

# Gastrointestinal Yakınmaları Olan Hastalarda Bazı Protozoonların Farklı Tanı Yöntemleriyle Araştırılması

## Investigation of Some Protozoans with Different Diagnostic Methods in Patients with Gastrointestinal Discomfort

Dr. Semra KUŞTİMUR,<sup>a</sup>  
Dr. Funda DOĞRUMAN AL,<sup>a</sup>  
Dr. Candan TUNCER,<sup>b</sup>  
Dr. Aysu DUYAN ÇAMURDAN,<sup>c</sup>  
Dr. Buket DALGIÇ,<sup>d</sup>  
Dr. Hakan ALAGÖZLÜ,<sup>b</sup>  
Dr. Elife BERK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,  
<sup>b</sup>İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD,  
<sup>c</sup>Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,  
Sosyal Pediatri BD,  
<sup>d</sup>Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,  
Gastroenteroloji BD,  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 25.07.2008  
Kabul Tarihi/Accepted: 24.12.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Funda DOĞRUMAN AL  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,  
Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
alfunda@gazi.edu.tr

**ÖZET Amaç:** Bu çalışmada, gastrointestinal semptomları olan 558 hastanın dışkı örneğinde bazı intestinal protozoonların farklı tanı yöntemleri ile araştırılması ve tanıya katkılarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Tüm dışkı örnekleri, nativ-lugol, trikrom boyama ve Kinyoun asit-fast (KAF) boyama yöntemleriyle mikroskopik olarak incelenmiştir. Tüm olguların dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* için ELISA testleri, *G. intestinalis* ve *C. parvum* için ayrıca doğrudan floresan antikor (DFA) (CRYPTO/GIARDIA CEL, Cellabs, Avustralya) yöntemi çalışılmıştır. Klinik olarak amebiyaz şüphesi bulunan, kanlı mukuslu ishali olan 90 hastanın dışkıсында gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile *E. histolytica* DNA'sı araştırılmıştır. **Bulgular:** İncelenen 558 hastada en sık rastlanan protozoon olarak (nativ-lugol yöntemi ile %10, trikrom boyama yöntemi ile %11.8) *Blastocystis hominis* ilk sırada tespit edilmiştir. Nativ-lugol ile 5 farklı protozoon saptanırken, trikrom boyama yöntemi ile 7 farklı protozoon tespit edilmiştir. Dışkıda *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *C. parvum* saptanmasına yönelik kullanılan mikroskopik yöntemlerin immün tanısal yöntemlere göre duyarlılıkları, özgüllükleri ve tutarlılıkları [kappa ( $\kappa$ ) değerleri] sırasıyla; %26.0-75.0, %97.6-100.0 ve 0.20-0.66 (düşük-orta düzeyde) bulunmuştur. *E. histolytica*'nın belirlenmesi için çalışılan gerçek zamanlı PCR yönteminde, ELISA testi pozitif olan 4 örneğin 2 (%2.2)'sinde *E. histolytica* DNA'sı pozitif olarak belirlenmiştir. **Sonuç:** ELISA, DFA ve gerçek zamanlı PCR yöntemleri, protozoon enfeksiyonlarının tanısında pratik ve yararlı teknikler olarak rutin laboratuvarlarda kullanılabilir özellik taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, intestinal protozoonlar

**ABSTRACT Objective:** To investigate the intestinal protozoans using different diagnostic methods among 558 patients with gastrointestinal symptoms and to evaluate the contributions of these methods to the diagnosis. **Material and Methods:** Native-lugol, trichrome and Kinyoun's Acid Fast (KAF) stain methods were used for microscopic examination of fecal samples of 558 patients. *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* were examined by ELISA in fecal samples, while Direct Florescent Antibody (DFA) (CRYPTO/GIARDIA CEL, Cellabs, Australia) tests were also used for both *G. intestinalis* and *C. parvum* concurrently. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was employed to study the DNA of *E. histolytica* in fecal samples from 90 patients with diarrhea containing mucus and blood who were suspected to have amebiasis. **Results:** The examination of 558 patients revealed that the most common protozoon was *Blastocystis hominis* (10% with native-lugol, 11.8% with trichrome stain). Five different protozoans were detected with native-lugol while the number increased up to seven when trichrome stain method was used. The sensitivity, specificity, and reliability [kappa ( $\kappa$ ) values] of the microscopic methods used for the diagnosis of *G. intestinalis*, *E. histolytica*, and *C. parvum* compared with immunodiagnostic methods varied between 26.0-75.0%, 97.6-100.0%, and 0.20-0.66 (low or medium level) respectively. When real-time PCR was used, *E. histolytica* DNA tested positive for two (2.2%) of the four samples which were positive with ELISA. **Conclusion:** ELISA, DFA and real-time PCR are very practical and useful methods for the identification of intestinal protozoon infections in routine laboratories.

