatya Rest Home and patients with diarrhea applied to Inonu University Turgut Ozal Medical Center in Malatya are investigated for *Cryptosporidium parvum* copro-antigens by ELISA and oocysts via modified Ehrlich-Ziehl-Neelsen staining and both methods are compared statistically.

**Results:** Five specimens are found to be positive by both ELISA and modified Ehrlich-Ziehl-Neelsen. The sensitivity and specificity of ELISA was 100% in this study.

**Conclusion:** Modified Ehrlich-Ziehl-Neelsen staining method can be used especially in immunocompromised patients with diarrhea as it is a rapid, cost-effective and easily applicable method for routinely diagnosis of *Cryptosporidium parvum*.

**Key Words:** *Cryptosporidium parvum*, ELISA, modified Ehrlich-Ziehl-Neelsen, diarrhea.

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(1):20-25

Geliş Tarihi : 16.11.2007

Kabul Tarihi : 17.01.2008

#### Yazışma Adresi:

Şahin DİREKEL,

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

33079- Mersin

Tel : 324 3374300/1541,

Faks : 0 324 341 24 00

E-posta : sdirekel@yahoo.com

Bu çalışma, II. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur (25-29 Eylül 2000, Şanlıurfa).

## Giriş ve Amaç

Gelişmekte olan ülkelerde her yıl 3.1 milyon çocuk ishalden yaşamını yitirmektedir (1). *Cryptosporidium* türleri tüm dünyada insanlar, diğer memeliler ve kuşlarda gastroenterit nedenidir ve gelişmekte olan ülkelerde yüksek görülme sıklığına sahiptir. Sağlıklı kişilerde asemptomatik infeksiyon veya kendiliğinden geçen infeksiyonlara neden olurken, insan immun yetmezlik virüsü (human immunodeficiency virus; HIV) ile meydana gelen infeksiyonlarda, organ transplantasyonu gibi ileri tıbbi tedaviler sonucunda meydana gelen immunsupresyonda ve yaşlı kişilerde ağır seyirli ishallerine neden olabilmektedir. *Cryptosporidium* türleri dünyada oldukça yaygın bir dağılım göstermektedir (2-4).

*Cryptosporidium* türleri kontamine su ve besinlerle veya infekte havuz, göl ve ırmak sularıyla bulaşmaktadır (3-7). İçme sularının klorlanması *Cryptosporidium* infeksiyonlarına karşı yeterli koruma sağlayamamaktadır (6). Bunun yanı sıra fekal-oral yolla kişiden kişiye ya da rezervuar hayvanlardan insanlara zoonotik olarak geçebileceği bildirilmektedir (2-4, 6,7). Hastaneler, huzurevleri ve çocuk yuvaları gibi kalabalık yerlerde bulaşın daha çok olduğu ve infeksiyonun çocuklarda yetişkinlere göre daha çok görüldüğü bildirilmektedir (2,5).

Diğer protozoon infeksiyonlarında olduğu gibi, *Cryptosporidium* türleri ile karşılaşan kişilerde genellikle asemptomatik taşıyıcılık gelişmektedir. Önceden sağlıklı olan kişilerde hastalık gelişince kansız sulu ishal ile karakterize, genellikle kendi kendini sınırlayan enterokolit gelişmekte, ortalama 10 günden sonra spontan remisyonlar görülmektedir (7).

*Cryptosporidium* infeksiyonlarının yayılmasını etkileyen risk faktörleri arasında sosyoekonomik durum, yaş, evcil hayvanlarla yakın temas, kötü hijyen koşulları sayılmaktadır (4).

Dışkıda *Cryptosporidium* ookist izolasyon şansını artırmak için modifiye çinko sülfat flotasyon tekniği veya Sheatler'in şeker flotasyon metodu önerilmektedir. İmmun yetmezliği olan ishalli hastalardan elde edilen dışkı örneklerinden konsantrasyona gerek kalmadan bol sayıda *Cryptosporidium* ookisti saptanabilmektedir (7). Konsantre edilen örneklerdeki ookistler, modifiye aside rezistan boyama veya Auramin boyama yöntemi ile gösterilebilmektedir. Ayrıca dışkıdaki antijenleri tespit etmek için Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) veya Direct Immunofluorescent Assay (DFA) gibi metotlar kullanılmaktadır. Dışkıda bulunan ookistlerin sayısı değişebildiğinden, farklı zamanlarda alınan en az üç dışkı örneğinin incelenmesi gerektiği bildirilmektedir (8).

