

İmmün Yetmezlikli Hastalarda İntestinal Protozoonların Tanısı

Asım ÜLÇAY¹, Levent GÖRENEK², Ömer COŞKUN², Engin ARAZ³,
Ali ACAR⁴, Can Polat EYİGÜN²

¹Asker Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Kocaeli, ²Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, ³Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, ⁴Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET: Bu çalışmayla ishal şikayeti olan immün yetmezlikli hastalarda, gastroenterit etkeni olabilecek bağırsak protozoonlarının tespiti için hangi laboratuvar yöntemlerinden yararlanılması gerektiğini belirlemeye çalıştık. İmmün yetmezliği olup 10 günden uzun süren ishali olan 36 hasta ile immün yetmezlikli ishali olmayan 44 hasta çalışmaya dahil edildi. Alınan dışkı örneklerinde konvansiyonel yöntemler; nativ-lugol (NL), trikrom, modifiye asit fast (MAF), serolojik yöntemler; Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Direkt Floresan Antikor (DFA) ve moleküler yöntem; Polimerize zincir reaksiyonu (PZR), kullanılarak çalışma yapıldı. Çalışmamızın sonucunda, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis* ve *Entamoeba histolytica* gibi protozoonların immün yetmezlikli hastalarda uzamış ishallerin sorumlusu olabileceğini tespit ettik. Tanıda NL yöntemi ile dışkıda etken saptanamamış ise, *Cryptosporidium* spp.'nin tanısı için DFA veya MAF; *E. histolytica*'nın tanısı için ELISA veya trikrom boyama yöntemlerinin kullanılmasının uygun olacağı, *G. intestinalis* tanısında basit ve ucuz olan NL yönteminin tanıda yeterli olacağını serolojik ve moleküler yöntemlere ihtiyaç olmayacağı sonucuna varıldı. İmmün yetmezlikli hastalarda nötropeninin, bağırsak protozoon enfeksiyonlarının görülme sıklığının arttırmadığı ayrıca immün yetmezlikli olgularımızda steroid tedavisi verilmesinin, bu hastalıklar açısından bir risk faktörü oluşturmayacağı tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Protozoon, immün yetmezlikli hasta

Diagnosis of Intestinal-Protozoa in Patients with Immune Deficiency

SUMMARY: In our study, we tried to detect gastroenteritis causing intestinal protozoa in patients with immune deficiency and who suffered from diarrhea. We also tried to determine which laboratory methods should be used in detecting intestinal protozoon in these patients. Thirty-six immune deficient patients who had had diarrhea for more than 10 days and 44 immune deficient patients without diarrhea were included in the study. In stool samples taken from all cases, intestinal protozoa were detected using the conventional diagnostic methods including direct wet mount, trichrome and modified acid fast staining as well as serologic diagnostic methods such as ELISA, direct fluorescent antibody (DFA)] and the molecular method of polymerized chain reaction. In our study, we found that intestinal protozoan such as *G. intestinalis*; *C. parvum*, *B. hominis* and *E. histolytica* could be responsible for the long term diarrhea in patients with immune deficiency. If a pathogen is not detected in the feces by native Lugol (NL), DFA and MAF are suitable techniques for *Cryptosporidium* spp while ELISA or trichrome staining are suitable methods for *E. histolytica*. It was concluded in the study that the simple and inexpensive NL method is sufficient in the diagnosis of *G. intestinalis* and serological or molecular methods are unnecessary. Neutropenia in patients with immune deficiency did not enhance the frequent occurrence of intestinal protozoan infections; and also, in the cases with immune deficiency, it was found that the administration of steroid treatment was not a risk factor in intestinal protozoan disease.

Key Words: Protozoan infections, immune compromised patients

Makale türü/Article type: **Araştırma / Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 22 Mart/22 March 2008

Düzeltilme tarihi/Revision date: 05 Mayıs/05 May 2008

Kabul tarihi/Accepted date: 10 Haziran/10 June 2008

Yazışma /Corresponding Author: Ömer Coşkun

Tel: (+90) (312) 304 43 08 Fax: (+90) (312) 304 43 00

E-mail: coskunomer23@hotmail.com

GİRİŞ

İmmün sistemi zayıflamış hastalar bazı parazit enfeksiyonlarına daha kolay yakalanmaktadır. Parazitlerin patojen hale geçmesinde veya patojenitelerinin artmasında konak parazit ilişkileri ve konağın parazitlere karşı olan direncinin azalması veya kaybolması rol oynamaktadır. İmmün sistemin baskılanması veya iyi çalışmaması özellikle hücrel immüniteden etkilenen parazitlerin patojen etkilerinin artmasına ve ölüme kadar gidebilen ağır klinik tablolar oluşturmalarına neden olmaktadır (16, 19, 29).

