

Bağırsak Parazitlerinin Tanısında Direkt Mikroskopik İncelemedeki Bireysel Farklılıkların Karşılaştırılması

Comparison of Individual Differences in the Direct Microscopic Examination in the Diagnosis of Intestinal Parasites

Nihal Doğan¹, Yasemin Öz², Nazmiye Ülkü Koçman², Ayşe Feyda Nursal³

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

³Eskişehir Devlet Hastanesi, Acil Kliniği, Eskişehir, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bağırsak parazitlerinin tanısında direkt mikroskopik incelemenin ve farklı mikroskopistlerden elde edilen sonuçlar arasındaki farklılığın önemini vurgulanması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Diyareli 225 çocuktan gaita örnekleri toplandı, makroskopik inceleme sonrası formalin-eter çöktürme yöntemiyle hazırlandı ve birbirinden bağımsız 3 farklı araştırmacı (parazitoloji uzmanı, mikrobiyoloji uzmanı ve ikinci yılını tamamlamış bir mikrobiyoloji araştırma görevlisi) tarafından mikroskopik incelemeye alındı. Ayrıca tüm örnekler modifiye Ehrlich Ziehl Neelsen yöntemiyle boyanarak *Cryptosporidium* sp. ve *Cyclospora* sp. açısından değerlendirildi.

Bulgular: Örneklerin 161'i her üç araştırmacı tarafından negatif olarak değerlendirildi. En az bir araştırmacı tarafından 64 (%28) örnekte parazit varlığı saptandı; 30 *Cryptosporidium parvum*, 16 *Blastocytis hominis*, 5 *Endolimax nana*, 4 *Giardia intestinalis*, 3 *Dientamoeba fragilis*, 3 *Ascaris lumbricoides*, 2 *Entamoeba histolytica/dispar*, 1 *Cyclospora cayetanensis*. Bunların 21'i (%33) için üç araştırmacı arasında uyum gözlenirken, lökosit ve/veya herhangi bir parazit varlığı açısından 64 örneğin 58'i (%91) için uyum saptandı. Etkenleri tür seviyesinde tanımlama açısından parazitoloji uzmanının sonuçlarında belirgin farklılıklar gözlemlendi.

Sonuç: Direkt mikroskopik inceleme ile değerlendiricinin deneyim ve eğitim düzeyine göre farklı sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle böyle testlerin yeterli eğitim ve tecrübeye sahip kişiler tarafından yapılması ve mümkünse farklı en az iki yöntemle kombine kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz. (*Türkiye Parazitol Derg* 2012; 36: 211-4)

Anahtar Sözcükler: Direkt mikroskopik inceleme, bireysel farklılık, deneyim, bağırsak parazitleri

Geliş Tarihi: 06.01.2012

Kabul Tarihi: 29.09.2012

ABSTRACT

Objective: The aim is to emphasise the importance for intestinal parasites' diagnosis by direct microscopic examination and the discrepancies among results from different microscopists.

Methods: Stool specimens were obtained from 225 children with diarrhoea after the macroscopic examination, prepared by formalin-ether sedimentation methods and included in microscopically examination by three different independent investigators (parasitologist, microbiologist, research assistant). Furthermore, specimens were stained with the modified Ehrlich Ziehl Neelsen method and evaluated for *Cryptosporidium* and *Cyclospora*.

Results: A total 161 specimens were evaluated as negative by all investigators. The number of specimens containing parasites detected by at least one investigator was 64; *Cryptosporidium parvum* 30, *Blastocytis hominis* 16, *Endolimax nana* 5, *Giardia intestinalis* 4, *Dientamoeba fragilis* 3, *Ascaris lumbricoides* 3, *Entamoeba histolytica/dispar* 2, *Cyclospora cayetanensis* 1. The concordance among investigators was observed for 21 (33%) specimens; when specimens were evaluated for the presence of leukocytes and/or parasites, concordance was detected for 58 (91%) of the 64 specimens. In particular, significant differences were observed for the species level identification.