**Key Words:** *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, intestinal protozoans

Turkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29(5):1260-6

İntestinal protozoal ve helmantik enfeksiyonların dünyada 3.5 milyar insanı etkilediği ve çoğunluğu çocuk olan 450 milyon kişide hastalık oluşturduğu bilinmektedir. Her yıl yaklaşık 50 milyon olguda *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu invaziv amebiyaz (amipli dizanteri ve karaciğer amebiyazi) geliştiği ve 100 bin ölüm olduğu belirtilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü *E. histolytica* enfeksiyonunun antijen veya moleküler temelli spesifik tanısının yapılmasını ve asemptomatik olgular da dahil olmak üzere tedavisini önermiştir.<sup>1</sup>

Amebiyazda etkensel tanı, dışkının nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemiyle incelenmesi sırasında *E. histolytica* kist ve/veya trofozoitlerinin görülmesi ile konulabilmektedir. Ancak dışkıda etkenin her zaman bulunmaması, kistlerin diğer patojen olmayan amip kistleriyle (*Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*) kolaylıkla karıştırılabilmesi, tecrübeli olmayan kişilerin etkeni diğer parazit, lökosit ve dışkıdaki partiküllerden kolay ayıramaması, dışarıda belli bir süre bekletilen dışkılarda trofozoitlerin parçalanması gibi nedenlerle tanıda zorluklar yaşanmaktadır. En iyi koşullarda bile mikroskopik tanının duyarlılığının %60 olabildiği belirtilmektedir.<sup>2</sup> Patojen olmayan *E. dispar*, *E. moshkovskii* kist/trofozoitlerinin patojen olan *E. histolytica* kist/trofozoitlerinden morfolojik olarak ayırt edilmesi, gereksiz tedavinin ve bu tedavi sırasında görülecek olası yan etkilerin önlenmesi yanında, yine gereksiz maliyet yüküne engel olmak açısından büyük önem taşımaktadır. *E. histolytica*'yı doğru tanımlayabilmek için protozoonun çeşitli antijenlerine (Gal/GalNAc-spesifik lektin, serinden zengin antijen) karşı geliştirilmiş monoklonal antikorları içeren ELISA yöntemleri ve parazitin DNA'sının izolasyonu amacıyla geliştirilmiş çeşitli moleküler yöntemler mevcuttur.<sup>2,3</sup>

Ülkemizde özellikle çocuk yaş grubunda sık görülen giardiyozun tanısı, zamanında ve doğru tedavi uygulanabilmesi açısından önem taşımaktadır.<sup>4</sup> Dışkının uzun zaman bekletildiği durumlarda *Giardia intestinalis* trofozoitlerinin canlılığını yitirmesi nedeni ile saptanamaması, kist atımının aralıklı olması nedeni ile tek örnek incelemesinin yeterli olmaması, mikroskopta tanınması açısından deneyime ihtiyaç duyulması, az olan parazitin sap-

tanabilme zorluğu ve kitle taramalarında çok sayıda örnekle çalışmanın uzun zaman alması nedeni ile mikroskopik inceleme her zaman yeterli olmamaktadır. Enfeksiyonun var olduğu bilinen durumlarda paraziti mikroskopik inceleme ile olguların %20-50'sinde saptamak mümkün olmamaktadır.<sup>5</sup> Bu durumlar göz önüne alınarak tanıda hızlı ve güvenilir sonuç veren ELISA ve DFA gibi immün tanısal yöntemlere ihtiyaç duyulduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.<sup>6-8</sup>

