

# Amebiyazis, Giardiyazis ve Kriptosporidiyazis Tanısında Antijen Tarama Yöntemlerinin Yeri

Yavuz UYAR, Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

**ÖZET:** Amebiyazis, gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. İnsanlar *Entamoeba*'nın morfolojik olarak identik iki türü ile enfekte olmaktadır. *Entamoeba histolytica*, amebik kolitis ve karaciğer absesine neden olurken, *Entamoeba dispar* nonivazivdir. *Giardia intestinalis*, dünyada tüm yaş gruplarında yaygın bir şekilde görülür. Giardiyazis özellikle sanitasyon şartlarının zayıf olduğu ve temiz su kaynaklarının bulunmadığı ülkelerde ortaya çıkan çocukluk çağı diyare vakalarından sorumludur. Hücre içi bir parazit olan *Cryptosporidium parvum*, immünkomprime bireylerde ölümcül diyarelere neden olabilmektedir. İnsan bağırsak protozoonları tanısı genellikle mikroskopiyeye dayanmaktadır. Mikroskopik tanı ucuz olmasına karşın yoğun iş gücü ve uzmanlık gerektirmektedir. Antijen tanı yöntemleri (direkt floresan antikor, enzim immunoassay ve hızlı dipstick benzeri testler) hızlıdır ve deneyimli ve usta değerlendiricilere ihtiyaç duyulmaz. Son yıllarda, *E. histolytica*, *G.intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp.'in laboratuvar tanısı için ticari tanı kitleri mevcuttur. Bu derlemede, bu üç bağırsak paraziti için kullanılan antijen testlerinin tartışılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Amebiyazis, Giardiyazis, Kriptosporidiyazis, Antijen, Tanı

## Antigen Detection Methods in Diagnosis of Amebiasis, Giardiasis and Cryptosporidiosis

**SUMMARY:** Amebiasis is a significant health problem in developing countries. Humans are infected by two morphologically identical species of *Entamoeba*. *Entamoeba histolytica* causes amebic colitis and liver abscess, and *Entamoeba dispar* is noninvasive. *Giardia intestinalis* infection is seen worldwide and in all age groups. But giardiasis is especially prevalent in countries with poor sanitation and unsafe water, where it's responsible for most cases of childhood diarrhea. *Cryptosporidium parvum*, a protozoon, is an obligate intracellular parasite which can cause fatal diarrheal disease in immunocompromised individuals. Generally, the diagnosis of human intestinal protozoa depends on microscopic detection. Microscopic detection is inexpensive, but it is very labor-intensive and requires a skilled microscopist. Antigen detection methods (direct fluorescent antibody, enzyme immunoassay, and rapid, dipstick-like tests) can be performed quickly and do not require an experienced and skilled microscopist. Recently, commercially available diagnostic kits for the intestinal parasites *E. histolytica*, *G.intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. use the laboratory diagnosis. In this review, we aimed to discuss the diagnosis of these three intestinal parasites using the antigen tests.

**Key Words:** Amebiasis, Giardiasis, Cryptosporidiosis, Antigen, Diagnosis

## GİRİŞ

### Klasik Dışkı Bakısına Genel Bakış

Parazit hastalıkları az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler için halen önemli bir sağlık sorunudur. Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birinin, bir veya birden fazla parazite konaklık ettiği ve bu insanların çoğunun da geri kalmış ülkelerde yaşadığı tahmin edilmektedir. İnsanlarda bulunan bağırsak parazitlerinin tanısı temel olarak dışkı, daha seyrek olarak da duodenal sıvı ve biyopsi örneklerinde parazitinin çeşitli formlarının saptanmasına dayanmakta ve kullanılan direkt veya boyalı

olarak dışkı mikroskopisinin birçok avantajı bulunmaktadır (14, 45). Dışkıda parazit bakısı özellikle örnekler uygun bir şekilde hazırlandığı ve yeterli sayıda örnek incelendiğinde oldukça duyarlı bir yöntem olup, tanıyı kesinleştirir ve altın standarttır. Işık mikroskobu ve bazı ucuz malzemelerin olduğu herhangi bir laboratuvarda yapılabilecek kadar basittir ve oldukça ekonomiktir.

Ancak ucuz ve hızlı olan klasik dışkı bakısının bir takım dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar arasında en önemlisi yetişmiş insan gücüne duyulan gereksinimdir. Gerçekten bu yöntemler oldukça basit olarak görünmelerine ve kolay uygulanabilir olmalarına karşın, doğru tanı koyabilecek deneyimli mikroskopistleri yetiştirmek oldukça zor ve maliyetlidir. Bu yöntemlerin bir diğer dezavantajı da elde edilen sonuçların genellikle tekrarlanabilir, izlenebilir ve objektif olmamasıdır (45). Bağırsak parazitlerinin aralıklı atımı nedeniyle tek bir dışkı örneği ile tanı koymak her zaman

Makale türü/Article type: **Derleme / Review**

Geliş tarihi/Submission date: 02 Nisan/02 April 2008

Düzeltilme tarihi/Revision date: 10 Mart/10 March 2009

Kabul tarihi/Accepted date: 13 Mart/13 March 2009

Yazışma /Corresponding Author: Ayşegül Taylan Özkan

Tel: - Fax: -

E-mail: aysegul.taylanozkan@rshh.gov.tr

mümkün olmamaktadır. En az üç dışkı örneğinin incelenmesiyle bile *Giardia intestinalis* için %11,3, *Entamoeba histolytica* için %22,7'lik bir tanı düzeyine erişilebileceği bildirilmiştir (59). Bu durum ise hastaların ve/veya örneklerinin üç kez laboratuara ulaştırılmasını gerektirmektedir.

Son yıllarda klasik dışkı bakışı önemli ölçüde ihmal edilmektedir. Parija ve Srinivasa (45) yaptıkları çalışmalarında balık kılıçığı diyagramı kullanarak bu ihmalin gerçeklerini araştırmışlar ve aşağıdaki sonuçlara ulaşmışlardır:

1. Dışkı mikroskopisi yapan teknisyenlerdeki motivasyon eksikliği (Dışkı ile uğraşmanın zorluğu, formal eğitimdeki eksiklik, uzmanların eğitimlerinin yetersizliği)
2. Dışkı mikroskopisi sonuçlarına klinisyenlerin önem vermeyişi
3. Son yıllarda bağırsak parazitlerinin tanısında direkt floresan antikor (DFA), enzim immün assay (EIA, ELISA), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi mikroskopiyeye ihtiyaç duyulmayan yöntemlerin kullanımının artması da dışkı mikroskopisinin ihmaline yol açan sebepler arasındadır.

Klasik dışkı bakışının dezavantajları, bilim adamlarının dışkı tanısı için alternatif yöntemler bulmaya zorlamış; uzun yıllardır kan ve serumda *Plasmodium* ve *Wuchereria bancrofti* enfeksiyonlarının araştırılmasında başarıyla kullanılan antijen tarama yöntemlerinin bağırsak parazitlerine de uygulanmasını sağlamıştır (56). Antijen tarama yöntemleri arasında DFA, EIA ve immunokromatografik testler hızlı tanı konulabilmesi, deneyimli ve eğitilmiş personele gereksinim duyulmaması gibi avantajları nedeniyle en sık tercih edilen yöntemlerdir. Günümüzde insanlarda *E.histolytica*, *G.intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp., enfeksiyonlarının tanısına yönelik taze ya da saklanmış dışkıları uygulanabilen hazır tanı kitleri piyasada bulunmaktadır. Ayrıca gerek insanlarda gerekse hayvanlardaki *Fasciola hepatica*, *Echinococcus* sp. ve *Taenia* sp. gibi birçok parazitlerin araştırılmasında da bu yöntemlerden yararlanılmaktadır (56).

Bu derlemede amebiyazis, giardiyazis ve kriptosporidiazis tanısında günümüzde yaygın olarak kullanılan antijen tarama testleri gözden geçirilmiştir.

## I. AMEBİYAZİS

*E.histolytica*'nın etkeni olduğu amebiyazise dünyada her yıl 50 milyon insan yakalanmakta ve 100 bin kadarı ölmektedir (54, 60). Ülkemizde yapılan araştırmalarda da bu enfeksiyonun insidansının %1,2-13,0 arasında değiştiği sap-tanmıştır (34, 55, 63). Amebiyazis enfeksiyonu geçirenlerin %10'unda hastalık semptomatik seyretmekte ve ciddi fulminan amebik kolit, ekstraintestinal amebiyazis, karaciğer absesi gibi çeşitli ölümcül klinik tablolara yol açabilmektedir (46, 54). İnsanlar, *Entamoeba*'nın patojen *E.histolytica* ve nonpatojen *E.dispar* olmak üzere morfolojik olarak ayırt edilemeyen iki türü tarafından enfekte olmaktadır (30, 46, 54). İlk kez 1925 yılında Brumpton tarafından ortaya atılan bu fikir ancak 1978 yılında

Sargeant ve arkadaşları tarafından yapılan izoenzim analizleri ile ispatlanmıştır (30, 41). Günümüzde, ileri moleküler yöntemlerle bu parazitlerin iki ayrı tür olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır (46, 54).