Bu makalenin bir kısmı 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur; Eylül 2011, s 272, Kars, Türkiye.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Nihal Doğan, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye Tel: +90 222 239 29 79 Faks: +90 222 239 56 81 E-posta: ndogan@ogu.edu.tr
doi:10.5152/tpd.2012.51

Conclusion: Different results can be obtained by microscopic examination according to the experience and educational level of microscopists. Therefore, we think that these tests should be performed by persons who have sufficient education and experience, if possible, combined with at least two different methods. (*Türkiye Parazit Derg* 2012; 36: 211-4)

Key Words: Direct microscopic examination, individual differences, experience, intestinal parasites

Received: 06.01.2012

Accepted: 29.09.2012

GİRİŞ

Bağırsak parazitlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar gelişmekte olan ülkelerde hala önemli bir sağlık sorunudur ve bu enfeksiyonların uygun tedavisi ancak doğru ve zamanında tanı ile mümkün olabilir. Özellikle endemik olmayan bölgelerdeki parazit enfeksiyonların tanısı oldukça zordur. Enfeksiyonların nonspesifik seyri klinik tanı için genellikle yetersizdir, rutin laboratuvar testleri de nadiren yardımcı olabilir (1). Paraziter hastalıkların tanısı için tanımlanmış birçok testin duyarlılık ve özgüllükle ilgili sorunları bulunmaktadır. Bu nedenle en yaygın kullanılan tanı yöntemi hala direkt mikroskopik incelemedir.

Direkt mikroskopik inceleme yöntemi, hem kısa sürede sonuçlanması hem de uygulama kolaylığı nedeniyle hemen her parazitoloji laboratuvarında uygulanmaktadır. Bu yöntemle, protozoonların kist ve trofozoitlerinin tanımlanmasının yanı sıra, dışkıda bulunabilecek olan eritrosit ve lökosit varlığını da gözleme olanaklı olarak sağlar. Yumurta, trofozoit ya da kistlerin gaitada aralıkli olarak bulunması ya da sayının değişkenlik göstermesi nedeniyle, farklı günlerde alınmış üç ayrı örneğin değerlendirilmesi de direkt incelemenin başarısını artırmaktadır (2). Bununla birlikte şekilli dışkı örneklerinde parazitlerin trofozoit formlarının bulunması beklenmediğinden, konsantrasyon yöntemleri ile az sayıda bulunan protozoon kistleri ve helmint yumurtalarının yoğunlaştırılması tanımlama şansını arttırmaktadır (3).

Diğer klinik laboratuvarların aksine, klinik parazitoloji laboratuvarlarında bireysel değişiklikler ve kişisel değerlendirmeleri de içeren birçok manuel test kullanılmaktadır. Bu nedenle sonuçların doğruluğunun güvenilirliğini sağlamak için kullanılacak kalite kontrol sistemleri büyük önem taşımaktadır. Ancak böyle sistemleri oluşturmak son derece zor ve pahalı olabilir. Ayrıca test prosedürleri ve uygulayıcılar arasındaki farklılıklar nedeniyle bu tür sistemlerin değerlendirilmesinde de zorluklar yaşanmaktadır (4, 5). Modern tanı laboratuvarlarının tek sorunu bağırsak parazitlerinin rutin tanısında kullanılan yöntemin mikroskopik incelenmesi değil, aynı zamanda bu testin doğruluğunun da yeterince değerlendirilememesidir (6). Geleneksel tanı yöntemlerinde deneyimli personel ve zaman önemli bir faktördür. İyi bir değerlendirme için en az üç örneğe ihtiyaç duyulması, dışkılarının zaman geçirmeden incelenmesi ve mutlak kalıcı dışkı boyama yöntemleri uygulanmasının gerekliliği de test performansı açısından önemlidir. Örneğin mukuslu dışkıların trofozoitin hareketlerini engelleyebildiğinden trofozoit formları rahatlıkla gözden kaçabilmektedir (7-10).

Çalışmamızda; bağırsak parazitlerinin rutin tanısında direkt mikroskopik incelemenin ve bu incelemeyi yapan mikroskopistin yeterliliğinin önemine değinilmeye çalışılmıştır.