Kriptosporidiyoz, *C. parvum*'un neden olduğu, sağlıklı kişilerde belirti vermeyen, yetersiz beslenen çocuklarda, immun sistemi baskılanmış kişilerde ve AIDS'lilerde şiddetli ishal, karın ağrısı, bulantı, kusma, subfebril ateş ve halsizlik ile seyreden bir protozoon enfeksiyonudur.<sup>9</sup> Tanı çoğunlukla dışkıda "Kinyoun's asit fast (KAF)" yöntemi ile boyalı preparatların incelenmesi sonucunda ookistlerin görülmesi ile konmaktadır. Giardiyozlu olgularda yaşanan tanı zorlukları bu parazit için geçerlidir.<sup>10</sup> Son yıllarda yaygın kullanım alanı bulan ELISA ve DFA yöntemleri ile tanıya gidilebilmektedir.<sup>6,7,11</sup>

Çalışmamızda gastrointestinal sistem yakınmaları olan olguların dışkılarında protozoonların trikrom ve KAF boyama yöntemiyle araştırılmasının yanında; ELISA yöntemi ile spesifik adezin antijenini ve parazitin DNA'sını saptamak amacıyla gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nu kullanarak *E. histolytica*'yı, ELISA ve DFA yöntemleriyle *G. intestinalis* ile *C. parvum* varlığını araştırmayı ve bu yöntemlerin tanıya olan katkılarını değerlendirmeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmanın yapılabilmesi için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan yazılı izin temin edilmiştir (Tarih: 20.06.2005, Sayı: 139). Çalışmaya dahil edilen tüm olgulardan da bilgilendirilmiş olur alınmıştır. Dışkı örnekleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında incelenmiştir. Çalışmamızda ishal, karın ağrısı, gaz, şişkinlik, hazımsızlık, kabızlık gibi gastrointestinal semptomları olan, yaşları 1-74 (ort= 32.8 + 1.79 yıl) arasında değişen 558 hastaya ait dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir.

## MİKROSKOBİK İNCELEME

Çalışmaya dahil edilen tüm olguların dışkıları direkt bakı (nativ-lugol), trikrom ve KAF (*C. parvum* için) boyama yöntemleri ile incelenmiştir. Dışkı örnekleri, ELISA ve gerçek zamanlı PCR testleri için çalışılıncaya kadar -20° C'de, DFA için sodyum asetat asetik asit formalin fiksatifinde +4°C'de saklanmıştır.

## ELISA YÖNTEMİ

Tüm olgularda dışkıda *E. histolytica*'nın Gal/GalNAc-spesifik (adezin) antijenini (*E. HISTOLYTICA* II, TechLab, Meridian, ABD), *G. intestinalis* (GIARDIA CELISA, Cellabs, Avustralya) ve *C. parvum*'un (CRYPTO CELISA, Cellabs, Avustralya) yüzey antijenlerini saptamaya yönelik monoklonal antikor içeren ELISA yöntemleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede (Biotek, Synergy HT, ABD) 450/620 nm'de belirlenerek üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

## DFA YÖNTEMİ

Tüm olgularda DFA yöntemi *G. intestinalis* ve *C. parvum*'un her ikisini tek test ile saptayabilen *Giardia/Cryptosporidium* DFA kiti (CRYPTO/GIARDIA CEL, Cellabs, Avustralya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır ve hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda (Olympus U-RFLT 50, Japonya) incelenerek değerlendirilmiştir.

## GERÇEK ZAMANLI PCR YÖNTEMİ

Klinik olarak amebiyaz şüphesi olan, kanlı, mukuslu ishalleri 90 hastanın dışkısından DNA eldesi spin kolon esasına dayanan kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Gerçek zamanlı PCR yöntemi kit (Real-Art™ *E. histolytica* RG PCR kit, Artus, Almanya) ile Corbett Research RG-6000 cihazında çalışılmıştır. Verilerin analizleri aynı cihazda Rotor-Gene™ bilgisayar programı (version 4.6) kullanılarak yapılmıştır.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin değerlendirilmesinde, mikroskopik yöntemlerle immün tanısal yöntemler karşılaştırılarak

duyarlılık, özgüllük ve tutarlılık kappa, ( $\kappa$ ) katsayıları hesaplanmıştır.  $\kappa$  0.39 ve altında ise düşük; 0.40-0.75 arasında ise orta; 0.75 ve üstünde ise güçlü düzeyde tutarlılık olarak kabul edilmiştir.<sup>12</sup> Duyarlılık, özgüllük ve tutarlılık hesaplamalarında immün tanısal yöntemler referans yöntem olarak alınmıştır.