## Amebiyazis Tanısında Antijen Tarama Testlerinin Gerekliği

Amebiyazis ile ilgili yapılan çok sayıda epidemiyolojik araştırma ve raporlarda şu sonuçlara ulaşılmıştır: (i) Bağırsak dışı amebiyazisde her iki tür de dışkıda saptanamamaktadır; (ii) *E.histolytica* ile enfekte bireylerin çoğu asemptomatiktir; (iii) endemik bölgelerde yaşayan insanlar her iki türle de aynı anda enfekte olabilmektedir; (iv) *E.dispar* ile enfekte kişilerde de bazen intestinal semptomlara rastlanılabilmekte ya da yüksek titrede antikorlar bulunabilmektedir (11, 39).

Rutin tanısal incelemede, dışkı örneklerinde *E.histolytica*'nın *E.dispar*'dan ayırt edilebilmesi, olguların tedavilerinin doğru yönlendirilebilmesi ve bulaş açısından son derece önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1997 yılında *E.dispar*'lı olguların tedavi edilmemesi, semptomu olsun olmasın kesin olarak *E.histolytica* tanısı alan hastaların ise mutlak tedavi edilmesi gerektiği belirtilmiştir; *E.histolytica*/*E.dispar* ayırımı yapılamayan olguların tedavisi ise klinisyene bırakılmıştır (60). Ayrıca *E.histolytica* ve *E.dispar*'ın morfolojik olarak ışık mikroskopu ile ayırt edilemeyeceği, bu nedenle raporlamanın *E.histolytica*/*E.dispar* olarak yapılması gerektiği bildirilmiştir. Bu ayırım ancak SSU-rRNA dizilimi, fosfogluktomutaz farklılığı, heksokinaz izoenzim özellikleri, asit fosfatase sekresyonu ve özel DNA sekansları ile yapılabilmektedir (1, 22, 60). Yapılan birçok çalışmada patojen zimodemlerle enfekte asemptomatik kist taşıyıcılarının da tedavisinin gerekli olduğu ve bu kişilerle ya da invaziv amebiyazisliyle temas öyküsü olan olguların en az altı ay süre ile izlenmesi tavsiye edilmiştir (28).

*E.histolytica* trofozoidleri, dış ortamda 15-20 dakika içinde ölümlerine haftalarca canlı kalabilir (22). Bu kistlerin enfekte ettiği sular ve bu sularla yıkanmış olan sebze ve meyvelerin çiğ olarak yenmesi hastalığın diğer insanlara yayılmasında çok önemli rol oynamaktadır. Enfekte olan kişilerin %90'ında klinik tablo asemptomatik seyretmekte ve bu kişiler aylarca dışkılarıyla kist çıkartabilmektedirler (46, 54).

Dışkının uygun sayıda ve uygun koşullarda toplanmaması; hastanın antibiyotik, laksatif, antiasit gibi ilaçlar kullanması da mikroskopik inceleme sonuçlarını olumsuz yönde etkilemektedir (22, 54). Bekletilmiş ya da fiksateye alınmış dışkıları da *E.histolytica* trofozoidlerinin tipik hareketlerini saptamak mümkün olmadığından, tedavi edilmeyen olgular bulaş kaynağı olmayı sürdürmektedirler (41, 54). Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi (2004)'ne göre morfolojik olarak kesin *E.histolytica* tanısı konulabilmesi için dışkıda eritrosit içeren trofozoidlerin görülmesi şarttır (52). Ancak bu özellikle semptomatik hastalarda bile sanıldığı kadar sık karşılaşılan ve kolay saptanabilecek bir durum değildir. Tanyüksel ve ark (53)

kesin olarak *E.histolytica* tanısı konulmuş 51 olgunun yalnızca ikisinde eritrosit içeren trofozoit gördüklerini bildirmişlerdir. Ayrıca bazı olgularda eritrosit fagosite etmiş *E.dispar*'lara da rastlanılabilmektedir (54).

Bağırsaklarda *E.dispar* kolonizasyonunun gelişmekte olan ülkelerde en az üç kat, gelişmiş ülkelerde ise 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (46). Mikroskopik incelemede, *E.dispar* ve *E.histolytica* ayrımı yapılamadığı gibi fekal lökosit, makrofaj ve diğer amiplerle ayrımı da tam yapılamadığından yalnızca pozitif sonuç verilebilmektedir (1, 54). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada laboratuvarların 1/3'ünde yanlış teşhis konulduğu bildirilmiştir (35). Bu durum olguların gereksiz tedavi edilmesine, tedavinin yan etkilerine maruz kalmasına, hatta alta yatan başka hastalıkların atlanmasına; toplum sağlığı açısından da gereksiz tedavi maliyeti ve ilaç direncinin gelişmesine yol açmaktadır (41).

#### Amebiyazis Tanısında Kullanılan Antijen Tarama Yöntemleri

Son yıllarda *E.histolytica* ve *E.dispar*'ın ayrırcı tanısında *E.histolytica*'ya özgü antijenlerin saptanması temeline dayanan ve devrim olarak nitelendirilen yöntemler geliştirilmiştir (17). Bunlar arasında izoenzim analizi, EIA yöntemiyle antijen aranması, spesifik DNA probu ile hibridizasyon, PCR ve RFLP (restriction fragment length polymorphism) sayılabilir (1). Kültür ve izoenzim analizi uzun sürede sonuçlanması nedeniyle rutin uygulamada pek tercih edilmemektedirler. İndirekt Flüoresan Antikor (IFA) yöntemiyle dışkıda *E.histolytica*'ya özgü serbest lektin saptanamayacağı bu nedenle de sensitivitesinin düşük olduğu belirtilmektedir (62). PCR'in günümüzde "altın standart" olarak tanımlanması söz konusuysa da EIA'ya kıyasla daha uzun sürede sonuçlanması, teknik olarak karmaşıklığı ve pahalı olması kullanımını kısıtlamaktadır (39). Ayrıca PCR, kontaminasyon nedeniyle yalnızca pozitiflik ya da dışkıdaki inhibitör maddeler nedeniyle yalnızca negatiflik riski de taşımaktadır (54).

Amip antijeninin tükürük, serum, abse örneklerinde farklı immunolojik yöntemlerle saptandığına dair araştırmalar mevcutsa da özgüllükleri ve duyarlılıkları dışkıda antijen aranmasına göre oldukça düşüktür (54).

Son yıllarda hızlı tanı yöntemlerinden de amip tanısında yararlanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde bu konuda yapılan bir çalışmada *E.histolytica* ELISA yöntemi ile pozitif olan 23 hastanın 21'i dipstick testi ile de pozitif olarak saptanmış; dipstick testinin hızlı ve kolay uygulanabilir olmasına karşın duyarlılığının geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (55).

Günümüzde dışkıda *E.histolytica* antijeni saptamada en yaygın olarak EIA kitleri kullanılmaktadır (Tablo 1) (15, 22, 46, 54). Piyasada hazır olarak bulunan bu testlerin bir çok avantajı bulunmaktadır (54): (i) Bazı kitlerle *E.histolytica*/*E.dispar* ayrımı yapılabilmektedir; (ii) Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir; (iii) Deneyimli mikroskopistlere ihtiyaç duymadan, hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilir; (iv) 96 çukurlu plak

formatı büyük kapsamlı epidemiyolojik araştırmaları kolaylıkla yapmaya imkan verir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise mikroskopiye göre göreceli olarak daha pahalı olması ile taze ve fiksatif içermeyen dışkıya gereksinim duyulmasıdır (56).

EIA tabanlı antijen saptamaya yönelik kitlerde farklı monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında; patojen olan *E.histolytica*'ya özgü galaktoza ve *N*-asetil-D-galaktozamin'i bağlayan lektine (Gal/GalNAc) ya da serin-zengin antijene karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar sayılabilir (41, 46, 54). Ayrıca araştırma amacıyla lizin-zengin yüzey antijeni, lipofosfoglikan, tükürük 170-kDa lektin bağlama antijenlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar da denmektedir (46, 54).

EIA tekniğinde özel bir sıvı ile sulandırılan gaita örneği, adezine spesifik monoklonal antikor içeren konjugatla birlikte *E.histolytica* adezinine bağlanan poliklonal antikorlar yapılandırılmış kuyucukların bulunduğu mikroleptlere aktarılır. Şayet hasta örneğinde adezin varsa, inkübasyon sırasında konjugatta bulunan adezin spesifik monoklonal antikorlara ve kuyucuklardaki poliklonal antikorlara bağlanır. Spesifik olmayan bağlanmalar yıkama sırasında ortamdaki uzaklaştırılır. Substratın ilavesi ile adezin varlığında oluşan enzim-antikor-antijen kompleksine bağlı renk oluşumu tespit edilir (15).