YÖNTEMLER

Çalışmada, orta-düşük sosyoekonomik gelir seviyesine sahip semtlerde yaşayan, Eskişehir Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları

Hastanesi acil servisine; ateş, kusma ve diyare şikayetleri ile başvuran, 0-18 yaş çocuklara ait gaita örnekleri toplanmıştır. Temiz kapaklı kaplarda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarına getirilen örnekler, öncelikle şekilli, şekilsiz, kan ve mukus varlığı yönünden makroskopik olarak değerlendirilmiştir. Tamamı sulu ve/veya mukuslu yapıya sahip olan dışkı örnekleri ılık serum fizyolojikle seyreltilerek direkt olarak incelemeye alındıktan sonra, tüm örnekler formalin-eter çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır (11). Çöküntüden temiz bir lam üzerinde hem lugollü hem de serum fizyolojikli preparatları hazırlandıktan sonra, önemli bir diyare etkeni olan *Cryptosporidium spp.* ve *Cyclospora spp.* varlığı açısından değerlendirmek amacıyla da, modifiye Ehrlich Ziehl Neelsen yöntemiyle boyalı preparatlar hazırlanmıştır. Örnekler bu yöntemle boyanmadan önce bir kez serum fizyolojikle yıkanarak formalinden arındırılmıştır (11). Tüm örnekler; bir parazitoloji uzmanı, bir mikrobiyoloji uzmanı ve ikinci yılını tamamlamış bir tıbbi mikrobiyoloji araştırma görevlisinden oluşan, birbirinden bağımsız (kör) 3 farklı araştırmacı tarafından mikroskopik incelemeye alınmıştır.

BULGULAR

Toplam 225 gaita örneği çalışmaya alınmıştır. Örneklerin hiçbirinde kan varlığı tanımlanmazken, 123 örnekte mukus varlığı saptanmıştır. Hem lugollü direkt bakıda, hem de ARB boyalı preparatların mikroskopik incelenmesinde örneklerin 161'i her üç araştırmacı tarafından parazit varlığı açısından negatif olarak değerlendirilmiştir. Gaita örneklerinin direkt mikroskopik incelenmesinde; 28 örnekte araştırmacıların en az biri tarafından lökosit varlığı rapor edilmiştir. Lökosit varlığını tanımlama açısından üç araştırmacı arasındaki benzerlik, %67 (19 örnek) olarak değerlendirilirken, her alanda en az 8-10 lökosit bulunan 21 örnek dikkate alındığında uyum oranı %90 (19 örnek) bulunmuştur. Parazit varlığını saptayabilme açısından, mikrobiyoloji uzmanı ve araştırma görevlisi tarafından rapor edilen sonuçlar birbiriyle benzerlik gösterirken, özellikle etkenleri tür bazında tanımlama ve helmint yumurtalarını tanıma açısından parazitoloji uzmanının sonuçlarında belirgin farklılıklar saptanmıştır (Tablo 1). Herhangi bir araştırmacı tarafından parazit saptanan 64 örnekte sadece 21'i (%33) için üç araştırmacı arasında uyum tespit edilirken, lökosit ve/veya herhangi bir parazit varlığı açısından değerlendirildiğinde, 64 örneğin 58'i (%91) uyumlu bulunmuştur. Araştırmacılardan en az biri tarafından parazit saptanan 64 örneğin 50'si ve lökosit saptanan örneklerin tümünde mukus varlığı tespit edilmiştir. *A. lumbricoides*, *E.nana*, *D. fragilis* ve *C.cayetanensis* tanısı sadece parazitoloji uzmanı tarafından konulmuştur (Tablo1).

TARTIŞMA

Tanısal klinik mikrobiyoloji esas olarak etken patojenin kültürle izolasyonuna dayanmakla birlikte, parazitler hastalıkların tanısı hemen her zaman onların klinik örnekteki morfolojik görünümle-

Tablo 1. Parazit varlığı açısından sonuçlar

Araştırmacılar	<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Entamoeba spp.</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Toplam
1	10	24	0	2	1	0	0	0	37
2	11	23	0	2	1	0	0	0	37
3	12	20	1	4	1	5	3	3	49
Toplam^a	16	30	1	4	2	5	3	3	64
Toplam^b	6	13	0	1	0	0	0	0	21