## BULGULAR

İncelenen 558 hastanın %15'inde direkt bakı yöntemiyle, %19.35'inde ise trikrom boyama yöntemiyle protozoon saptanmıştır. En sık rastlanan protozoon *Blastocystis hominis* (direkt bakı ile %10.0, trikrom boyama yöntemi ile %11.8 oranında)'tır. Mikroskopik incelemede, x40 objektif büyütme ile her sahada beş ve daha fazla sayıda *B. hominis* belirlenen örnek sayısı 23 (%4.1)'tür. Direkt bakı ile 5 farklı protozoon saptanırken, trikrom boyama yöntemi ile 7 farklı protozoon tespit edilmiştir (Tablo 1).

Dışkıda *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *C. parvum* saptanmasına yönelik olarak kullanılan im-

**TABLO 1:** 558 hastanın dışkı örneğinde saptanan protozoonların tanı yöntemlerine göre dağılımı.

Protozoon	Yöntem	Toplam	
		n	%
<i>Blastocystis hominis</i>	Direkt bakı	56	10
	Trikrom boyama	66	11.8
<i>Cryptosporidium parvum</i>	KAF boyama	6	1.1
	ELISA	7	1.25
	DFA	9	1.6
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Direkt bakı	0	
	Trikrom boyama	1	0.2
<i>Escherichia coli</i>	Direkt bakı	5	0.9
	Trikrom boyama	7	1.25
<i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	Direkt bakı	14	2.5
	Trikrom boyama	16	2.9
	ELISA	4	0.7
<i>Endolimax nana</i>	Direkt bakı	0	
	Trikrom boyama	4	0.7
<i>Giardia intestinalis</i>	Direkt bakı	5	0.9
	Trikrom boyama	8	1.4
	ELISA	19	3.4
	DFA	13	2.3
<i>Iodamoeba butschlii</i>	Direkt bakı	4	0.7
	Trikrom boyama	6	1.1

**TABLO 2:** İncelenen tüm örneklerde *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium parvum*'un tanısında kullanılan immün tanısal ve mikroskopik yöntem sonuçlarının karşılaştırılması (n=558).

		ELISA		DFA*	
		+	-	+	-
<b><i>E. histolytica</i></b>					
Direkt bakı	+	2	12		
	-	2	542		
Trikróm boyama	+	3	13		
	-	1	541		-
<b><i>G. intestinalis</i></b>					
Direkt bakı	+	5	0	4	1
	-	14	539	9	544
Trikróm boyama	+	8	0	5	0
	-	11	539	8	545
<b><i>C. parvum</i></b>					
KAF boyama	+	4	2	5	1
	-	3	549	4	548

\*Sadece *G. intestinalis* ve *C. parvum* için yapılmıştır.

mün tanısal yöntemler ile (*G. intestinalis*, *E. histolytica*, *C. parvum* için ELISA, *G. intestinalis*, *C. parvum* için DFA yöntemleri) mikroskopik yöntemlerin (direkt bakı, trikróm boyama, KAF boyama) karşılaştırılması Tablo 2'de, mikroskopik yöntemlerin immün tanısal yöntemlere göre duyarlılık ve özgüllükleri ile yöntemlerin tutarlılık değerleri ise Tablo 3'te sunulmuştur. Mikroskopik yöntemlerin immün tanısal yöntemlere göre duyarlılıkları düşük, özgüllükleri yüksek olarak belir-

lenmiştir. Testlerin karşılaştırılmasında kullanılan tutarlılık ölçümüne göre, mikroskopik yöntemlerle immün tanısal yöntemlerin tutarlılık düzeyleri, *G. intestinalis* ve *C. parvum* için orta, *E. histolytica* için ise düşük olarak saptanmıştır.