Dünyada 1980'li yılların ortalarından itibaren farklı antijenik determinantlara karşı kullanılan monoklonal antikorlar ile EIA yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığının %100'lere kadar çıkabildiğinin ortaya konması bu yöntemin mikroskopiye alternatif olarak önerilmesine yol açmıştır. İlk başlardaki testlerle *E.histolytica*/*E.dispar* ayrımı yapılamamakta iken yapılan çalışmalarla Gal/GalNAc ile inhibe edilebilen lektin yapısındaki proteinin epitop haritası çıkartılmış ve *E.histolytica*'yı ayırt edebilen testler geliştirilmiştir (31, 41). Haque ve ark (30), *E.histolytica*'ya spesifik ELISA kitinin direkt mikroskopi ve kültüre göre %100 duyarlı ve %97 özgül olduğunu saptamışlardır.

ELISA yöntemi diğer bağırsak parazitleriyle çapraz reaksiyon göstermemesi açısından da avantajlı olup (49) zimodem analizi ve PCR ile de eşdeğer sonuçlara ulaşmaktadır. 202 ishali dışkı örneğinin *E.histolytica*, *E.dispar* açısından tarama ve spesifik amaçlı ELISA kitleri ile araştırıldığı bir çalışmada kültür yöntemleri baz alındığında mikroskopinin %60 duyarlı, %79 özgül olduğu, antijen tarama yöntemlerinin ise %80 duyarlı ve %99 özgül olduğu saptanmıştır (30). *E.histolytica*/*E.dispar*'ın ayırımında zimodem analiziyle karşılaştırıldığında ise ELISA'nın %95 duyarlı, %93 özgül bulunduğu, uygulama kolaylığı ve hızı göz önüne alındığında bu yöntemin zimodem analizi yerine ikame edilebileceği bildirilmiştir. Yöntemin en önemli dezavantajı ise taze ve fiksatif içermeyen dışkıların kullanılmasının gerekliliğidir (56).

**Tablo 1.** Paraziter tanıda kullanılabilen antijen testleri, kit adı, üretici firma ve test yöntemi listesi \*

Organizma	Kit adı	Üretici ve distribütör	Test tipi
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Crypto CELISA	Cellabs	EIA
	PARA-TECT™ <i>Cryptosporidium</i> 96	Medical Chemical Corporation	EIA
	ProSpecT Rapid	Remel	EIA
	ProSpecT	Remel	EIA
	<i>Cryptosporidium</i>	TechLab	EIA
	<i>Cryptosporidium</i>	Wampole	EIA
	Crypto CEL	Cellabs	IFA
	XPect Crypto	Remel	Rapid
<i>Cryptosporidium</i> spp./ <i>G. lamblia</i>	PARA-TECT™ <i>Cryptosporidium</i> /Giardia DFA 75	Medical Chemical Corporation	DFA
	Merifluor	Meridian	DFA
	ProSpecT	Remel	EIA
	Crypto/Giardia CEL	Cellabs	IFA
	ColorPAC*	Becton Dickinson	Rapid
	ImmunoCard STAT!*	Meridian	Rapid
	XPect	Remel	Rapid
<i>Cryptosporidium</i> spp./ <i>G. lamblia</i> / <i>E. histolytica</i> /dispar	Triage	BioSite	Rapid
<i>Entamoeba histolytica</i>	Entamoeba CELISA	Cellabs	EIA
	<i>E. histolytica</i>	Wampole	EIA
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i> II	TechLab	EIA
	ProSpecT	Remel	EIA
<i>Giardia lamblia</i>	Giardia CELISA	Cellabs	EIA
	PARA-TECT™ <i>Giardia</i> Antigen 96	Medical Chemical Corporation	EIA
	ProSpecT	Remel	EIA
	Giardia II	TechLab	EIA
	Giardia	Wampole	EIA
	GiardiaEIA	Antibodies, Inc.	EIA
	Giardia CEL	Cellabs	IFA
	ProSpecT	Remel	Rapid
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Filariasis CELISA	Cellabs	EIA

(\*) Bu tablo CDC'nin resmi web sitesinden alınmıştır (15). <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>

PCR ile piyasadaki mevcut kitlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada; serin-zengin antijene karşı monoklonal antikorlarla geliştirilmiş Merlin Optimum S'in en duyarlı kit olduğu ve 100trofozoit/cukur saptayabildiği belirlenmiştir. Ancak bu kit dışkıda yüksek konsantrasyonda *E. dispar* bulunduğu çapraz reaksiyon göstermektedir. Gal/GalNAc monoklonal antikor kullanan Techlab kiti yalnızca *E. histolytica* ile reaksiyon gösterdiği için %100 spesifik olmasına karşın her çukurda 1000 ve üzerindeki trofozoiti saptayabilmekte, dışkısında az sayıda parazit olan asemptomatik hastaların tanısında da sorun olabileceği düşünülmektedir. Poliklonal antikorlar içeren Alexon marka kit ise her çukurda 100'ün üzerinde trofozoiti saptayabilmesine karşın, *E. histolytica*/ *E. dispar* ayrımı yapı-

mamaktadır. Her çukurdaki tek bir trofozoiti bile belirleyebilen PCR, ELISA'ya göre 100 ile 1000 kat hassas olmasına rağmen rutin tanıda ELISA'nın kullanılmasının daha uygun olacağı ifade edilmektedir (39).

Ülkemizde de son yıllarda amebiyazis tanısında ELISA yönteminin uygulanması tercih edilmeye başlanmıştır. İstanbul'da ve Ankara'da yapılan çalışmalarda mikroskopıyla karşılaştırıldığında ELISA yönteminin duyarlılığının %100, özgüllüğünün ise %79-93,4 olduğu saptanmıştır (12, 41)

Ülkemizde rapor edilen amip olgularının büyük bir bölümünün patojen olmayan *E. dispar*'a ait olduğu ve bu hastaların yanlış tanı dolayısıyla da yanlış tedavi aldığı ileri sürül-

mektedir. Nar ve ark (41) Ankara'da nativ-Lugol ve metilen mavisi ile gerçekleştirilen direkt mikroskopiyle 142 mental retarde hastanın %13,3'ünde, gastrointestinal şikayetleri olan 77 kişinin %9,1'inde *E.histolytica*/*E.dispar* saptarken, ortak yüzey antijeni içeren ELISA kiti ile bu oranları %19,0 ve %20,7 olarak belirlemişlerdir. Spesifik antijen araştırıldığında ise sırasıyla %3,7 ve %6,25 bulunmuştur.

Yapılan birçok çalışmada mikroskopinin ELISA'ya kıyasla özgülüğünün yüksek ancak duyarlılığının az olduğu ve aralarındaki tutarlılığın da düşük bulunduğu belirlenmiştir. Mersin'de yapılan bir çalışmada dışkı örneklerinde trikrom boyama ile %20,4, *E.histolytica*/*E.dispar* ortak antijeni saptayan ELISA ile %29,5 pozitiflik saptanmıştır. Uyumsuzluk gösteren örneklerden yalnızca direkt mikroskopi ile %4,5, yalnızca ELISA ile %13,6 örneğin pozitif olduğu bulunmuştur (17). Ankara'daki bir çalışmada intestinal amebiasis ön tanısıyla gönderilen dışkı örneklerinde mikroskopik inceleme (Nativ-Lugol, formol-eter çöktürme yöntemi ve trikrom boyama) ile *E.histolytica* spesifik adezini saptayan ELISA yöntemleri karşılaştırılmıştır. 231 örneğin 81'inde (%35,0) mikroskopik inceleme ile *E.histolytica*/*E.dispar* kist ve/veya trofozoiti, 41'inde (%17,7) ise *E.histolytica* spesifik adezini saptanmıştır. Mikroskopisi pozitif olan 81 örneğin 35'i (%42,6) ELISA yöntemiyle pozitif bulunurken; ELISA ile pozitif saptanan altı örnek (%7,3) ise mikroskopide negatif olarak değerlendirilmiştir. *E.histolytica* saptanması açısından iki yöntem arasında pozitif ve negatif değerlerin tutarlılığı çok düşük, farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (34).

Benzer sonuçlar Şanlıurfa ve Van yöresinden toplanan örneklerde de saptanmıştır. Trikrom boyama ile 380 örneğin %24'ünde, *E.histolytica* ya spesifik antijen ELISA yöntemiyle %13'ünde pozitiflik belirlenmiştir. ELISA ile pozitif saptanan 51 örneğin 37'si mikroskopide negatif; ELISA ile negatif saptanan 329 örneğin de 77'si de mikroskopide pozitif bulunmuştur (55).