Çalışmamızda immün yetmezlikli olup uzun süreli ishal şikayeti olan hastalarda, gastroenterit etkeni olabilecek bağırsak protozoonlarının saptanması, ishal şikayeti olmayan immün yetmezlikli hastalarda bu protozoonların varlığının belirlenmesi, immün yetmezlikli hasta grubunda da bu amaçla hangi laboratuvar yöntemlerinden yararlanılması gerektiğini belirlemeye çalıştık. Bağırsak protozoonlarının saptanmasında konvansiyonel, serolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin karşılaştırılması, hastaların klinik ve laboratuvar bulguları ile etken arasındaki ilişkinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Kasım 2004 ile Ağustos 2006 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde gerçekleştirildi. Çalışmaya immün yetmezlikli ve 10 günden uzun süren ishali olan 36 hasta ile, yine immün yetmezlikli olan fakat ishali olmayan 44 hasta dahil edildi (toplam 80 hasta). Olguların 46'sı (%57,5) Hematoloji, 8'i (%10,0) Onkoloji, 23'ü (%28,8) Nefroloji, 3'ü (%3,8) Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde takip edilen hastalardan oluşmaktaydı. Hasta grubunu; remisyon döneminde olmayan hematolojik malignitesi olanlar, aplastik anemililer, malignite tedavisi nedeniyle sitotoksik kemoterapi alan ve nötropenik hastalar, organ ve kemik iliği transplantasyon alıcıları, HIV ile enfekte olan hastalar ve primer immün yetmezlikli hastalar oluşturdu.

Hastaların tümünde *Entamoeba* spp., *Cryptosporidium parvum*, *G. intestinalis*, *B. hominis*, gibi ishal etkeni olabilecek protozoonlar araştırıldı. Alınan dışkı örneklerinin hepsinden bakteriyolojik kültür yapıldı.

Hastalardan üç gün arka arkaya dışkı örneği alındı. Alınan taze dışkı örnekleri önce direkt mikroskopide X400 büyütmede incelendi. Daha sonra örnekler trikrom, MAF boyaları ile boyanarak incelendi. İmmüno serolojik ve moleküler tetkikler yapılabildi kadar, dışkı örnekleri -20 °C'de saklandı. Dışkı materyalinin araştırılmasında konvansiyonel yöntemlerden NL (*Entamoeba* spp., *G. intestinalis* ve *B. hominis* belirlemek için), trikrom (Sigma HT 10-5-16, ticari kiti kullanılarak, *Entamoeba* spp. belirlemek amacıyla çalışıldı), MAF (*Cryptosporidium* spp. belirlemek amacıyla), serolojik yöntemlerden ELISA (*E. histolytica* antijeninin tespiti için), DFA (*Cryptosporidium* spp. ve *G. intestinalis* kistleri araştırmak için) ve dışkı örneklerinde DNA ekstraksiyonu sonrası PZR ile *Entamoeba* spp., *G. intestinalis*, ve *Cryptosporidium* spp'nin genomik DNA'sını tespit etmek amacıyla çalışıldı.

Elde ettiğimiz veriler, (Statistical Package for Social Sciences) SPSS for windows 10.0 paket istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçların değerlendirmesinde, kesikli değişkenler için bağımlı grupların karşılaştırılmasında McNemar istatistiksel testi; bağımsız grupların karşılaştırılmasında Fisher's ki-kare testi kullanıldı. Frekans, duyarlılık, özgüllük ve anlamlılık değerleri SPSS for windows 10.0 paket istatistik programı ile hesaplandı.

BULGULAR

İmmün yetmezliği bulunan toplam 80 olgu çalışmaya alındı edildi. Olguların 14'ü (%17,5) kadın, 66'sı (%82,5) erkekti. Hastaların yaş ortalamaları (30,31±13,06) idi.

Olguların 36'sında ishal belirlenirken, 44'ünde saptanmadı. İshali bir hastanın dışkı kültüründe *Shigella* spp. izole edildi. Diğer olgulardan alınan gaita kültürlerinde patojen etken izole edilmedi. İshali olan olguların 16'sında (%44) olmayanların ise 3'ünde (%6,8) protozoal etken belirlendi.