*E. histolytica* DNA'sının gösterilmesine yönelik 90 dışkı örneğinde çalışılan gerçek zamanlı PCR yönteminde, ELISA testi pozitif olan 4 örneğin 2 (%2.2)'sinde *E. histolytica* DNA'sı pozitif olarak bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada en sık rastlanan protozoon olarak *B. hominis* (%11.8) belirlenmiştir. Ülkemizde *B. hominis* prevalansı %1.4-44.3 aralığında bildirilmektedir.<sup>13-16</sup> Sıklıklardaki farklılık çalışmaların bir kısmında, mikroskopik incelemede, x40 objektif büyütme ile sadece her sahada 5 ve daha fazla sayıda *B. hominis* belirlenen örneklerin bildirilmesi, diğer bir kısım araştırmacının ise sayıdan bağımsız olarak değerlendirme yapmasından kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda 23 (%4.1) olguda her sahada 5 ve daha fazla sayıda *B. hominis* belirlenmiştir. Nativ-lugol incelemede taze dışkı incelenmesi gerekliliğinden dolayı, boyalı preparatlarla daha fazla sıklıkta protozoonun tanımlanmasının yanında, fiksatifler içinde saklanan taze dışkıda da uygulanabilir olması, özellikle saha çalışmalarında veya laboratuvarlar arası örnek gönderiminde nativ-lugol yöntemine göre avantaj oluşturmaktadır.<sup>17-19</sup> Çalışmamızda trikróm boyama

**TABLO 3:** Çalışmada kullanılan mikroskopik yöntemlerin immün tanısal yöntemlere göre duyarlılık, özgüllük ve tutarlılık değerlerinin dağılımı.

	ELISA			DFA		
	Duyarlılık %	Özgüllük %	Tutarlılık K	Duyarlılık %	Özgüllük %	Tutarlılık K
<b><i>Entamoeba histolytica</i></b>						
Direkt bakı	50.0	97.8	0.20			
Trikróm boyama	75.0	97.6	0.27		-	
<b><i>Giardia intestinalis</i></b>						
Direkt bakı	26.3	100	0.42	30.8	99.8	0.43
Trikróm boyama	42.1	100	0.58	38.5	100	0.56
<b><i>Cryptosporidium parvum</i></b>						
KAF	57.1	99.6	0.60	55.5	99.8	0.66

ma ile direk bakıya ek olarak *Dientamoeba fragilis* (%0.2) ve *Endolimax nana* (%0.7) tanımlanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *D. fragilis* sıklığı %0.8-8.5 arasında bildirilmiştir.<sup>20,21</sup> Yurt dışındaki çalışmalarda ise %25'e varan sıklıklara rastlanılmaktadır.<sup>22</sup> *D. fragilis*'in gastrointestinal semptomlara neden olduğu ve olguların tedaviye yanıt verdikleri gösterilmiştir.<sup>21,23</sup> Dışkıının trikrom boyama yöntemiyle yapılan incelemelerinde ülkemizde *E. nana* %0.4-4.2 sıklığında görülmekte, yurt dışındaki çalışmalarda ise %0.2-18.3 arasında olduğu belirtilmektedir.<sup>24-27</sup> Trikrom boyama yönteminin direkt bakıda tanımlanması zor veya mümkün olmayan birçok protozoonun tanısında ve protozoonların epidemiyolojisinin belirlenebilmesi konusunda sağlayacağı yarar nedeni ile rutin dışkı incelemelerinde direk bakıyla birlikte kullanılması önem taşımaktadır.<sup>13,28</sup>

Bununla birlikte intestinal protozoonların tanımlanmasında mikroskopik inceleme yöntemlerinin duyarlılığı, protozoonlarda kist atımının aralıklı olması, trofozoitlerin canlılıklarını uzun süre koruyamamaları, emek ve zaman yoğunluğu olması ve deneyimli personel gerekliliği, protozoonların dışkıda bulunan lökosit, makrofaj ve diğer elemanlarla karıştırılabilmesi, özellikle patojen olan ve tedavi gerektiren *E. histolytica*'nın non-patojen olan *E. dispar* ve *Entamoeba moshkovskii*'den morfolojik olarak ayırt edilememesi nedeni ile düşük olmakla birlikte, diğer protozoon ve helmintlerin tanımlanmasında yararlı olmaktadır.<sup>4,29</sup>