Ülkemizde sanıldığı aksine amip insidansı çok yüksek değildir. Endemik kabul edilen bölgelerde, gastrointestinal şikayeti olan olgu gruplarında bile %1,4-13,0 oranında pozitiflik saptanmaktadır (55, 63). Bazı çalışmalar birçok *E.histolytica*'lı hastanın tedavi almadığını ya da *E.dispar*'lı olguların gereksiz tedavi edildiğini göstermesi açısından oldukça çarpıcıdır. Şanlıurfa'da 1600 gaita örneğinden 583'ünde nativ-lugol ve çoklaştırma yöntemi ile mikroskopide bir veya daha fazla parazit saptanmış, amip şüphesiyle ayrılan 87 gaita örneğinin ELISA yöntemiyle yalnızca 19 (%21,7)'unda *E.histolytica*/*E.dispar* ortak antijeni bulunmuştur (63).

Bu sonuçlar ışığında; mikroskopik inceleme *E.histolytica*/*E.dispar* ayırıcı tanısında ve *Entamoeba* kist ve/veya trofozoit yapılarının diğer protozoonlar ve makrofaj/lökosit gibi hücresel elamanlardan ayırımında yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle amebiyazis tanısında objektif değerlendirmeyi sağlayan, ucuz, basit, herhangi bir pahalı donanım ve deneyim gerektirmeyen antijen saptama temeline

dayalı ELISA yönteminin rutin mikroskopi ile birlikte kullanılması son derece yararlı bulunmaktadır.

## II. GIARDİYAZIS

*Giardia intestinalis*, dünyanın her tarafında endemik ve epidemik diyarelerin başta gelen etkenlerindedir. Gelişmekte olan ülkelerde enterik patojenlerin birinci sırada nedeni olup, prevalansı özellikle 10 yaşından küçük çocuklarda %15-30 arasındadır (16, 43). Ülkemizde yapılan araştırmalarda giardiyazis insidansı %1,9-37,7 arasında değişmektedir (6, 7, 10, 16, 36, 43). Akut ve kronik formda seyredabilen giardiazis asemptomatik seyredebileceği gibi hayatı tehdit eden diyarelere de neden olabilmektedir.

### Giardiyazis Tanısında Antijen Tarama Testlerinin Gerekliliği

Fekal-oral yolla bulaşan giardiyazis özellikle çocuklarda duodenumdan yağ ve yağda eriyen vitaminlerin emilimini bozarak malabsorbsiyona yol açması nedeniyle son derece önemli bir enfeksiyondur (18, 22, 36, 57). Çocukların yanı sıra kötü koşullarda ve yetersiz su ile yaşayanlar, toplu yerlerde bulunanlar, endemik bölgeye seyahat ve kamp öyküsü olanlar, göçmenler, immün direnci bozuk olanlar ve homoseksüel erkekler de risk altındadır (22, 49).

Gelişmiş ülkelerde %2-5 arasında değişen dışkıda kist saptanma oranı, gelişmekte olan ülkelerde özellikle çocuklarda %30-35'e kadar çıkabilmektedir (2, 20). Bir çok kişi herhangi bir semptom göstermeksizin *Giardia* taşıyabilir ve *Giardia* saptanan hastalar semptomatik olmasa da mutlak tedavi edilmelidir. Yapılan çalışmalarda asemptomatik enfeksiyonların subklinik malabsorbsiyona yol açabileceği gösterilmiştir. Hastalığın semptomlarına genellikle periyodik olarak rastlandığı için şikayetlerin daha sonra ortaya çıkma olasılığı da bulunmaktadır. Ayrıca bu kişiler sürekli kist saçarak, enfeksiyonun diğer insanlara ve çevreye bulaşında rol oynamaktadırlar (22).

*Giardia* çevre koşullarına son derece dayanıklı kistleriyle su ve gıda kaynaklı salgınlara yol açabilmektedir. 10-25 kadarcının insanlar için enfektif olduğu belirtilen kistler standart klorlama prosedürlerine son derece dirençlidir. Yüzey sularında 240 adet/lt olabilen kist sayısı, lağım sularında 88.000 adet/lt'e ulaşabilmektedir (2)

Giardiasis tanısında mikroskopik metot ilk seçenektir ve birçok avantajı vardır. Test maliyeti düşük olan bu yöntemle *Giardia* haricinde başka parazitler de saptanabilir. Fakat *G. intestinalis* kist formunun aralıklı olarak dışkıyla atılması veya dışkıdaki kist sayısının az olması halinde tek bir örnekteki dışkı bakişimin duyarlılığı oldukça düşüktür. Duodenal villuslara emici diskle-riyle yapışmış olan *Giardia* trofozoitleri, epitel hücrelerinin 72 saatte bir dökülmesi ile dışkıdan atıldıklarından parazitlerin her zaman dışkıda gösterilmesi mümkün olamamaktadır (22). Tek bir gaita örneği ile yapılan rutin gaita incelemesinde, konsantasyon metodu da eklense vakaların %10-50'sinde yanlış sonuçlar rapor edilebilmektedir. Aynı hastadan çoklu örnek alınsa bile duyarlılığın ancak %85'e çıkartılabileceği belirtilmiştir (20, 21).

Geleneksel tanı metotlarında deneyimli personel gerekmektedir, fazlaca efor ve zaman harcanmaktadır. İyi bir değerlendirme için en az üç örneğe ihtiyaç duyulması mikroskopinin diğer bir dezavantajı olup hasta uyumunu güçleştirmektedir. Dışkıların zaman geçirmeden incelenmesi ve mutlak kalıcı dışkı boyama yöntemleri uygulanmasının gerekliliği de test performansı açısından önemlidir. Deneyimli teknisyenlere duyulan ihtiyaç da bir başka zorluktur. Örneğin mukuslu dışkıların trofozoitin hareketlerini engelleyebildiğinden trofozoit formları rahatlıkla gözden kaçabilmektedir (22). Saklama ya da konsantrasyon amacıyla kullanılan ajanlarla çalışma gerekliliği de bir başka sorundur. Formalin lokal irritandır, PVA (polyvinil alcohol) ve Schaudinn içinde bulunan civa bileşikleride hem lokal irritandır hem de sistemik zehir etkisine sahiptir (21).

Mikroskopi dışında, enterotest, duodenal biyopsi ve fırça örneklerinin incelenmesi parazitin saptanma olasılığını arttırsa da invaziv olmaları, göreceli olarak pahalı olmaları ve özellikle çocuklarda uygulanmasının zorluğu nedeniyle tercih edilmemektedir (3).

Serumda antikor araştırılmasıyla ilgili bazı çalışmalar bulunmaktaysa da giardiyazide serolojik tanının değeri bulunmamaktadır (4, 22, 36). Tedavi sonrasında antikor düzeyi 2 hafta ile 15 ay gibi bir süre yüksek kalabilir (3).

Bulaşıcı hastalıkların bildirim sistemi göre tanı için geçerli laboratuvar teknikleri arasında dışkı, duodenal sıvı ya da biyopsi örneklerinin mikroskopik incelemesinde kist veya trofozoitlerin görülmesi ayrıca DFA ve ELISA yöntemleri ile immunodiagnostik tanı sayılmıştır. Bildirimi zorunlu bir hastalık olan giardiazide kesin tanı konulabilmesi için bu laboratuvar tekniklerinin en az biri ile pozitif sonuç alınması şarttır (52).

Gaita örneklerindeki organizmanın yüzeyindeki antijenlerin saptanması mikroskopik tekniklere göre *Giardia* tanısında daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Giardiasis immünojenik tanısında ticari olarak temin edilebilen ürünler mevcuttur.

#### **Giardiyazis Tanısında Kullanılan Antijen Tarama Yöntemleri**

Giardiyazide antijen tarama amacıyla kullanılan counter immunoelktroforez, ELISA, dot-ELISA, DFA, IFA, PCR gibi birçok yöntem bulunmaktaysa da günümüzde piyasada ticari olarak mevcut bulunmaları ve yüksek sensitiviteyi nedeniyle DFA, EIA ve dipstick testleri en çok tercih edilenler arasındadır (15, 16, 20, 22, 43, 51). Dışkı örneklerinde parazitin yüzey antijenlerini saptamaya yönelik olan bu testlerde genellikle *Giardia*'ya spesifik antijen 65-kDa glikoprotein (GSA 65) kullanılmaktadır. İnsan dışkısında saptanan başlıca antijen olan GSA 65 parazitin hem kist hem de trofozoit formlarında bulunur (59). Bazı kitlerde yer alan monoklonal antikorlarla *Cryptosporidium*, *Entamoeba* ve *Giardia* birlikte taranabilmektedir.

DFA yöntemi giardiazide referans test olarak tanımlanmaktadır, rutin dışkı bakı yöntemlerinin hepsinden daha duyarlıdır

ve diğer parazitlerle çapraz reaksiyon görülmemektedir (29, 57, 58, 64). Bu yöntemde gaita örneklerindeki *Giardia* kistleri fluorescein isothiocyanata (FITC) bağlı monoklonal antikorlar kullanılarak saptanmaktadır. Mikroskopik tanı yöntemi ile karşılaştırıldığında bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 dolayındadır (22). *Cryptosporidium* ookist ve *Giardia* kistlerini birlikte saptayabilen kombine DFA kitleri de ticari olarak mevcuttur. DFA yöntemiyle kist ve ookistlerin kantasyonu da yapılabildiğinden epidemiyolojik, kontrol ve çevresel örneklerle yürütülen çalışmalarda daha kullanışlıdır (15, 37, 44, 61). Karanis ve ark (33) sığırcı rodent gibi hayvan *Giardia* türlerini taramada DFA'nın mutlak üstünlüğü olduğunu, faz kontrast mikroskopisinin ise spesifik tanılamada daha işlevli olduğunu belirtmişlerdir.