Konvansiyonel yöntemlerden NL boyama yöntemi ile dışkıda saptanan protozoonlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. NL yöntemi ile saptanan protozoonlar.

NL yöntemi ile saptanan protozoonlar	İshali Olan n=36	İshali Olmayan n=44
<i>Entamoeba</i> spp.	1	1
<i>G. intestinalis</i>	10	2
<i>Blastocystis hominis</i>	3	1
Herhangi bir protozoon saptanmayan	22	40

Trikrom boyama yöntemi kullanıldığında, ishali olan hastaların 3'ünde (%8,3) *E. histolytica*, ishali olmayan hastaların ise 1'inde (%2,3) *E. coli* kisti tespit edildi.

MAF yöntemi ile ishali olan 1 (%2,8) hastada *Cryptosporidium* spp. kisti saptanırken, ishali olmayan hastalarda *Cryptosporidium* spp. kisti ve diğer araştırılan protozoonlar saptanmadı.

Serolojik yöntemlerden DFA ile ishali olan 1 (%2,8) olguda *Cryptosporidium* spp, ve 2 olguda (%5) hem *Cryptosporidium* hem de *G. intestinalis* kistleri gösterilmiştir. Bu yöntem ile ishali olguların 7'sinde (%19,4), ishali olmayanların ise 2'sinde (%4,5) *G. intestinalis* kistleri gösterilmiştir. DFA yöntemi ile araştırılan protozoonlar ve test sonuçları Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2. DFA testi sonuçları

<i>Cryptosporidium/Giardia</i> DFA	İshali Olan n=36	İshali Olmayan n=44
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	-
<i>G. intestinalis</i>	7	2
<i>Cryptosporidium</i> spp. ve <i>G. intestinalis</i> aynı anda görülen	2	-

DFA yöntemi ile MAF yöntemi arasında *Cryptosporidium* spp. kisti belirlemede istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05).

Diğer bir serolojik yöntem olan ELISA metodu ile *E. histolytica* antijeni aranmış ve sadece ishali olan olguların 1'inde (%2,8) tespit edilmiştir.

ELISA ve trikrom boyama yöntemleri arasında *E. histolytica* tanısı koyma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p<0.05$).

PZR yöntemi ile araştırılan protozoonlardan sadece *G. intestinalis*, ishali 11 (%30) ve ishali olmayan 2 (%4) hastada tespit edilmiştir.

Genel olarak bakıldığında, ishali olan olguların 16'sında (%44), olmayanların 4'ünde (%9) protozoal etken belirlenmiştir. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

G. intestinalis saptanması açısından çalışmamızda kullanılan DFA, NL ve PZR yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p<0.05$). *G. intestinalis* tanısında kullandığımız tanı yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo 3'de sunulmuştur. *G. intestinalis* tüm olgularda en çok saptanan protozoon olmuştur.

Tablo 3. *G. intestinalis* saptanmasında tanı yöntemleri karşılaştırılması.

Yöntem	İshali olan (n: 36)	İshali olmayan (n: 44)
Nativ-lugol	10 (%27.8)	2 (%4.5)
DFA	9 (%25)	2 (%4.5)
PZR	11 (%30.5)	2 (%4.5)

İshali hastaların 20'sinde (%55), ishali olmayan hastaların da 12'sinde (%27) nötrojeni saptandı ($< PMNL 500 mm^3$).

Nötrojeni ile seyreden olguların 6'sında (%26), nötrojenisi olmayanların da 12'sinde (%21) bağırsak protozoonu saptandı.

Steroid tedavisi alan hastaların 10'unda (%21), almayanların ise 8'inde (%24) bağırsak protozoonu saptandı. Protozoon tespit edilip edilmeyen hastaların nötrojenik olup olmamaları ile steroid alıp almama durumları arasındaki ilişki Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Protozoon tespit edilen/edilmeyen hastaların nötrojenik/non-nötrojenik durumları ile steroid kullanıp kullanılmamaları arasındaki ilişki.

	Protozoon Saptanan (n=36) Sayı / (%)	Protozoon Saptanmayan (n=44) Sayı / (%)	Toplam (n=80) Sayı / (%)	X^2	P
Nötrojenik	6/(26)	17/(74)	23/(28)	0,032	0,238
Non-nötrojenik	12/(21)	45/(79)	57/(72)		
Steroid alan	10/(21)	37/(79)	47/(59)	0,001	0,980
Steroid almayan	8/(24)	25/(76)	33/(41)		

TARTIŞMA

İmmün yetmezlik durumunun parazit enfeksiyonuna etkisi tam olarak bilinmemektedir.