Garcia ve Shimizu, dışkıda *G. intestinalis* ve *C. parvum*'un belirlenmesinde 9 immün tanısai (ELISA ve DFA) kitin karşılaştırıldığı çalışmalarda, DFA yöntemini referans yöntem olarak kabul ettiklerinde, ELISA testlerinin duyarlılıklarını *G. intestinalis* için %94-99, *C. parvum* için ise %98-99 olarak saptamışlardır. ELISA testlerinin özgüllüğünü ise her iki protozoon için %100 olarak belirlemişlerdir.<sup>6</sup> DFA testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri ise %100 olarak belirlenmiştir. DFA yönteminin diğer çalışmalarda da duyarlılığı %96-100 ve özgüllüğü %99.8-%100 olarak saptanmıştır.<sup>30-33</sup> Çalışmamızda *C. parvum* ve *G. intestinalis* için kullanılan mikroskopik yöntemlerin immün

tanısai yöntemlere göre özgüllükleri yüksek olmasına rağmen, duyarlılıkları düşük olarak belirlenmiştir, Yöntemler arasındaki tutarlılıklar ise her iki protozoon için orta düzeyde saptanmış olup, tanıda mikroskopik yöntemlere ek olarak immün tanısai yöntemlerin kullanılması fayda sağlamaktadır.

*E. histolytica*'nın tanısında referans yöntem kültür sonrası izoenzim analizi olmakla birlikte, bu yöntemin uzun zaman alması ve pratik olmaması nedeni ile rutin laboratuvarlarda uygulanmamaktadır.<sup>2</sup> Son yıllarda geliştirilen immün tanısai ve moleküler yöntemler intestinal protozoonların tanısında geniş kullanım alanı bulmaktadır.<sup>6,8,11,34-45</sup> Özellikle son yıllarda *E. histolytica* tanısında moleküler yöntemler altın standart olarak kabul edilmekte ve bu yöntemler arasında duyarlılık ve özgüllüğü en yüksek olan yöntem olarak gerçek zamanlı PCR yöntemi dikkat çekmektedir.<sup>40,42,44,45</sup> Moleküler testlerin temelinde yer alan DNA eldesine yönelik daha hassas konvansiyonel ve özellikle ticari yöntemlerin geliştirilmesiyle bu aşamadaki DNA kaybının önlenerek yanlış negatifliğin önüne geçilmeye çalışılmaktadır.<sup>2</sup> Bununla birlikte gerçek zamanlı PCR yönteminin maliyetinin yüksek olması, rutin uygulamada kullanımını kısıtlamaktadır.

Gelişmekte olan ülkelerde *E. histolytica* tanısında PCR yöntemleri rutin tanıda henüz yaygın olarak kullanılmamakta, dışkıda antijen arama testleri ise maliyetinin daha düşük olması ve deneyimli eleman gerektirmemesi nedeni ile alternatif yöntem olarak daha fazla ilgi görmektedir. *E. histolytica* tanısında, PCR ve ELISA yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri arasında fark olmadığını belirten çalışmaların yanında, ELISA yönteminin duyarlılığının, PCR yöntemine göre daha düşük olduğunu ve aynı zamanda yanlış pozitifliğe yol açtığını saptayan araştırmalar da mevcuttur.<sup>45-47</sup> Çalışmamızda *E. histolytica* için mikroskopik yöntemlerin ELISA'ya göre özgüllüğü yüksek (%97.6-97.8), duyarlılığı düşük (%50-75), bu yöntemler arasındaki tutarlılığın ise düşük düzeyde olduğu bulunmuştur. Bulgularımızın *E. histolytica* tanısında ELISA ve mikroskopik yöntemlerin karşılaştırıldığı diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.<sup>34,37,39</sup>



Çalışmamızda ELISA ile 4 örnekte *E. histolytica* pozitifliği saptanmış ve bu örneklerin 2'si gerçek zamanlı PCR yönteminde pozitif olarak belirlenmiştir. *E. histolytica* tanısında PCR yönteminin ELISA ve mikroskopiyeye göre daha duyarlı ve özgül olduğunu belirleyen çalışmalar mevcuttur.<sup>40-42</sup> Dışkı örneklerinde PZR inhibitörlerinin yoğun olarak bulunmasının özellikle konvansiyonel PZR uygulamalarında sorun yarattığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, duyarlılığı yüksek gerçek zamanlı PCR yönteminin geliştirilmesi ve bu yöntem öncesinde DNA eldesinin, dışkıdan DNA izolasyonu için geliştirilmiş kitlerle yapılması, bu yöntemin *E. histolytica* tanısında altın standart olarak kabul görmesine neden olmuştur.<sup>2</sup> Yakın zamanda yapılan çalışmalarda da özellikle gerçek zamanlı PCR yönteminin sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği üzerinde durulmaktadır.<sup>40,42,44,45</sup>