Giardiyazis tanısında DFA yanı sıra ELISA da mikroskopiye kıyasla oldukça duyarlı ve özgül bir yöntemdir (9). 1985 yılında gözle izlenebilir ELISA yönteminin geliştirilmesi, 1989 yılından itibaren *Giardia*'ya özgü 65-kDa spesifik antijenin ELISA yönteminde uygulanmaya başlamasıyla bu testlerin özgüllüğü %99-100, duyarlılığı ise %96-99'lara kadar çıkmıştır (20, 49, 51, 59).

*Giardia* ELISA yöntemiyle çok hafif enfeksiyonlarda bile az miktardaki fekal antijeni saptanabilmekte ve hastalardan birden fazla örnek alınmasına duyulan gereksinim ortadan kalmaktadır. Vidal ve Catapani (59), tek bakı ile Prospect ELISA yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında 142 örneğin 7'sini mikroskopi ile 12'sini ELISA ile pozitif bulmuşlar ve yalnızca *Giardia* aranacağı zaman bu testlerin tercih edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

ELISA'da poliklonal antikorlar yanısıra suda eriyen giardiyal antijenleri yakalayabilen katı faz IgG1 alt sınıfında kist duvarı ile reaksiyon veren fare monoklonal antikorları ve tavşan antikist poliklonal antikorları da kullanılmıştır. Bu monoklonal antikor ile tanınan antijen ısıya (100 °C, 12 dak) ve sodyum periodat muamelesine dayanıklı olup, 45 000 ile 110 000 moleküler ağırlığındadır. Monoklonal antikor kullanımına dayalı ve gözle okumaya imkan veren bu ilk yöntemle giardiyazis tanısında prezervatife alınmış dışkılardaki duyarlılık %97, alınmamışlarda ise %82'ye ulaşmıştır. Bu monoklonal antikorun çukur başına beş kiste kadar paraziti saptayabildiği belirlenmiştir (51). Duque-Beltran ve ark (20) Kolombiya'daki hastalardan topladıkları örneklerdeki *Giardia* antijenlerine karşı geliştirilen poliklonal antikorlarla ELISA ile duyarlılığı %100, özgüllüğü %95 saptamışlardır.

ELISA yöntemi yerel suşlara karşı mono ve poliklonal antikorlar geliştirilerek kolayca hazırlanabileceği (20) gibi günümüzde kullanıma hazır ticari ELISA kitleri de bulunmaktadır (Tablo.1). Bu kitlerin farklı açılardan avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Maraha ve Buiting (38) dört EIA kitinin özgüllüğü ve pozitif prediktif değerini mikroskopiye göre oldukça yüksek bulmuşlardır. İnkübasyon süresi uzun olan EIA kitinin (ProSpecT, EZ, Alexon-Trend Inc, Minn.) duyarlılığının yüksek (%91), işlem basamaklarının az ve gözle okunabilir olması

nedeniyle kullanımının daha kolay olduğu belirtilmiştir. İncelenen kitler arasında *Giardia* CELISA kitinin en düşük (%63), DSL-*Giardia*-ELISA ve Metotest Giardiasis Ag kitlerinin aynı duyarlılığa (%81) sahip olduğu bulunmuştur.

Taze veya dondurulmuş gaita örnekleri ile formalin, mertiolat-iyot-formaldehit veya sodyum asetat-asetik asit-formalin ile fikse edilmiş prezerve gaita örnekleri de çalışmaya elverişlidir ancak kullanılacak kitin ve prezervatif maddenin özelliklerini ve birbirleriyle uyumunu bilmek gereklidir. Dört °C'de iki haftaya kadar bekletilmiş dışkılarda ya da defalarca dondurulup çözülen dışkılarda sonucun değişmediği belirtilmiştir (59). Santrifüjle konsantre edilmiş örneklerin kullanılması yönünde farklı görüşler bulunurken (15, 57, 59), polivinil alkol ile muamele edilmiş örneklerin uygun olmadığı bildirilmektedir (15). Fedorko ve ark (21) formalin ve civa içermeyen Ecofix, Parasafe, Streck doku fiksatifi gibi ajanlar içinde saklanan dışkı örneklerinde EIA kitlerinin performanslarının farklı olduğunu belirlemişlerdir. Sözelimi tek prezervatif olarak ecofix kullanılacaksa Meridian EIA ve Techlab EIA kitleri yerine Alexon EIA yeğlenmeli, uzun süre saklanmış dışkı örneklerinde ELISA uygulanması planlanı-yorsa fiksatif olarak formalin tercih edilmelidir.

Giardiasis tanısında tek bir gaita örneğinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan ELISA yöntemi aynı anda çok miktarda örneğin kısa bir sürede çalışılabilmesine olanak tanımaktadır. Hasta ve taşıyıcıların saptanmasında, tedavinin takibinde, endemik bölgelerde ayrıca su kaynaklı salgınlarda ve epidemiyolojik çalışmalarda kolaylıkla uygulanabilecek non invaziv bir yöntem olarak önerilmektedir (9). Yöntemin bir diğer avantajı da dışkıda bulunan diğer parazitlerle çapraz reaksiyon oluşturmamasıdır (49, 59). Ancak bu diğer yandan yöntemin bir dezavantajıdır, çünkü gaitada bulunan diğer parazitleri tanıma olanağı yoktur (57, 59).

Yöntemin en önemli dezavantajı mikroskopiye göre daha pahalı olmasıdır. Ancak aynı hastaya birkaç kez bakılmasının iş gücü ve hastanın ya da örneğin ulaştırılmasının maliyetleri de hesaplandığında eşdeğer olduğu belirtilmektedir (20). Ayrıca tecrübesiz elemanların yanlış negatif sonuç vermesinin yanı sıra tecrübeli elemanların hastalığın biyolojisinden dolayı aralıklı kist atılımı nedeniyle paraziti saptayamamasının toplum sağlığına maliyetleri de göz önüne alındığında yöntem sanıldığı kadar pahalı değildir. ELISA'nın 6.70 USD, mikroskopik dışkı bakılarının ise 0.02-0.10 USD'ye mal olduğu saptanmıştır.

Giardiyazis tanısında rutin uygulamalar arasında immunokromatografik yöntemler de oldukça sık olarak kullanılmakta ve piyasada hazır kit halinde bulunmaktadır. Formalin ile fikse edilmiş örneklerle de çalışılabilen hızlı tanı kitlerinin referans DFA yöntemi ile kıyaslandığında özgüllükleri (%99,5-100) ve duyarlılıkları (%81,3-97,2) oldukça yüksek bulunmuştur (23, 32). Yöntemin 10 dakika kadar kısa bir sürede sonuçlanması ve diğer parazitlerle çapraz reaksiyon göstermemesi avantajları arasında sayılabilir. Ancak az sayıda kistin olduğu

hafif enfeksiyonlarda yalancı negatif sonuç alınabilmektedir. Bu testin maliyeti daha yüksek görünmesine karşın reagenler ve depolaması, iş gücü, test tekrarı, kalite kontrol maliyeti, çalışanların tecrübesi eğitim gereksinimi ile düşünülünce diğer yöntemlerle eş değer olduğu düşünülmektedir. Bazı kitlerle *Giardia* ile birlikte *Cryptosporidium* ve *E. histolytica* saptanması da mümkün olmakta, böylece kısa bir sürede birden fazla parazite ilişkin sonuç verilebilmektedir (15, 23).

Son yıllarda Ülkemizde de giardiyazis tanısında antijen tarama yöntemlerinden yararlanılmaya başlanmıştır. Ankara'da yapılan bir çalışmada DFA (CellLab-Crypto/Giardia CELL) yönteminin mikroskopik incelemeye üstünlüğü ortaya konmuştur. DFA pozitifliği olan 29 dışkının 23'ünün trikrom boyama, 22'sinin formol-eter çöktürme, 17'sinin nativ-lugol yöntemleri ile de *G.intestinalis* pozitif olduğu bulunmuştur. Dört örnekteki *Giardia* kistleri yalnızca DFA yöntemi ile saptanabilmiştir (57). Doğruman AI ve ark (19) nativ-lugol incelemede şüpheli *G.intestinalis* kist ve/veya trofozoitleri görülen 44 dışkıda trikrom boyamayla 37 (%84), monoklonal EIA ile 39 (%88,6) ve monoklonal DFA ile 35 (%79,5)'inde pozitiflik saptamışlardır. DFA yöntemi ile karşılaştırıldığında ELISA'nın duyarlılığı %88,6 ve özgüllüğü %88,8 olarak belirlenmiştir.