Bu çalışmada Malatya huzurevinde kalan yaşlılarda ve ishal şikayeti ile İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na başvuran farklı yaş grubundaki hastalarda *Cryptosporidium parvum* (*C.*

*parvum*) koproantijenlerinin ELISA yöntemiyle araştırılması ve modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen (m-EZN) ile boyanmış preparatların mikroskopi sonuçlarının ELISA sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Yöntem

Bu çalışma, Mayıs-Kasım 1998 tarihleri arasında Malatya Huzurevi sakinleri ve İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'ne ishal şikayeti ile gelen üç farklı yaş grubundan oluşan toplam 92 ishalli kişiden alınan dışkı örneklerinde yapıldı. Çalışmadaki grupların kadın-erkek oranları ve yaş ortalamaları Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışmada 1. grup 0-12 yaş grubu, 2. grup 13-30 yaş grubu ve 3. grup 30 yaş üstü kişilerden oluşturuldu ve huzurevi sakinlerinin hepsi 30 yaşın üstünde olduğu için 3. gruba dahil edildi.

Çalışma yapılmadan önce gerekli izinler Malatya Valiliği'nden alınmıştır. Huzurevinden alınacak örnekler için önceden huzurevi sakinlerine vida kapaklı dışkı kapları verilerek işleme ilgili bilgi verildi. Ertesi gün alınan ishalli dışkı örnekleri en kısa zamanda laboratuvara ulaştırıldı ve işleme alındı.

Ayrıca hastanemizin çeşitli polikliniklerine ishal şikayeti ile başvuran hastalardan rutin parazitolojik inceleme istenen dışkıları çalışmaya dahil edilip işleme alındı.

**Tablo 1.** Çalışma gruplarının kadın-erkek oranları ve yaş ortalamaları

	Erkek	Kadın	Genel toplam	Yaş ortalaması
Huzurevi	9	6	15	69
0-12 yaş	14	13	27	5
13-30 yaş	17	14	31	18
30 yaş üstü	11	8	19	41
<b>Toplam</b>	<b>51</b>	<b>41</b>	<b>92</b>	<b>27</b>

### Parazitolojik İnceleme:

Alınan tüm örnekler direkt bakı ve çoklaştırma yöntemleri uygulanmıştır (3,9). Materyalden direkt incelemede ve çoklaştırma yöntemleri sonrasında hazırlanan preparatlar nativ-lugol yöntemiyle ve m-EZN ile boyanarak incelenmiştir (1,3,7,9,10).

### ELISA Testi:

Örneklerde *C. parvum* antijenlerini belirlemeye yönelik *Cryptosporidium* ELISA (Ridascreen® *Cryptosporidium* ELISA kit, R-Biofarm GmbH, Darmstadt, Germany) ticari test kitleri kullanıldı. ELISA çalışması üretici firmanın önerdiği biçimde uygulandı. Yaklaşık 1 ml dışkı, kit içindeki dilüsyon solüsyonu içerisinde işleme alınmaya kadar +4°C'de



**Tablo 3.** *C. parvum* koproantijen ELISA sonuçlarının mikroskopi ile ilişkileri

		m-EZN Mikroskopi Yöntemi		
		Pozitif	Negatif	Toplam
ELISA	Pozitif	5 (%5.4)	0 (%0)	5 (%5.4)
	Negatif	0 (%0)	87 (%94.6)	87 (%94.6)
	Toplam	5 (%5.4)	87 (%94.6)	92 (%100.0)

## Tartışma ve Sonuç

Günümüzde, immunsupresyon, immunsupresif ajanların artan kullanımı, populasyonun yaşlanması ve malnutrisyon sonucunda paraziter infeksiyonlara duyarlılık artmıştır. Gerek kalıtsal gerekse Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) gibi sonradan kazanılan hastalıklar sonunda immün yetmezliğe bağlı olarak konağın paraziter infeksiyonlara yakalanma ihtimali artmaktadır (11). *Cryptosporidium*'ların sağlıklı

kişilerde de intestinal infeksiyonlara neden olduğu (2,9) ve son yıllarda özellikle AIDS'lilerde ve immunsupresyonlu hastalarda (7,9-11) *C. parvum* ishallerine sık rastlandığı, nozokomiyal ishallerde üçüncü en sık patojenin *C. parvum* (%7.2) olduğu ve kriptosporidiyozun 16-45 yaşları arasında, yağmurlu aylarda daha sık görüldüğü bildirilmektedir (1,12).