İntestinal protozoonların tanısında hâlihazırda var olan ELISA yöntemleri ticari kit ve spektrofotometre, DFA yöntemleri ise yine ticari kit ve floresan mikroskop gerektirmesi nedeni ile bazı laboratuvarlar için karşılanması zor olan bir maliyet yükü getirmekte ve kullanım kısıtlılığına neden olmaktadır. Bununla birlikte Sağlık Bakanlığının 2005 yılından itibaren Bildirimi Zorunlu Hastalıklar Listesi'nde, D grubu hastalıklar içinde *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *C. parvum*'un yer alması,

bu etkenlerin tanısında duyarlılığı yüksek, immün tanısal veya moleküler tanı metodlarının kullanımını gündeme getirmiştir.<sup>48</sup>

Sonuç olarak, intestinal protozoonların tanısında ilk basamak olarak kullanılan mikroskopik inceleme yöntemlerinin yanında, trikrom ve KAF boyama yöntemlerinin maliyetlerinin düşük olması nedeni ile rutin laboratuvarlarda uygulanmasının yararlı olduğu, hasta sayısı fazla olan ve mali imkânı bulunan laboratuvarlarda ise immün tanısal yöntemlerin de kullanılmasının tanı için önem taşıdığı sonucuna varılmıştır. Özellikle amebiyaz tanısında *E. histolytica*'nın trofozoit ve/veya kistlerinin saptanmasında trikrom boyama yönteminin yeterli olmadığı ve bu olgularda tedavinin yapılabilmesi için kesin tanıya gerek duyulması nedeni ile laboratuvarların rutin uygulamalarında, mali durumlarını göz önüne alarak, duyarlılığı yüksek ELISA ve/veya protozoonun DNA'sının belirlenmesine yönelik moleküler yöntemleri kullanmalarının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kod no:01/2005-38). İstatistik analizlerde yardımlarından dolayı Doç.Dr. F. Nur Aksakal'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- World Health Organization. World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amebiasis. Wkly Epidemiol Rec 1997;72:97-9.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. Clin Microbiol Rev 2007;20(3):511-32.
- Tanyüksel M, Petri WA. Laboratory diagnosis of Amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003;16(4): 713-29.
- Saygı G. [Protozoons]. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2<sup>nd</sup> ed. Sivas: Es-Form Ofset; 2002. p.24-103.
- Garcia LS. Intestinal Protozoa: Flagellates and Ciliates. Diagnostic Medical Parasitology. 4<sup>th</sup> ed. USA; ASM Press; 2001. p.36-59.
- Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1997; 35(6):1526-9.
- 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(2):623-6.
- Al FD, Kuştimur S, Ozekinci T, Balaban N, İlhan MN. The use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and direct fluorescent antibody (DFA) methods for diagnosis of Giardia intestinalis. Türkiye Parazitol Derg 2006;30(4): 275-8.
- Sears CL, Kirkpatrick BD. Cryptosporidiosis and Isosporiasis. In: Gillespie AS, Pearson R (eds). Principles and Practice of Clinical Parasitology. 1<sup>st</sup> ed. England: Wiley; 2001. p.139-64.
- Garcia LS. Intestinal Protozoa (coccidia and microsporidia) and Algae. Diagnostic Medical Parasitology. 4<sup>th</sup> ed. USA: ASM Press; 2001. p. 60-97.
- 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(4):283-8.
- Aksakoğlu G. [Rates derived from research: Reliability]. Sağlıkta Araştırma ve Çözümleme. 2<sup>nd</sup> ed. İzmir: Dokuz Eylül University Publishing; 2006. p. 96-9.
- Aykan B, Çağlar K, Kuştimur S. [Evaluation of the protozoa found in fecal samples using the trichrome staining method]. Türkiye Parazitol Derg 2005;29(1):34-8.