Diğer parazit enfeksiyonlarını saptayamaması ve göreceli olarak maliyetinin yüksek olması nedeniyle, antijen tarama yöntemlerinin uygulanmasıyla direkt bakı ve kalıcı boyama yöntemlerinden vazgeçilmesi söz konusu değildir. Ancak duyarlılık ve özgüllüklerinin çok yüksek olması nedeniyle klinik olarak şüpheli enfeksiyonlarda, tekrarlayan incelemelere rağmen *Giardia* saptanamaması ve/veya klinik tanının doğrulanmasında bu yöntemlerin tercih edilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

### III. KRİPTOSPORİDİYAZİS

Zorunlu hücre içi bir protozoa olan *Cryptosporidium* ile dünya nüfusunun %0,6-4,3 oranında enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Kriptosporidiyazisin uzun yıllar zoonoz olduğu kabul edilmiş, ancak daha sonra yapılan çalışmalarla bu enfeksiyonun gıdalar ve içme suları aracılığıyla insanlara bulaştığı belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda sağlıklı okul çocuklarında %5,5, riskli ve semptomatik hasta gruplarında %0,4-35,5 oranında saptanmaktadır. Diyare, karın ağrısı, bulantı, kusma ve kilo kaybı oluşturabilen kriptosporidiyazis bağışıklık sistemi bozulmuş kişilerde hayatı tehdit edebilen fırsatçı bir enfeksiyon etkenidir. İmmün sistemi normal olan bireylerde ise hastalık kendisini sınırlar ve kısa sürede sonlanır (42, 47).

#### Kriptosporidiyazis Tanısında Antijen Tarama Testlerinin Gerekliliği

*Cryptosporidium parvum* sulu ishallerin en önemli parazitler etkeni arasında sayılmaktadır (52). Gelişmekte olan ülkelerde kötü beslenme ve kötü hijyen şartları nedeniyle bu enfeksiyona daha sık rastlanmaktadır. Ülkemizde Mersin'de yapılan bir ça-

İşimada içme sularında *Cryptosporidium* saptanan bir okuldaki dört çocukta enfeksiyona rastlanırken, suları temiz olan okullardaki çocuklarda belirlenememiştir (13, 42).

Hastalık özellikle immun direnci bozuk olanlar için ölüme neden olabilen ishallerle yol açabilmektedir. Hastanelerde nozokomiyal enfeksiyona yol açabileceği gibi huzurevi, çocuk yuvası gibi kalabalık ortamlar da hastalığın bulaşması için risklidir. *Cryptosporidium*'a doğada vahşi ve evcil hayvanlar da konak olabildiklerinden enfeksiyon aynı zamanda zoonotik karakterli olup özellikle hayvancılıkla uğraşanlar için de sorun yaratmaktadır. Az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelere seyahat edenlerde de turist diyaresi olarak karşımıza çıkmaktadır. Kriptosporidiazisin etkili bir tedavisinin bulunmamış olması da bu enfeksiyona başka bir boyut kazanırmaktadır (8, 42, 47, 48).

Ookistler çevresel şartlara ve klorlamaya dirençli olup, nemli ortamda aylarca canlı kalabilirler. Bu nedenle su yoluyla büyük çapta salgın oluşturma riski taşımaktadırlar (8, 37, 48, 52). Mersin'de yapılan bir çalışmada *Cryptosporidium* içme sularında %11,36 ve atık sularda %21,0 oranında saptanmıştır (13).

Laboratuvarla mikroskopi ile *Cryptosporidium* spp. tanısı koymak oldukça tecrübe gerektiren bir işlemdir. Özellikle dışkıda az sayıda ookist olduğunda tanı koymak zordur. Örneklerin aside dirençli boyama ve/veya konsantrasyon yöntemleri sonrasında özel mikroskoplarla incelenmesi gerekmektedir. Konsantrasyon yöntemi zaman alıcıdır ve yoğun iş gücüne gereksinim duyan, boyama esnasında kullanılan maddelerin bazıları da oldukça toksik ve tehlikelidir (15, 48).

Bulaşıcı Hastalıkları Bildirim Sistemine göre tanı için geçerli laboratuvar testleri dışı, duodenal sıvı veya biyopsisinde asit fast boyama veya DFA/IFA yöntemi ile ookistlerinin gösterilmesi veya dışkıda immunodiagnostik yöntemlerle (DFA, ELISA) ile antijen varlığının saptanmasıdır. Bildirimi zorunlu olan bu hastalığın kesin tanısı, klinik bulgular yanında geçerli laboratuvar testlerinden en az birisiyle pozitif sonuç alınması halinde konulabilmektedir (52).

Günümüzde kriptosporidiazis tanısı için ticari ürünler (DFA, IFA, EIA ve hızlı testler) mevcuttur.

### **Kriptosporidiazis Tanısında Kullanılan Antijen Tarama Yöntemleri**

Antijen saptama yöntemlerinin hızlı sonuç verebildiği ve değerlendirmede deneyimli uzmana her zaman gereksinim duyulmadığı göz önünde bulundurulacak olursa bu yöntemler iş yükü yoğun laboratuvarlarda güvenle kullanılabilirler. *Cryptosporidium* spp.'nin dışkıda immunolojik olarak araştırılmasında kullanılan DFA, IFA, EIA ve dipstick ticari kitleri bulunmaktadır. *Cryptosporidium* spp.'nin yüzey antijenlerini saptayan DFA, modifiye asit-fast boyama tekniğine göre daha yüksek hassasiyet (%99) ve özgüllüğe (%100) sahip olması nedeniyle en tercih edilen referans yöntemdir (15). Bu yöntemde şüpheli materyal lam üzerine yayılarak fikse edilir ve FITC işaretli monoklonal antikorlar kullanılır. Flüoresans

mikroskop ile ookistlerin varlığının araştırıldığı bu yöntem hem konsantrasyon hem de konsantrasyon edilmiş dışkı örneklerine uygulanabilmektedir. (15, 44). *Cryptosporidium* ookistleri ve *Giardia* kistlerinin birlikte araştırıldığı DFA kitleri de piyasada mevcuttur.

*Cryptosporidium* antijenlerini saptama amacıyla kullanılan EIA kitleri taze, donmuş, formolde ya da SAF'da saklanmış dışkılara da uygulanabilmesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak bu yöntem konsantrasyon edilmiş ve PVA'da saklanmış dışkılara uygulanamamaktadır.

EIA tekniğinde dışkı örneği, örnek sulandırım sıvısı ile emulsifiye edilir. Sulandırılmış gaita örneği ve *Cryptosporidium* ookist antijenine spesifik monoklonal antikor içeren konjugat, mikropleytlere *Cryptosporidium* ookist antijenine bağlanan poliklonal antikorlar yapılandırılmış kuyucuklarına aktarılır. Şayet hasta örneğinde ookist varsa, inkübasyon sırasında kuyucuklardaki monoklonal antikorlara ve konjugatta bulunan ookist spesifik poliklonal antikorlara bağlanır. Oluşan spesifik olmayan bağlanmalar yıkama sırasında ortamdaki uzaklaştırılır. Substratın ilavesiyle, ookist varlığında oluşan enzim-antikor-antijen kompleksine bağlı renk oluşumu tespit edilir (15). 40-41 kDa'lık ookist duvarıyla reaktif antikorların *Cryptosporidium* antijenlerine güçlü olarak bağlandığı saptanmıştır (48). *Cryptosporidium* ELISA kitlerinin sensitivite ve spesifitesi %93 ile %100 arasında değişmektedir ve uygulayan laboratuvarların yalancı pozitif sonuçlar konusunda hassas olması gerekmektedir (15, 25).

EIA kitleri mikroskopiye (genellikle acid-fast boyama) karşı üstündür ve DFA testi ile iyi korelasyon gösterirler. Çok spesifik olan ELISA tekniği, asit fast boyamadan 20 kat daha fazla duyarlıdır. IFA, boyama yöntemine göre pahalı olmasına karşın, çapraz reaksiyon göstermemesi ve dışkının konsantrasyonuna gerek duyulmaması nedeniyle tercih nedenidir. ELISA yöntemi süre açısından (yaklaşık 135 dakika) uzun zaman alıyor gibi görünse de IFA yöntemine (yaklaşık 45 dakika) dışkının konsantrasyon süresi de eklendiğinde sürecin hemen hemen eş zamanlı olduğu söylenebilir (48).