Steroid tedavisi alan nefrotik sendromlu, protein-kalori malnütrisyonlu ve lenfomalı hastalardan oluşan immün yetmezlikli 100 olguda Noureldin ve arkadaşlarının (19) yaptığı bir çalışmada, NL ve MAF tanı yöntemleri ile fırsatçı bağırsak

protozoonlarını incelemiş; *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *C. parvum* ve *B. hominis*'i kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha sık tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda immün yetmezlikli olup ishali olan hastalarda Noureldin ve arkadaşlarının bulguları ile uyumlu olarak benzer protozoonlar tespit edildi.

Gastrointestinal enfeksiyonların irdelendiği bir çalışmada, immün yetmezlikli hastaların parazitlerin tüm tipleri ile enfekte olabileceği belirtilmiştir (16). Başka bir çalışmada Botero ve arkadaşları (5) Akut lenfositik lösemi, Kronik lenfositik lösemi, anti-HIV pozitif ve diğer immün yetmezlikli 111 olguyu içeren grupta immün yetmezliğe neden olan hastalık ile etkenin sıklığı arasında ilişki olmadığı saptanmıştır. Bu hastalarda en sık rastlanan parazitlerin *Cryptosporidium* spp. ve *Microsporidium* spp. olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda immün yetmezliğe neden olan hastalık ile etken arasındaki ilişki olgu sayılarının birbirinden farklı olması nedeniyle değerlendirilememiştir. Bununla birlikte en sık saptanan etkenler *G. intestinalis* ve *C. parvum* olmuştur.

Waywa arkadaşlarının (34) ve Dakar'da başka bir grubun (10) ishali olan anti-HIV pozitif hastalarda yaptıkları çalışmalarda ishale en sık neden olan bağırsak protozoonlarının *Cryptosporidium* spp., *Microsporidium* spp., *Isospora belli*, *Cyclospora* ile *E. histolytica* ve *G. intestinalis* olduğu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, HIV ile enfekte iki hastamız mevcuttu. Bu hastaların ishal şikayetleri yoktu. Kullandığımız tanı yöntemleri ile bağırsak protozoonu saptanmadı. Olgu sayımızın az olması nedeniyle yukarıda verilen çalışmalardaki bulgulara benzer sonuçların elde edilmediği düşünülmektedir.

Çalışmamızda immün yetmezlikli olup ishalleri uzun süren hastalarda *G. intestinalis*, *C. parvum*, *B. hominis*, *E. histolytica* gibi bağırsak protozoonlarının etken olabileceği; ishali olmayan immün yetmezlikli hastalarda, *G. intestinalis*, *B. hominis*

gibi bağırsak protozoonlarının saptanabileceği belirlenmiştir. İmmün yetmezlikli olgularda steroid tedavisi verilmesinin, bağırsak protozoon hastalıkları açısından bir risk faktörü oluşturmadığı ($p>0.05$) ve nötrojeninin bu grup hastalarda, bağırsaklara ait protozoon enfeksiyonlarının görülme sıklığını artırmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

İmmün sistemi sağlam hasta grubu hakkındaki mevcut çalışmalar incelendiği zaman çocukluk çağında ve özellikle de dört

yaş altındaki çocuklarda hastalığın daha sık görüldüğü anlaşılmıştır. Türkiye'deki farklı yaş gruplarındaki akut ishallerde çocuklarda bu oran %2-11,8 olarak bildirilmiştir (21, 22, 2, 8). Almanya'da 3235 ishallerde çocuğun %1,8'inde *Cryptosporidium* oookistleri saptanmış ve bu olguların %52'sinde hayvan temasının olduğu bildirilmiştir (15). *Cryptosporidium*'un çocukluk çağında prevalansın yüksek olmasının nedeni bu yaş grubunda fekal-oral bulaşmanın daha kolay olması, immün sistemlerinin tam gelişmemiş olması, koruyucu immünitelerinin eksik olması olabilir (6, 33).

Türkiyede immün yetmezlikli hasta gruplarında yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. sıklığı %7,1 ile %61,1 arasında saptanmış, kontrol gruplarında ise %0-14 arasında bulunmuştur. Çalışma grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (1, 20, 30, 38).

Yapılan çalışmalarda (28, 25) ishallerde olan ve maligniteli hastalarda MAF yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. oookisti tespit etme oranı %0,3-1,3 arasında saptanmıştır.