İshalli hastaların dışkılarından yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* görülme sıklığının Avrupa ve Kuzey Amerika'da %1-4, Afrika, Asya, Avustralya, Güney ve Orta Amerika'da %3-20 oranlarında olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde değişik hasta gruplarında yapılan çalışmalarda ise görülme sıklığının %0.4-35.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (2).

Gelişmiş ülkelerdeki ishallerin %7'sinden, gelişmekte olan ülkelerdeki ishallerin %12'sinden *Cryptosporidium*'ların sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (7).

Tablo 4'te ülkemizde ve bazı ülkelerde belirli gruplarda yapılmış olan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklıkları gösterilmiştir (1-3,5,7-10,13-15).

**Tablo 4.** Ülkemizde ve bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. görülme sıklığı

Çalışmacı	Yapıldığı yer	Yılı	Grup	Sayı	Görülme sıklığı (%)
Böreççi ve ark. (2)	Mersin	2004	İshalsiz kişiler	361	3.1
Koturoğlu ve ark. (7)	İzmir	2001	İshalli çocuklar	118	13.5
Otağ ve ark. (5)	Mersin	2006	İlkokul öğrencileri	72	5.5
Doğancı ve ark. (10)	Ankara	2001	İshalsiz çocuklar	50	6
Tumwine ve ark. (1)	Uganda	2001	İshalli çocuklar	1779	25
Tumwine ve ark. (1)	Uganda	2001	İshalsiz çocuklar	667	8.5
Yu ve ark. (3)	Kore	2002	İshalsiz kişiler	5262	3.3
Pereira ve ark. (8)	Brezilya	1999	İshalsiz çocuklar	445	14.4
Nagamani ve ark. (9)	Hindistan	2000	İshalli kişiler	1002	11.7
Iqbal ve ark. (13)	Pakistan	1996	İshalli çocuklar		10.3
Garcia ve ark. (14)	A.B.D, Kanada	2002	Çocuklar	401	21.2
Lee ve ark. (15)	Kore	2004	İshalli kişiler	942	1

Bizim yapmış olduğumuz çalışma, ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında birçok çalışmada elde edilen görülme sıklığı yüzdesiyle uyumlu sonuçlar bulunurken, farklı ülkelerde yapılan birkaç çalışma hariç elde edilen görülme sıklığı yüzdeslerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

*C. parvum* ookistlerinin klorlamaya dirençli olması içme suyu kaynaklı salgınlara yol açmaktadır. San Francisco'da daha önce yapılan bir çalışmada belediye

içme suyunun kriptosporidiosis için major bir kaynak olup olmadığı araştırılmış; çalışma sonucunda belediye içme suyunun kaynak olduğu sonucuna varılmıştır (16).

Çeber ve arkadaşlarının (6) yaptığı çalışmada ise 44 içme suyu örneğinin beşinde (%11.3), iki kullanma suyu örneğinin birinde, 19 atık su örneğinin dördünde (%21) ve 35 deniz suyu örneğinin birinde (%2.8) *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır.

Prospektif ve epidemiyolojik çalışmalarda *Cryptosporidium* infeksiyonlarının saptanması ve izlenmesi için ELISA kitlerinin kullanılması önerilmektedir (17).

Leach ve arkadaşlarının (4) Teksas-Meksiko sınırında yapmış oldukları çalışmada üç çalışma bölgesinde 285 kişiden aldıkları serum örneklerinin 196'sında (%70.2) *C. parvum* IgG veya IgA tespit etmişlerdir.

*C. parvum* ile infekte edilen gönüllülerde yapılan çalışmalarda, *Cryptosporidium* oookistleri ile ikinci kez karşılaşanlarda serumda ELISA ile tespit edilebilir antikor düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuş, ancak antikor bulunmamasının infeksiyonu ekarte edemeyeceği bildirilmiştir (18).

Priest'in çalışmasında (19), insanlarda ELISA yöntemi ile *C. parvum*'a spesifik IgG testinin duyarlılık ve özgüllüğü %90 ve %92 olarak tespit edilmiştir.

