

## Gaita Örneklerinde *Entamoeba Histolytica* ile *Entamoeba Dispar* Ayrımında PCR ve ELISA Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

Eda OKAYGÜN KURT<sup>1</sup>, Özer AKGÜL<sup>2</sup>, Filiz AKYÜZ<sup>3</sup>, Yaşar Ali ÖNER<sup>2</sup>

### Öz

**Amaç:** Amibik infeksiyonlar, barsakta kolonizasyonun yanı sıra, karaciğer, akciğer ve beyin gibi konak dokularda da invazyon ve hasara neden olabilen ciddi parazitlerdir. Rutinde amebiyaz tanısı, dışkının mikroskopik incelemesinde *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) kist ve trofozoitlerinin görülmesiyle konulmaktadır. Ancak *E. histolytica*'ya benzer morfolojide olup non-patojen olan *Entamoeba* türlerinin de olduğu anlaşılmış, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve son yıllarda Polimerase Chain Reaction (PCR) tanıda kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, *E. histolytica* ve *E. dispar* ayrımını yapmak için multipleks PCR yöntemi kullanılmış ve sonuçlar ELISA ile mikroskopi verileri ile kıyaslanmıştır.

**Gereç ve yöntem:** Çalışmaya kronik inflamatuvar barsak hastalığı olan ve mikroskopisinde *Entamoeba* kistleri görülen toplamda 83 hastanın dışkı örneği dahil edilmiştir. Örneklerdeki *Entamoeba* türlerinin varlığı mikroskopi ile değerlendirilmiş ve tür ayrımında ELISA ve PCR yöntemleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen 83 hastanın 48 tanesi (% 58) *E. histolytica* açısından PCR ile pozitif olarak bulunmuştur. PCR ile pozitif olarak bulunan 48 örneğin 40 tanesinde (% 48) *E. histolytica* II antijeni ELISA ile pozitif olarak belirlenmiştir.

**Sonuç:** Mikroskopik tanı yöntemi ile *E. histolytica*'nın diğer *Entamoeba* türleri ile kolaylıkla karışabileceği bilinmektedir. ELISA ile kıyaslandığında *Entamoeba* DNA'sını saptayan PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, ELISA, PCR

<sup>1</sup>Darica Farabi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

<sup>2</sup>İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Yazışma Adresi: Dr. Özer AKGÜL, İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Küçükçekmece/İstanbul, Türkiye.

Tel: 0532 565 99 44, e-posta: ozerakgul@aydin.edu.tr <https://orcid.org/0000-0002-3802-3270>

Geliş Tarihi: 12 Ağustos 2019 Kabul Tarihi: 15 Ekim 2019

## Evaluation of PCR and ELISA Methods in *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar* in Stool Samples

### Abstract

**Objective:** Amebic infections are serious parasitic diseases that can cause invasion and damage to host tissues such as liver, lung and brain as well as colonization in the intestine. Routine amebiasis diagnosis is made by the presence of *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) cysts and trophozoites in microscopic examination of faeces. However, *Entamoeba* species, which are similar to *E. histolytica*, have non-pathogenic morphology. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) have been used for diagnosis in recent years. In this study, multiplex PCR method was used to differentiate *E. histolytica* and *E. dispar* and the results were compared with microscopy data by ELISA.

**Materials and methods:** Fecal specimens of 83 patients with chronic inflammatory bowel disease and *Entamoeba* cysts on microscopy were included in the study. The presence of *Entamoeba* species in the samples was evaluated by microscopy and ELISA and PCR methods were applied according to the recommendations of the manufacturer.

**Results:** 48 (58%) of 83 patients included in the study were positive for *E. histolytica* by PCR. *E. histolytica* II antigen was found to be positive by ELISA in 48 (48%) of 48 samples that were positive by PCR.

**Conclusion:** It is known that *E. histolytica* can be easily mixed with other *Entamoeba* species by microscopic diagnosis. Compared to ELISA, sensitivity and specificity of the PCR method which detected *Entamoeba* DNA was found to be higher.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, ELISA, PCR

### Giriş

Amipler, özgür olarak yaşayan birkaç tür dışında, genelde çeşitli canlılarda sığıntı veya parazit olarak yaşayan geniş bir grubu oluşturmaktadır. Bu grup elemanları arasında *Entamoeba* genusundan; *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki*, *E. gingivalis* türleri ve *Endolimax nana* ve *Iodamoeba butschlii* gibi insanda yerleşebilmesi açısından tıbbi önemi olan türler bulunmaktadır. *Entamoeba*, *Endolimax* ve *Iodamoeba* türleri morfolojik olarak farklı nükleus yapıları ile birbirlerinden ayırt edilebilen üç türdür. *Entamoeba* cinsi küçük nükleusu, ortada veya ortaya yakın karyozomu ve nükleusun iç yüzünde yer alan periferik kromatin tanecikleri ile karakterizedir. *Endolimax* cinsinde nükleus içindeki karyozom büyük ve düzensiz olup periferik kromatin tanecikleri bulunmamaktadır. *Iodamoeba* cinsinde ise büyük merkezi, akromatik ve koyu boyanmayan taneli bir tabaka ile çevrili karyozomlu nükleus karakteristiktir (1). *E. histolytica* 'nın başlıca konağı insandır. Ana geçiş yolu kronik olarak enfekte insandır. Parazitin kistik formlarıyla enfekte dışkı, su ve yiyecekleri