Ballal ve arkadaşları (3) ishallerde 75 immün yetmezlikli olguda MAF, safranin metilen mavisi ve DFA yöntemi kullanarak *Cryptosporidium* spp. tespit etme oranını %46,7 olarak saptamışlardır.

Garcia ve arkadaşlarının (14) *Cryptosporidium* tanısında acridine-orange, auramine rhodamine, Kinyoun'un aside dirençli boyama yöntemi, giemsa ve MAF yöntemlerini karşılaştırmışlar ve *Cryptosporidium* tanısında en etkili boyama yönteminin giemsa ve MAF olduğunu bildirmişlerdir. Kehl ve arkadaşları (7) ise *Cryptosporidium* tanısında kullanılan yöntemlerden ELISA, direkt immunfloresan antikor ve MAF boyama yöntemini karşılaştırmış ve MAF boyası ile direkt immunfloresan antikor yönteminin, ELISA yöntemine tercih edilmesini önermişlerdir.

Çalışmamızda ishallerde olgularda DFA yöntemi ile 3 (%8,3), MAF yöntemi ile 1 (%2,8) olguda *Cryptosporidium* spp. kistleri saptanırken, PZR yöntemi ile pozitiflik saptanamamıştır. İshallerde olmayan olguların hiçbirinde bu yöntemlerle *Cryptosporidium* spp. saptanamamıştır. DFA yöntemi ile MAF yöntemi arasında *Cryptosporidium* spp. kisti belirlemede istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak olgu sayısının azlığı nedeniyle bu değerlendirmenin sağlıklı olmadığı düşünülmektedir. DFA yönteminin *Cryptosporidium* tanısında en etkin yöntem olmasına rağmen; maliyetinin yüksek olması, immunfloresan mikroskop gibi cihazlara ihtiyaç göstermesi nedeniyle tanıda MAF yönteminin kullanılabilmesi düşünülmektedir. MAF boyama yöntemi, rutin laboratuvarlarda kolay uygulanabilmesi, inceleme için preparatların uzun süre bekletilebilmesi, ucuz olması, oookist iç yapılarının diğer yöntemlere göre daha ayrıntılı gösterilebilmesi gibi avantajları mevcuttur. Boyama zamanının uzun olması, deneyim ve yoğun tarama gerektirmesi, özellikle taze materyalde oookistlerin her zaman boyanmaması ve uzun süreli uygulamalarda debris ve mayaların boyayı alması nedeniyle hatalı sonuçlar gibi dezavantajları da bulunmaktadır (9, 35).

DFA yöntemi az sayıda oookist içeren (1-10 oookist/lam) dışkı örneklerinden *Cryptosporidium* oookistlerinin saptanmasında oldukça yararlıdır. Bu durum hastalığa erken dönemde tanı konulmasında ve asemptomatik taşıyıcıların saptanmasında önemlidir. Garcia ve arkadaşlarının (14) 1987 yılında yaptıkları çalışmada Fluorescent isothiocyanate işaretli monoklonal antikor boyasının, MAF boyamaya göre en az 10 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda da Garcia ve arkadaşlarının belirttiği gibi DFA yönteminin dışkıda *Cryptosporidium* oookistlerinin saptanması açısından avantajlı olduğu belirlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerde DNA ekstraksiyonu sonrası PZR yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. oookisti aranmış ancak hiçbir olguda pozitiflik saptanamamıştır. PZR yönteminin dışkıda bulunan safra tuzları, hemoglobinin yıkım ürünleri gibi maddelerden etkilendiği, bu nedenle inhibitör maddeler dışkıdan uzaklaştırıldıktan sonra DNA ekstraksiyonu yapılması gerekliliği bildirilmektedir. Çalışmamızda PZR yönteminin tanıda kullanışlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak PZR yöntemlerinin parazitin bulaş ve epidemiyolojisini anlamak amacıyla kullanılabilmesi bildirilmektedir.

E. histolytica immün yetmezlikli olgularda yapılan çalışmalarda ciddi klinik tablolara yol açması, tanı zorluğu ve bağırsak dışı klinik bulgularının olması nedeniyle önem kazanan protozondur. Tayvan'da prospektif kontrollü bir çalışmada, HIV ile enfekte hastalarda invaziv amebiasisin hem daha ciddi hem de daha yaygın olduğu öne sürülmüş ve immünsupresyonun önemli verilerinden biri olabileceği belirtilmiştir (16).