Weitz'in (20) *C. parvum* EZN boyama ile ELISA sonuçlarını karşılaştıran çalışmasında *C. parvum*'lu örneklerde %89.6 oranında ELISA ile pozitif sonuç alınırken, *C. parvum* bulunmayan örneklerde ELISA ile yalancı pozitifliğe rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise, m-EZN ile pozitif bulunan bütün örnekler ELISA yöntemiyle de pozitif bulunurken, *C. parvum* koproantijen ELISA testinin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak tespit edilmiştir.

EZN boyalı preparatların sedimentasyondan sonra çökteldiden hazırlanması ve örneğin birden fazla incelenmesi mikroskopinin duyarlılığını arttıracaktır.

Bizim çalışmamızda mikroskopik incelemede pozitif olan tüm hastalar ELISA ile tespit edilebilmiştir. Hızlı, ucuz ve pratik olması nedeniyle ve kısa sürede birçok örneğin incelenebilmesine olanak sağlayan m-EZN yönteminin rutine girmesinin kriptosporidiyoz tanısı için yeterli olacağı ve immun sistemi baskılanmış kişilerde, yaşlılarda ve çocuklarda ishale neden olan etkenler arasında *Cryptosporidium* infeksiyonlarının da göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

1. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, Feng X, Tzipori S. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68(6):710-5.
2. Börekçi G, Otağ F, Emekdaş G. Mersin'de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. *Infeksiyon Derg* 2005;19(1):39-46.
3. Yu JR, Lee JK, Seo M, Kim S, Sohn WM, Huh S, Choi HY, Kim TS. Prevalence of cryptosporidiosis among the villagers and domestic animals in several rural areas of Korea. *Korean J Parasitol* 2004;42(1):1-6.
4. Leach CT, Koo FC, Kuhls TL, Hilsenbeck SG, Jenson HB. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors. (The American Society of Tropical Medicine and Hygiene ) *Am J Trop Med Hyg* 2000;62(5):656-61.
5. Otağ F, Aslan G, Emekdaş G, Aydın E, Özkan A.T, Çeber K. Mersin ilinde ilkököl öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin araştırılması. *T Parazit Derg* 2007;31(1):17-9.
6. Çeber K, Aslan G, Otağ F, Delialioğlu N, Öztürk C, Babür C, Emekdaş G. Mersin ilinde içme suyu, kullanma suyu, atık su ve deniz sularında *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin araştırılması. *T Parazit Derg* 2005;29(4):224-8.
7. Koturoğlu G, Bayram S, Kurugöl Z, Turgay N, Mutlubaş F. Akut ishalleri çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. *T Klin J Pediatr* 2004;13:1-19.
8. Pereira MGA, Atwill ER, Barbosa AP, E Silva SA, Garcia-Zapata MTA. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(6):787-93.
9. Nagamani K, Rajkumari A, Gyaneshwari. Cryptosporidiosis in a tertiary care hospital in Andhra Pradesh. *Indian J Med Microbiol* 2001;19(4):215-6.
10. Doğanç T, Araz E, Ensari A, Tanyüksel M, Doğanç L. Detection of *Cryptosporidium parvum* infection in childhood using various techniques. *Med Sci Monit* 2002;8(12):223-6.
11. Ramratnam B, Flanigan TP. Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. *Postgrad Med J* 1997;73:713-6.
12. Nath G, Choudhury A, Shukla BN, et al. Significance of *Cryptosporidium* in acute diarrhoea in North-Eastern India. *J Med Microbiol* 1999;48:523-6.
13. Iqbal J, Munir MA, Khan MA. *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:868-70.
14. Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):209-12.
15. Lee JK, Song HJ, Yu JR. Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea. *Korean J Parasitol* 2005; 43(3):111-4.

16. Khalakdina A, Vugia DJ, Nadle J, Rothrock GA and Colfort JM. Is drinking water a risk factor for endemic cryptosporidiosis? A case-control study in the immunocompetent general population of the San Francisco Bay Area. *BMC Public Health* 2003;3:11.
17. Moss DM, Bennett SN, Arrowood MJ, et al. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of a cryptosporidiosis outbreak on a United States Coast Guard cutter. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:110-8.
18. Okhuysen PC, Chappell CL, Sterling CR, et al. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 1998;66:441-3.
19. Priest JW, Kwon JP, Moss DM, et al. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J Clin Microbiol* 1999;37:1385-92.
20. Weitz JC. Detection of fecal *Cryptosporidium parvum* antigens using an ELISA technique. *Rev Med Chil* 1995;123:330-3.