1: tıbbi mikrobiyoloji araştırma görevlisi, 2: tıbbi mikrobiyoloji uzmanı, 3: parazitoloji uzmanı

^a: en az bir araştırmacı tarafından pozitif bulunan örneklerin toplam sayısı

^b: araştırmacıların tümü tarafından pozitif bulunan örneklerin toplam sayısı

rine göre yapılabilmektedir. İnsanlarda bulunan bağırsak parazitlerinin tanısı temel olarak dışkı, daha seyrek olarak da duodenal sıvı ve biyopsi örneklerinde parazitin çeşitli formlarının saptanmasına dayanmakta ve kullanılan direkt veya boyalı dışkı mikroskopisinin birçok avantajı bulunmaktadır (7, 9, 11). Dışkıda parazit incelemesi, özellikle örnekler uygun 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 bakışının 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 (9, 10). Bağırsak parazitlerinin aralıklı atılması nedeniyle tek bir dışkı örneği ile tanı koymak her zaman mümkün olamamaktadır. En az üç dışkı örneğinin incelenmesiyle bile *Giardia intestinalis* için %11.3, *Entamoeba histolytica* için %22.7'lik bir tanı düzeyine erişilebileceği bildirilmiştir (10). Bu durum ise hastaların ve/veya örneklerinin üç kez laboratuvara ulaştırılmasını gerektirmektedir. Ayrıca son yıllarda giderek önem kazanan ve immün düşkün hastalarda ölümcül seyredebilen *Cryptosporidium* ve *Cyclospora* gibi etkenlerin laboratuvarda mikroskopi ile tanısını koymak tecrübe gerektiren bir işlemdir. Özellikle dışkıda az sayıda ookist bulunduğunda tanı koymak zordur. Rutin dışkı incelemelerinde *Cryptosporidium* sp. aranması önerilmemekle birlikte, diyareli hastalarda etkenin araştırılması pek çok araştırmacı tarafından tavsiye edilmektedir. Etkenin mikroskopik tanısında ARB boyalara gereksinim duyulmakta, bu yöntemle bile dışkıda bulunan bazı mayalar ve artefaktlar yanımlara neden olabilmektedir (7-9). Son yıllarda klasik dışkı bakışı önemli ölçüde ihmal edilmektedir. Parija ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında bu ihmali üç önemli nedene bağlamışlardır. Bunlar; dışkının hazırlanması sırasında teknisyenin motivasyon eksikliği, eğitiminin yetersizliği ve dışkı hazırlamadaki zorluklar ile uzmanların yeterince eğitilememesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bazı klinisyenlerin dışkı mikroskopisi sonuçlarına önem vermemesi de bu konunun diğer bir boyutudur (9). Son yıllarda bağırsak parazitlerinin tanısında; Enzim İmmun Assay (EIA, ELISA), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gibi mikroskopiye ihti-

yaç duyulmayan yöntemlerin kullanımının artması da dışkı mikroskopisinin ihmaline yol açan sebepler arasındadır (7-10).

Tanı amacıyla birden fazla yöntemin kullanılmasının sonuçların güvenilirliğini arttırdığı bilinmektedir, ancak intestinal sistemin paraziter enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak tek başına kullanılan yöntem, klinik örneğin direkt mikroskopik incelenmesidir. Bununla birlikte deneyimli bir mikrobiyolog bile ideal şartlarda toplanıp hazırlanmış dışkı örneklerinde trofozoid ya da kistlerin tanımlanmasında zorluklar yaşayabilmektedir. Biz de şimdiki çalışmamızda mikroskopik incelemenin sübjektifliğini ve tanıda birden fazla yöntemin gerekliliğini vurgulamaya çalıştık. Mikroskopik inceleme ile parazitlerin varlığını saptayabilme ve özellikle de helmintleri tanıma ve tanımlayabilme açısından üç araştırmacı arasında önemli farklılıklar saptanmıştır. Burada ilimizde helmint enfeksiyonlarına oldukça az rastlanmasının da önemi büyüktür. Bununla birlikte normal mikroskopik bulguların gözlenmediği örneklerin saptanması açısından araştırmacıların birbiriyle uyumu oldukça iyi bulunmuştur. Sonuç olarak her üç araştırmacı da normal mikroskopik özelliklere sahip olmayan örnekleri büyük oranda tespit edebilmiş olmakla birlikte, örnekteki gerçek sorunu tanımlayabilme konusunda belirgin farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Gaitanın mikroskopik incelenmesi ile elde edilen sonuçların kullanılan yöntemle, örneğin kıvamına, kan ve mukus içerip içermediğine, laboratuvar çalışanlarının niteliklerine göre farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (2, 4, 6). Gerçekten bağırsak parazitlerinin doğru tanı ve tedavisinde, gaita örneklerinin doğru şekilde toplanması, uygun şekilde ve sürede taşınması, saklanması, örneklerin yeterli miktarda olması gibi laboratuvar öncesi uygulamaların yanı sıra, laboratuvara ulaşan örneklerin doğru yöntemlerle işleme alınması, deneyimli uzmanlar tarafından değerlendirilmesi ve doğru şekilde raporlanması da son derece önemlidir (8, 9).