Moran ve arkadaşları (18) ile Tanyüksel ve arkadaşlarının (31) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda HIV ile enfekte hastalarda *E. histolytica* enfeksiyonu riskinin anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Amebiasisin mikroskopik tanısı hiçbir zaman duyarlı ve özgül değildir ve *E. histolytica* ile *E. dispar*'ın bu yöntemle ayrımı yapılamaz. Yapılan çalışmalarda tek dışkı örneğinin mikroskopik incelemesinin %33-50'den fazla duyarlı olmadığı, patojenik *E. histolytica*'nın morfolojik olarak non-patojenik *E. dispar*'dan ayırt edilmesinin mümkün olmadığı görülmektedir (32). Shetty ve arkadaşlarının (33) direkt dışkı inceleme yöntemleri ile akut amipli hastalarda tanı konabilmesine yönelik yaptıkları çalışmada, özellikle amip trofozoitlerini saptamada kalıcı boyaların önemli olduğuna değinmişler ve kalıcı boyaların amiplerin tanınmasında NL yöntemine göre daha yüksek başarı sağladığını ortaya koymuşlardır. Son yıllarda yapılan araştırmalar amebiasis'in hızlı ve kesin tanısı için serolojik yöntemlerin gittikçe yaygınlaştığını ve özellikle dışkıda antijen arama yöntemlerinin duyarlılığının oldukça yüksek düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır.

Bangladeş'te 74 hastadan alınan dışkı örnekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, ELISA'nın mikroskopik bakının yerini aldığı ileri sürülmüştür (12). Merino ve arkadaşlarının (17) *E. histolytica*'ya karşı geliştirilen monoklonal antikor ELISA

testinin diğer standart tanı yöntemlerine göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bazı araştırmacılar dışkı örneklerinde *E. histolytica* antijeninin tespit edilmesi için ELISA yöntemi uygulamışlar, diğer amip türleri ve başka parazitler ile çapraz reaksiyon vermediğini, duyarlılığının ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu bildirmişlerdir (27, 37).

Mikroskopik bakının yanında dışkıda amip antijenlerinin aranmasının önemi bazı makalelerde vurgulanmıştır (4, 23). Dışkıda *E. histolytica* antijenlerinin ELISA ile tespit edilmesi için yapılan çalışmalar incelendiğinde, Haque ve arkadaşları (11) poliklonal ve monoklonal antikor kullanarak dışkıda ELISA yöntemini değerlendirdikleri bir çalışmada, yöntemi %100 duyarlı, %97 özgül bulmuşlar, ELISA'nın mikroskopi ve kültür ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu tespit etmişlerdir.

Tanyüksel ve arkadaşlarının (32) yaptığı çalışmada 380 dışkı örneği incelenmiş, trikrom boyama ile 91 (%24) dışkı örneğinde *E. histolytica*/*E. dispar* trofozoit/kist pozitif olarak saptanmıştır. Aynı dışkıların ELISA kullanılarak incelenmesi ile 51 (%13)'ünde *E. histolytica* spesifik antijenlerin varlığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, trikrom boyama yöntemi ishali hastaların 3'ünde (%8,3) *E. histolytica* kisti görülürken, ELISA yöntemi ile 1 (%2,8) hastada pozitiflik saptandı. PZR yöntemi ile *E. histolytica* araştırılmasında, ishali olan ve olmayan olguların dışkı örneklerinin spesifik DNA sekansı içermediği belirlendi. İshali olmayan hiçbir hastada tanı yöntemleri ile *E. histolytica* belirlenmedi. ELISA ve trikrom boyama yöntemi arasında *E. histolytica* tanısı koyma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). PZR yöntemi ile *E. histolytica* araştırılmasında, dışkıdan DNA ekstraksiyonunun zor olması, dışkıda inhibitör maddelerin fazlalığı, PZR yöntemlerinin çeşitliliği, maliyetinin yüksek olması gibi nedenlerle ELISA ve trikrom boyama yöntemi ile karşılaştırıldığında tanı için uygun bir yöntem olmadığı düşünülmüştür.

Giardiyoze tanısı zamanında ve doğru tedavi uygulanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Winiecka ve arkadaşlarının (36) giardiyoze şüpheli 150 kişiye ait örneklerin mikroskopik inceleme ile %10'unda pozitif saptarlarken, immunfloresan yöntemi ile bu oranı %23 bulduklarını ve yöntemin oldukça duyarlı olduğunu belirtmektedirler. Rashid ve arkadaşlarının (24) giardiyoze tanısında direkt mikroskopi, DFA ve ELISA yöntemlerini karşılaştırmışlar. Giardiyoze semptomu olan 200 çocuğun dışkı incelemelerinde *G. intestinalis*'i; ELISA ile 39 (%19,5), DFA ile 49 (%24,5) olguda pozitif saptamışlardır. DFA yönteminin sensitivitesinin %100 ve spesifitesinin %93,8 olduğu belirtilmiştir.