Kriptosporidiazis'de immunokromatografik tanı testlerinin duyarlılığı %67,6-97,6 arasında değişmekle birlikte hızlı tanı sağlamaları nedeniyle kullanılmaktadır (24, 32). Formalin ile fikse edilmiş 246 gaita örneğinde DFA (The Merifluor) yöntemi altın standard olarak alındığında *Cryptosporidium* için EIA'nın (ProSpecT EZ, Alexon-Trend Inc, Minn.) duyarlılığı %70,3, özgüllüğü %99,5, hızlı tanı yönteminin (ImmunoCard STAT!, Meridian, Ohio) duyarlılığı %67,6, özgüllüğü %99,0 olarak bulunmuştur (32). Trikróm boyama ile doğrulanmış 171 gaita örneğinde katı faz kalitatif immunokromatografik tanı yönteminin (*C.parvum*'u ColorPAC (Becton-Dickinson) duyarlılığı %97,6, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır (24).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada; 18 immün direnci bozuk hastanın 11'inde modifiye asit-fast, IFA ve DFA yöntemleri ile *Cryptosporidium* spp. saptanmış, bunların 4 tanesine



yalnızca DFA ile tanı konulabilmiştir (8). Ankara'da *G.intestinalis* şüpheli 272 dışkı örneğinde DFA (CellLab-Crypto/Giardia CELL) testi uygulandığında 4'ünde (%1,5) *Cryptosporidium* spp. oookistleri bulunduğu saptanmıştır. Mikroskopik inceleme yöntemlerinde (nativ-lugol, formol-eter çöktürme, trikrom boyama) ise tespit edilmesi mümkün olmamıştır (57).

### KOMBİNE TESTLER

Bazı DFA yöntemleri yanısıra dipstick formatındaki hızlı tanı kitleri, *Cryptosporidium*, *Giardia* ve/veya *E. histolytica*'yı birlikte tanıyabilmektedir (15, 23).

*Cryptosporidium*/*Giardia* DFA yönteminin hem *Cryptosporidium* hem de *Giardia* için duyarlılığı (%100) ve özgüllüğü (%99,8-100) klasik bakı yöntemlerine göre oldukça yüksektir (27, 64). DFA ile 118 *Giardia*, 39 *Cryptosporidium* saptanırken, Kinyon asit fast boyama ile 79 ve 23 parazit bulunabilmiştir (5).

İmmüno-kromatografik tanı kitleri, teknik gereksinimlerinin az, hızlı ve göreceli olarak ucuz olması yanı sıra kolay değerlendirilebilmesi nedeniyle özellikle örnek kapasitesi düşük bazı laboratuvarlarda ve salgın şüphesinde tercih edilmektedir (15, 23). Su kaynaklı salgınlar için potansiyel risk oluşturdukları için *Giardia*/*Cryptosporidium* birlikte taranabildiği immüno-kromatografik yöntemler oldukça yaygındır.

Formalin ile fikse edilmiş 246 gaita örneğinde *Giardia*/*Cryptosporidium* DFA (The Merifluor) yönteminin altın standart olarak alındığı bir çalışmada hızlı tanı yönteminde (ImmunoCard STAT!, Meridian, Ohio) duyarlılık ve özgüllük *Giardia* için %81,3, %99,5 *Cryptosporidium* için ise %67,6, %99,0 olarak bulunmuştur (32). Bir diğer çalışmada da ImmunoCard STAT! Yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri *Giardia* için sırasıyla %93,5, %100, %100, %95,5; *Cryptosporidium* için sırasıyla %98,8, %100, %100, %95,7 olarak belirlenmiştir (26). Yöntemin ELISA ile uyumu da %98,8'dir (24).

Bazı hızlı tanı kitlerinde bu iki parazit yanı sıra *E.histolytica*/*E.dispar* da saptanabilmektedir. Bu testlerle alınan sonuçlar da oldukça başarılıdır. Garcia ve ark (25) altın standart olarak trikrom ve asit fast boyamanın kullanıldığı mikroskopi ile pozitif ve negatif olduklarını bildikleri 444 gaita örneğinde, kalitatif sonuç veren Triage parazit paneli (Biosite Diagnostics, Calif, USA) nin sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Duyarlılık ve özgüllük *E.histolytica*/*E.dispar* için %96,0 ve %99,1, *Giardia* için %95,9 ve %97,4, *Cryptosporidium* için %98,3 ve %99,7 olarak saptanmıştır.

Triage parazit panelinin (Biosite Diagnostics, Calif, USA) reagen fiyatı (19.44 USD/test), iş gücü de (1.75 USD/test) dahil olmak üzere 21.19 USD/teste mal olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyon ve kalıcı boyama yöntemlerini de kapsayan dışkı bakısı ise 13.75 USD'dir. Ancak rutin dışkı bakısının ideal olarak üç kez tekrarlanması halinde maliyet 41.75 USD'ye yükselmektedir. Mikroskopinin yanı sıra her bir parazit için ayrı ayrı antijen tarama testi uygulanması halinde

kombine test oldukça ekonomiktir. Testin dezavantajı az miktardaki antijenleri saptayamamasıdır. Sözgelimi ELISA ile >250/ml *E. histolytica*/*dispar* yakalanabilirken, triage test ile bu sayı 1000'in üzerine çıkmaktadır (50).

### SONUÇ

CDC tarafından *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp.'nin rutin tanısında DFA kiti, *Cryptosporidium* spp. için modifiye acid-fast boyası ve *Giardia* spp. için Wheatley's trichrome boyası şüpheli vakaların doğrulanması ve ayırıcı tanı için kullanılmaktadır (15).

*Giardia*/*Cryptosporidium* DFA ve Amip-EIA testleri 2003 yılından itibaren laboratuvarımızda referans yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bugüne kadar 1000'in üzerinde dışkı örneği karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve her iki yöntemin de hassasiyet ve özgüllüğünün klasik yöntemlere göre son derece yüksek olduğu belirlenmiştir (18, 34, 40, 56, 57). Ancak dışkıda antijen tarama yöntemlerinin, diğer parazit enfeksiyonlarını saptayamaması nedeniyle, direkt bakı ve kalıcı boyama yöntemlerinin yerini alması söz konusu değildir. Örneğin, laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada mikroskopik inceleme yöntemleri ile *Giardia*/*Cryptosporidium* DFA yönteminde etken saptanamayan 33 örnekte diğer parazitler tespit edilmiştir. DFA yöntemi ile *G.intestinalis* saptanan iki örnekte birinde *E. histolytica*, diğerinde ise *Chilomastix mesnili*'nin eşlik ettiği bulunmuştur (57). Ayrıca, bazı yöntemlerin değerlendirilmesinde flüoresan mikroskop, EIA okuma aleti gibi pahalı teçhizatlara gereksinim duyulması ve göreceli olarak maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Ancak duyarlılık ve özgüllüklerinin %100'e yakın olması, eğitimli personele ihtiyaç duyulmaması, uygulama kolaylığı, sonuçların tekrarlanabilirliği gibi avantajları bulunmaktadır. Bu nedenle klinik olarak şüpheli enfeksiyonlarda tekrarlayan incelemelere rağmen şüpheli etkenlerin saptanamaması ve/veya klinik tanının doğrulanmasında referans yöntem olarak kullanılmaları uygun olacağı düşünülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Ackers JP, 2002. The diagnostic implications of the separation of *E.histolytica* and *E.dispar*. *J Biosc*, (Supl. 3), 27: 573-578.
2. Ainsworth RG. 2002. *Giardia* in water supplies, A review of current knowledge, Foundation of water research, Technical Enquiries. FR/R0006, p.1-26.
3. Ak M, 1997. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (Ed. Özcel MA, Altuntaş N). *Parazit Hastalıklarında Tanı*. Türkiye Parazitoloji Derneği, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, s.241-259.
4. Ak M, Ozbilgin A, Yüceci T, Yolasiğmaz A, Taylan Özkan A, Ustün S, Dağcı H, Özensoy S, Atay M. 1994. The studies on serodiagnosis of giardiasis. VIII. ICOPA, İzmir, Türkiye, 10- 14 Oct. 1994. Abs. Vol:2, p.300.
5. Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS, Mattia AR. 1995. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 33(6): 1632-1634.