Çalışmamız, aynı yöntemlerle muamele edilmiş gaita örneklerinin 3 farklı eğitim ve deneyim düzeyine sahip araştırmacı tarafından değerlendirilmesi ile ortaya çıkabilecek raporlama farklılıklarını göstermesi bakımından önemlidir. Bu çalışma en az 2 yıl klinik mikrobiyoloji eğitimi almış tıbbi mikrobiyoloji araştırmacı tarafından ve günlük en az 15 gaita mikroskopisi potansiyeline sahip bir parazitoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde bu potansiyele ve/veya eğitim düzeyine sahip olmayan laboratuvarlarda da "gaitanın mikroskopik incelenmesi" hizmetinin verildiği ve bu laboratuvarların sonuçlarına göre hastalık tanısı ve tedavilerinin yapıldığı unutulmamalıdır.

SONUÇ

Direkt mikroskopik inceleme sübjektif bir yöntemdir ve tek başına kullanıldığında değerlendiricinin deneyim ve eğitim düzeyine göre farklı sonuçlar gözlenebilmektedir. Bu nedenle böyle testlerin yeterli eğitim ve tecrübeye sahip kişiler tarafından yapılması, mümkünse diğer yöntemlerle kombine kullanılması ve farklı günlerde alınmış 3 farklı örneğin değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editors. Laboratory Diagnosis of Parasitic Diseases. In: Medical Microbiology. Sixth Edition. Mosby, Philadelphia; 2009.p.803-12.
2. Baima B, Sticterling M. Demodicidosis revisited. Acta DermVenereol 2002; 82: 3-6. [CrossRef]
3. Lacey N, Raghallaigh SN, Powell FC. Demodex mites-commensals, parasites, or mutualistic organism?. Dermatology 2011;222:128-31. [CrossRef]
4. Lacey N, Raghallaigh SN, Powell FC. Demodex mites-commensals, parasites, or mutualistic organism?. Dermatology 2011;222:128-31. [CrossRef]
5. van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG. Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 284-90.
6. Libman MD, Gyorkos TW, Kokoskin E, Maclean JD. Detection of pathogenic protozoa in the diagnostic laboratory: result reproducibility, specimen pooling, and competency assessment. J Clin Microbiol 2008; 46: 2200-5. [CrossRef]
7. Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. Fourth Edition. ASM Press, Washington, USA; 2001.p.6-105.
8. Kappus KK, Juranek DD, Roberts JM. Results of testing for intestinal parasites by state diagnostic laboratories, United States, 1987. MMWR CDC Surveill Summ 1991; 40: 25-45.
9. Forton F, Germaux MA, Brasseur T. Demodicosis and rosacea:epidemiology and significance in daily dermatologic practice. J Am Acad Dermatol 2005; 52: 74-87. [CrossRef]
10. Vidal AMB, Catapani WR. Enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. Sao Paulo Med J 2005; 123: 282-5. [CrossRef]
11. Ok ÜZ, Yereli K. Parazitoloji laboratuvarlarında sık kullanılan dışkı inceleme yöntemlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloj Derg 1996; 20: 285-92.