G. intestinalis nükleik asiti saptanmasına yönelik çalışmalar incelendiğinde, kistlerin zor erimesi, klinik örnekte inhibitör maddelerin ve yabancı DNA'ların fazla miktarda olması gibi güçlüklerin aşılması gerektiği vurgulanmaktadır. Jaco ve arkadaşlarının (13) yaptığı bir çalışmada real time-PZR,

mikroskopi ile karşılaştırıldığında PZR duyarlılığının %98, özgüllüğünün %100 olduğu belirtilmiştir. Mikroskopinin negatif saptadığı ancak dışkıda *G. intestinalis* antijen saptanan 10 olgunun tümünün PZR yöntemi ile pozitif olduğu belirtilmiştir.

G. intestinalis tespiti amacıyla çalışmamızda kullandığımız yöntemler birbirleriyle karşılaştırıldığında (Tablo 3), DFA yöntemi ile NL ve PZR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). NL boyama yönteminin DFA'ya göre *G. intestinalis* saptama duyarlılığı (%100), özgüllüğü (%98,5) olarak tespit edilmiştir. NL yönteminin pozitif prediktif değeri %91,6 ve negatif prediktif değeri %100 olarak bulunmuştur.

PZR yönteminin DFA'ya göre *G. intestinalis* saptama duyarlılığı (%100), özgüllüğü (%97,1) olarak belirlenmiştir. PZR yönteminin pozitif prediktif değeri (%84,6) ve negatif prediktif değeri (%100) olarak bulunmuştur.

G. intestinalis saptanması amacıyla kullanılan yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması, testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin birbirine yakın olması nedeniyle bu tür hastalarda *G. intestinalis* tanısında basit ve ucuz olan NL yönteminin tanıda yeterli olduğu serolojik ve moleküler yöntemlere ihtiyaç olmadığı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Arıkan S, Ergüven S, Akyön Y, Günalp A, 1999. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in a Turkish University Hospital. *Acta Parasitol Microbiol Hungarica*; 46: 33-40.
2. Aydın F, Katırcıoğlu İ, Köseahmet F, Bakır T, Bingöl R, 1995. Kronik diyareli hastanın dışkı örneklerinde *Cryptosporidium*'un belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg*; 9:151-155.
3. Ballal M, Prabhu T, Chandran A, Shivananda PG, 1999. *Cryptosporidium* and *Isospora belli* diarrhoea in immunocompromised hosts. *Indian J Cancer*; 36: 38-42.
4. Baumann D, Gottstein B, 1987. A double-antibody sandwich ELISA for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples of humans. *Trop Med Parasitol*; 38: 81-85.
5. Botero CA, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM, 2003. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 45: 197-200.
6. Current WL, Garcia LS, 1991. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*; 4:325-358.
7. Casemore DP, Broadsheet ACP, 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*; 44: 445-451.
8. Erer D, 1996. *Cryptosporidium* tanısında Modifiye Ziehl-Neelsen, Auramine ve Acridine orange boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. Ankara hastanesi uzmanlık tezi, Ankara.
9. Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA, 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*; 25: 119-121.
10. Gassama A, Thiaw B, Dia NM, Fall F, Camara P, Hovette P, Perret JL, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Sow PS, Aidara-Kane A,