6. **Apan TZ, Taylan Özkan A, Dağışan Özlük Ü, Yıldırım A.** 2000. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı 1998 yılı parazit verilerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fak Derg*, 2(1): 15-19.
7. **Apan TZ, Taylan Özkan A, Özlük ÜD** 2000. 1998 yılında Kırıkkale Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda rastlanılan bağırsak parazitleri dağılımı. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 57(2): 59-64.
8. **Arıkan S, Ergüven S, Akyön Y, Günalp A.** 1999. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in a Turkish university hospital. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 46(1): 33-40.
9. **Aziz H, Beck CE, Lux MF, Hudson MJ.** 2001. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. *Clin Lab Sci*, 14(3): 150-154.
10. **Babür C, Kılıç S, Taylan Ozkan A, Esen B.** 2002. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Parazitoloji Laboratuvarında 1995-2000 yıllarında saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitol Derg*; 26(3): 286-291.
11. **Balıkcı E, Ak M, Özcel MA, Ozensoy S, Akyol U, Taylan Özkan A, Yolasığmaz A, Yucetin T, Ok Ü, Gül K, Mete O.** 1994. The serodiagnosis of extraintestinal Amoebiasis.; VIII. ICOPA, İzmir, Türkiye, 10- 14 Oct. 1994. Abs. Vol:2, p:285.
12. **Büyükbaba Ö, Babaoğlu G, Katrancı H, Uyar A, Kırköyün H, Büğet E.** 1997. Dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica* "Galactose -Inhibitible -Adherence Protein" (GIAP) antijeninin ELISA ile aranması ve sonuçların mikroskopik ile karşılaştırılması. *Klinik Derg*, 10 (2):57-59.
13. **Ceber K, Aslan G, Otağ F, Delialioğlu N, Oztürk C, Babür C, Emekdaş G** 2005. Investigation of *Cryptosporidium spp.* oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg*, 29(4): 224-228.
14. Centers for Disease Control and Prevention, 1991. Results of testing for intestinal parasites by state diagnostic laboratories: United States 1987. *Morb Mortal Wkly Rep*, 40: 25-47.
15. Centers for Disease Control and Prevention, 2004. Diagnostic Procedures for Stool Specimens: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>
16. **Çetin ET, Ang Ö, Töreci K,** 1995. *Tıbbi Parazitoloji*. 5. baskı, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, s: 80-85.
17. **Delialioğlu N, Aslan G, Sozen M, Babur C, Kanik A, Emekdas G.** 2004. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(7): 769-772
18. **Demirçeken FG, Taylan Özkan A, Tosun M, Özgür Ö, Yıldırım I.** 2005. Çocuklarda giyardiyaizis olguları ve tanısal yöntemlerin karşılaştırılması. *Türk Pediatri Arşivi*, 40 (ek): 123.
19. **Doğruman Al F, Kuştımur S, Özekinci T, Balaban N, İlhan MN,** 2006. The use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Direct Fluorescent Antibody (DFA) methods for diagnosis of *Giardia intestinalis*. *Türkiye Parazitol Derg*, 30: 275-278.
20. **Duque-Beltrán S, Nicholls-Orejuela RS, Arévalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James MA** 2002 . Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(8): 1165-1168.
21. **Federko DP, Williams EC, Nelson NA, Calhoun LB, Yan SS** 2000. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *G.lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. *J Clin Microbiol*, 38(7): 2781-2783.
22. **Garcia LS,** 2001. Diagnostic Medical Parasitology. Fourth Edition. ASM Press, Washington, USA. p.36-49.
23. **Garcia LS, Garcia JP,** 2006. Detection of *Giardia lamblia* antigens in human fecal specimens by a solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol*, 44: 4587-4588.
24. **Garcia LS, Shimizu RY,** 2000. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol*, 38:1267-1268.
25. **Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN,** 2000. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol*, 38: 3337-3340.
26. **Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F,** 2003. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol*, 41(1): 209-212.
27. **Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA,** 1992. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oo-cysts in human fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 30(12): 3255-3257.
28. **Gathiram V, Jackson TF,** 1987. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *South Afr Med J*, 72: 669-672.
29. **Grigoriev GA, Walmsley S, Law L, Chee SL, Yang J, Keystone J, Kraiden M** 1994. Evaluation of the Merifluor immunofluorescent assay for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sodium acetate formalin-fixed stools. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 19(2): 89-91.
30. **Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri JWA,** 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol*, 33: 2558-2561.
31. **Jackson TF, Ravdin JI,** 1996. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections. *Parasitol Today*, 12(10): 406-409.
32. **Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causser L, Wilkins PP,** 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 41: 623-626.
33. **Karanis P, Opiela K, Al-Arousi M, Seitz HM.** 1996. A comparison of phase contrast microscopy and an immunofluorescence test for the detection of *Giardia spp.* in faecal specimens from cattle and wild rodents. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(3): 250-251.
34. **Kılıç S, Babür C, Taylan Özkan A, Çelebi B, Esen B.** 2005. Intestinal amebiasis tanısında mikroskopik inceleme ve *E.histolytica* spesifik antijeni saptayan ELISA yönteminin karşılaştırılması. IV.Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu, Mersin. 16-20 Mayıs 2005. Özet Kitabı, s.342.

35. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC** 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1071-1171.
36. **Korkmaz M, Köse Ş, Sin A, Taylan Özkan A, Ok ÜZ** 2000. Giardiasisli hastalarda IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE düzeyleri. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 24(2): 101-105.
37. **Lucio-Forster A, Taylan Özkan A, Bowman DD** 2004. Continuous flow centrifugation and sucrose gradients for detecting cysts of *Giardia* and oocysts of *Cryptosporidium* in wastewater effluents. International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, Amsterdam, Netherlands. 20-24 Sept 2004. p.169.
38. **Maraha B, Buiting AGM** 2000. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19: 485-487.
39. **Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T** 1997. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *E. histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol*, 35: 2405-2407.
40. **Mungan M, Bayrak H, Danişmaz O, Taylan Özkan A, Kılıç S, Babür C, Demirçeken F, Esen B** 2005. Gastrointestinal şikayeti olan çocuklarda *Giardia/Cryptosporidium* DFA yönteminin yeri. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, 18-25 Eylül 2005. Özet kitabı, s.245.
41. **Nar S, Akbaş E, Esen B** 2003. Dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar*'ın araştırılmasında direkt mikroskopi ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırılması. *Flora* 8(3): 213-220.
42. **Otağ F, Aslan G, Emekdaş G, Aydın E, Taylan-Özkan A, Çeber K** 2007. Mersin İlinde ilkökul öğrencilerinde *Cryptosporidium spp.* ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 31: 17-19.
43. **Özcel MA, Üner A** 1997. Giardiasis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no: 14, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
44. **Özcel MA, Üner A, Ertuğ S** 1997. Immunofloresans Yöntemi. (Ed. Özcel MA, Altıntaş N). Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, s.215-39.
45. **Parija SC, Srinivasa H** 1999. Viewpoint: The neglect of stool microscopy for intestinal parasites and possible solutions. *Trop Med Int Health* 4(7): 522-524.
46. **Petri WA, Singh U** 1999. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis*; 29: 1117-1125.
47. **Redlinger T, Corella-Barud V, Graham J, Galindo A, Avitia R, Cardenas V** 2002. Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico Border. *Am J Med Trop Hyg*, 66: 794-798.
48. **Rosenblatt JE, Sloan LM** 1993. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *J Clin Microbiol*, 31: 1468-1471.
49. **Schunk M, Jelinek T, Wetzel K, Nothdurft HD** 2001. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two Enzyme Immunassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 20: 389-391.
50. **Sharp SE, Suarez CA, Duran Y, Popiti RJ** 2001. Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens. *J Clin Microbiol*, 39(1): 332-334.
51. **Stibbs HH** 1989. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. *J Clin Microbiol*, 27(11): 2582-2588.
52. T.C. Sağlık Bakanlığı 2004. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi.
53. **Tanyüksel M, Yılmaz H, Ulukanlıgil M, Araz E, Cicek Mutalip, Koru O, Tas Z, Petri WA** 2005. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol*, 110: 322-326.
54. **Tanyüksel M, Petri JWA** 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16: 713-729.
55. **Tanyüksel M, Ulukanlıgil M, Araz E, Ali İKM, Koru O, Herbein J, Clark CG, Petri WA** 2005. *Entamoeba histolytica* tanısında hızlı tanı yönteminin (Dipstick test) yeri ve genotiplendirmede yeni bir yöntemin tanımlanması. IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu, Mersin. 16-20 Mayıs 2005. Özet Kitabı, s.343.
56. **Taylan Özkan A** 2005. Rutin Dışkı Bakısına Alternatif: Antijen Tarama Yöntemleri. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, 18-25 Eylül 2005. Özet kitabı: s.58-60.
57. **Taylan Özkan A, Mungan M, Kılıç S, Babür C, Demirçeken F, Esen B** 2005. Giardiasis tanısında *Giardia/Cryptosporidium DFA* yönteminin kullanımı. IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu, Mersin. 16-20 Mayıs 2005. Özet. Kitabı, s.344.
58. **Tee GH, Moody AH, Cooke AH, Chiodini PL** 1993. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol*, 46(6): 555-558.
59. **Vidal AMB, Catapani WR** 2005. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med J*; 123: 282-285.
60. **WHO** 1997. World Health Organization report of a consultation experts on amoebiasis. *Weekly Epidemiol. Rep*, 72: 97-100.
61. **Winięcka-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(3): 218-222.
62. **Yau YCW, Crandall I, Kain KC** 2001. Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. *J Clin Microbiol*; 39: 716-719.
63. **Yıldız-Zeyrek F, Özbilge H, Yüksel MF, Zeyrek CD, Sırmatel F** 2006. Şanlıurfa'da parazit faunası ve ELISA yöntemi ile dışkıda *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* sıklığı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 30: 95-98.
64. **Zimmerman SK, Needham CA** 1995. 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*, 33(7): 1942-3.