14. Yazar S, Yaman O, Gözenç N, Şahin İ. [Distribution of intestinal parasites among patients who presented at the Department of Parasitology of the Erciyes University Medical School]. *Türkiye Parazitol Derg* 2005;29(4):261-3.
15. Çelik T, Daldal N, Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M. [Incidence of intestinal parasites among primary school children in Malatya]. *Türkiye Parazitol Derg* 2006;30(1):35-8.
16. Çulha G, Gülbol Duran G, Duran N, Canpolat A. [The distribution of intestinal parasites in students of the Mustafa Kemal University School of Health]. *Türkiye Parazitol Derg* 2005;29(4):258-60.
17. Estevez EG, Levine JA. Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of the direct wet mount. *J Clin Microbiol* 1985;22(4):666-7.
18. Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, Bruckner DA. Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):307-10.
19. Wongstiwilairoong B, Srijan A, Piyaphong S, Khungvalert V, Chivaranon O, Bodhidatta L, et al. Significantly increased recovery of intestinal parasites on routine stool specimen evaluation. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(3):641-3.
20. Karaman U, Atambay M, Aycan O, Yoloğlu S, Daldal N. [Incidence of intestinal parasites in municipal sanitary workers in Malatya]. *Türkiye Parazitol Derg* 2006;30(3):181-3.
21. Girginkardeşler N, Coşkun S, Cüneyt Balcioglu I, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect* 2003;9(2):110-3.
22. Stensvold CR, Arendrup MC, Mølbak K, Nielsen HV. The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(8):839-42.
23. Kurt O, Girginkardeşler N, Balcioglu IC, Ozbilgin A, Ok UZ. A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of *dientamoebiasis*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(6):601-4.
24. Akdemir C, Helvacı R. [Evaluation of parasitological laboratory results of a group of people older than 15 years of age in Kutahya]. *Türkiye Parazitol Derg* 2007;31(1):37-40.
25. Değerli S, Çeliksöz A, Aslan A, Acioz M, Özçelik S. [Comparison of the results of examination of fecal samples from students at six months intervals in the Alahacı Village Primary School in Sivas]. *Türkiye Parazitol Derg* 2006;30(4):305-7.
26. Tungtrongchitr A, Chiworaporn C, Praewanich R, Radomyos P, Boitano JJ. The potential usefulness of the modified Kato thick smear technique in the detection of intestinal sarcocystosis during field surveys. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38(2):232-8.
27. Ikeh EI, Obadofin MO, Brindeiro B, Baugherb C, Frost F, Vanderjagt D, et al. Intestinal paasitism in Magama Gumau rural village and Jos township in north central Nigeria. *Niger Postgrad Med J* 2007;14(4):290-5.
28. Agrawal N, Sharma U, Sharma AK. Trichrome staining for detection of intestinal protozoa a better screening method. *J Commun Dis* 2006;38(4):351-4.
29. Schuster H, Chiodini PL. Parasitic infections of the intestine. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14(5):587-91.
30. Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3255-7.
31. Kehl KS, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 1995;33(2):416-8.
32. Scheffler EH, Van Etta LL. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1807-8.
33. Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1942-3.
34. Delialioğlu N, Aslan G, Sozen M, Babur C, Kanik A, Emekdas G. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(7):769-72.
35. Church D, Miller K, Lichtenfeld A, Semeniuk H, Kirkham B, Laupland K, et al. Screening for *Giardia/Cryptosporidium* infectious using an Enzyme Immunoassay in a Centralized Regional Microbiology Laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129(6):754-9.
36. Tanyuksel M, Yılmaz H, Ulukanligil M, Araz E, Cicek M, Koru O, et al. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of *amebiasis*. *Exp Parasitol* 2005;110(3):322-6.
37. Yıldız Zeyrek F, Özbilge H, Yüksel MF, Zeyrek CD, Sirmatel F. [Parasitic fauna and the frequency of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* detected by ELISA in stool samples in Sanliurfa, Turkey]. *Türkiye Parazitol Derg* 2006;30(2):95-8.
38. Göğebakan M, Aksaray N, Yılmaz HL, Alhan E, Tanrıverdi S, Özcan K. [The diagnostic value of serological tests in children with intestinal *Amoebiasis*]. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2001;10(4):190-6.
39. Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):449-52.
40. Blessmann J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4413-7.
41. Gonin P, Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):237-41.
42. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA Jr, Haque R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2168-72.
43. Visser LG, Verweij JJ, Van Esbroeck M, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol* 2006;296(6):397-403.
44. Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SM, Mondal D, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76(4):713-7.
45. Stark D, van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J, et al. Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of *amebiasis*. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1678-81.
46. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 1995;33(10):2558-61.
47. Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pournabai AA, et al. Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. *J Clin Microbiol* 2006;44(6):2258-61.
48. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. *Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi*. Grup D Hastalıklar Laboratuvar Rehberi. Ankara: Aydoğdu Offset; 2005. p.257-74.