2001. Infective etiology of diarrhea in adults with HIV infection in Dakar: a case-control study on 594 patients. *Dakar Med*, 46: 46-50.
11. **Haque R, Kress K, Wood S, Jackson TF, Lyerly D, Wilkins T, Petri WA, Jr**, 1993. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J Infect Dis*, 167: 247-249.
 12. **Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA**, 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol*. 33: 2558-61.
 13. **Jaco J, Verweij RAB, Kate Templeton, Janke Schinkel, Eric AT, Brienen, Marianne A**, 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1220-24.
 14. **Kehl KS, Cicirello H, Havens PL**, 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol*. 33: 416-18.
 15. **Krause W, Abraham A, Lehmann D**, 1995. Evidence of *Cryptosporidium* in children with symptomatic enteritis from the Leipzig administrative area 1987-1992. *Appl Parasitol*, 36: 66-71.
 16. **Lewthwaite P, Gill GV, Hart CA, Beeching NJ**, 2005. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. *Curr Opin Infect Dis*, 18: 427-35.
 17. **Merino E, Glender, W**, 1990. Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *J Clin Lab Ana*, 4: 39-42.
 18. **Moran P, Ramos F, Ramiro M, Curiel O, Gonzalez E, Valadez A, Gomez A, Garcia G, Melendro EI, Ximenez C**, 2005. Infection by human immunodeficiency virus-1 is not a risk factor for amebiasis. *Am J Trop Med Hyg*, 73: 296-300.
 19. **Noureldin MS, Shaltout AA, El Hamshary EM, Ali ME**, 1999. Opportunistic intestinal protozoal infections in immunocompromised children. *J Egypt Soc Parasitol*, 29: 951-961.
 20. **Ok ÜZ, Kavaklı, K., Çetingül N**, 1996. Kemoterapi uygulanan tümörlü çocuklarda barsak parazitlerinin sıklığı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 20: 385-90.
 21. **Özçelik S, Dökmetaş, S., Sümer, Z., İcağasıoğlu, D., Dökmetaş, İ.** 1996. Gastroenteritlilerde *Cryptosporidium* görülme sıklığı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 20: 333-337.
 22. **Öztürk R, Eroğlu C, Çaşkurlu H, Civanoglu D, Pala Ö**, 1994. İstanbul'da akut sürgünlü çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı. *Klimik Derg*, 7: 103-104.
 23. **Randall GR, Goldsmith RS, Shek J, Mehalko S, Heyneman D**, 1984. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Entamoeba histolytica* antigen in faecal samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 78: 593-95.
 24. **Rashid SM, Nagaty IM, Maboud AI, Fouad MA, Shebl A**, 2002. Comparative study on ELISA, IFA and direct methods in diagnosis of giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol*, 32: 381-89.
 25. **Rudrapatna JS, Sridhar H**, 1997. Intestinal parasitic infections in patients with malignancy. *J Diarrhoeal Dis Res*, 15: 71-4.
 26. **Shetty N, Prabhu T**, 1988. Evaluation of faecal preservation and staining methods in the diagnosis of acute amoebiasis and giardiasis. *J Clin Pathol*, 41: 694-99.
 27. **Sing K, Vohro, H., Vinayak, VK**, 2001. Partial characterization of a 36 kDa antijen of *Entamoeba histolytica* and its recognition by sera from patient amoebiasis. *FEMS. Immunol Med Microbiol*. 27: 23-70.
 28. **Sreedharan A, Jayshree RS**, 1996. Sridhar H: Cryptosporidiosis among cancer patients an observation. *J Diarrhoeal Dis Res*, 14: 211-13.
 29. **Subauste CS**, 2006. Primary immunodeficiencies and susceptibility to parasitic infections. *Parasite Immunol*. 28: 567-75.
 30. **Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H**, 1995. Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 19: 56-63.
 31. **Tanyüksel M, Petri WA**, 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16: 713-29
 32. **Tanyüksel M, Yılmaz H, Ulukanlıgıl M, Araz E, Çiçek M, Koru O, Taş Z, Petri WA, Jr**, 2005. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol*, 110: 322-26,
 33. **Ungar BLP**, 1995. Cryptosporidiosis. In *Principles and Practice Infectious diseases*. Edited by Mandell G.L. B, J.E., Doline, R. New York: Churchill Livingstone. p.2500-10.
 34. **Waywa D, Kongkriengdaj S, Chaidatch S, Tiengrim S, Kowadisiburana B, Chaikachonpat S**, 2001. Protozoan enteric infection in AIDS related diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 32: 151-155.
 35. **Weber R, Bryan, RT, Bishop, HS, Wahlquist, SP, Sullivan, JJ, Juraneck DD**, 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens.evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J Clin Microbiol*, 29:1323-27.
 36. **Winiacka-Krusnell J, Linder E**, 1995. Detection of *Giardia lamblia* cysts in stool samples by immunofluorescence using monoclonal antibody. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14: 218-222.
 37. **Wonsit R, Thammapalerd N, Tharavanij S, Radomyos P, Bunnag D**, 1992. Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in faecal specimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86: 166-9.
 38. **Yıldız M, Çöplü N, Kılıç S, Babür C, Öncül Ö**, 2001. Esen. B: İshali olan solid tümörlü olgularda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 25: 8.