kontamine edebilir. Diğer bir geçiş yolu ise oral-anal seksüel ilişkidir (2). Zoonotik geçişle ilgili iddialar olmasına rağmen kesinlik kazanmamıştır (3). *E. histolytica* ile köpekler, kediler, ratlar, maymunlar ve diğer deney hayvanları ile deneysel enfeksiyonlar oluşturulmuştur. İnfekte kistlerin yayılımında hamam böcekleri ve sivrisineklerin nadiren rol oynadığı bildirilmiştir (2). Mikroskopik olarak *E. histolytica* içindeki sindirilmiş eritrositleri görmek, bu amip için hala tanısal olarak kabul görmektedir. Bu görüntü *E. histolytica* ve *E. dispar* ayırımını yapmak için kullanılabilir. Ama genellikle kronik amebik enfeksiyonda eritrofagositoz görülmez. Trofozoitler sıklıkla kanlı ve mukuslu dışkıda gözlenmektedirler. Lam-lamel arası direkt mikroskopi preparatlarında trofozoit nükleusu kolay görülememektedir. Dejenere olmuş eozinofil kalıntıları olan Charcot-Leyden kristalleri ve kümelenmiş eritrositler görülür. Taze hazırlanmış preparatlarda hareketli görülebilir. Dışkı hemen incelenmeyecekse polivinil alkol gibi bir fiksatif kullanılmalı veya +4°C'de saklanmalıdır. Trofozoitler bu koşullarda 4 saat sonra bile hareketli görülebilirken, fikse

edilmeden bekletilmiş dışkı örneklerinde hızla parçalanırlar (4). Kültür mikroskopiden daha az duyarlılığı olan bir yöntemdir. Bakterilerin aksine protozoon kültürü tanı laboratuvarları için hem zor hem de uzun zaman alan işlemler gerektirmektedir. Sonuç olarak, Entamoeba kültürü tanıdan çok araştırma için kullanılabilir bir yöntemdir (5). *E. dispar* da xenik kültürlerde *E. histolytica* kadar kolay ürerken, monoksenik kültürlerde zayıf üreme gösterir. Bu durum iki amipin ayırımında kültürün faydasız olduğunu göstermektedir. Amip kültürünün bir başka sorunu da özellikle *Blastocystis hominis* gibi istenmeyen parazitlerin üremesi ve bu üremelerin *E. histolytica*'yı gölgelemesidir. Unutulmamalıdır ki, kültürde üremenin olmaması *E. histolytica* infeksiyonunu ekarte ettirmez (5). Patojen ve nonpatojen formları birbirlerinden ayırmak için amibik kültür lizatlarından izoenzim analizi yapılması yaygın kullanılmış bir yöntemdir. Yirmibiri insan *E. histolytica* ve *E. dispar* izolatlarından, 3'ü deneysel amebik kültür izolatlarından elde edilen 24 farklı zimodem tanımlanmıştır. Bu zimodemler malik enzim, heksokinaz, glikoz fosfat izomeraz ve fosfoglikomutaz enzimlerinin elektroforetik paternlerini içerirler. Zimodem analizi, *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırımını, farklı genetik özellikler gösteren heksokinazlara sahip olmaları özelliğine dayanarak yapar (6). Zaman alıcı ve uygulanması zor bir yöntem olmasına rağmen, biyokimyasal özellikler kullanılarak farklı zimodemlerin tanımlanması, endemik bölgelerde epidemiyolojik durumu ortaya koymak açısından faydalıdır (6).

Ribozomal *E. histolytica*'nın spesifik yüzey proteinlerine dayalı immunoblot ve ELISA yöntemleri, extraluminal amibiyozişte kullanılan hızlı latex aglütinasyon testleri ve *E. histolytica*'nın serumda Gal/GalNAc lektin antijenini tesbit eden serolojik testler ve PCR yöntemleri mevcuttur. *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın dışkı örneklerinde sadece mikroskopiye dayanarak ayırımının yapılması mümkün değildir. *E. histolytica* kolit ve karaciğer absesine neden olur, ama *E. dispar* böyle bir klinik oluşturmaz. Ayrıca *E. moshkovskii*'nin de insanlarda kolonize olabildiği ve görünüş olarak *E. histolytica*

ve *E. dispar*'a benzediği unutulmamalıdır (7). *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırımının yapılabilmesi için birçok moleküler yöntem bulunmaktadır. Amebik antijen ve DNA saptayan enzyme immunoassay (EIA) ve PCR kullanılabilir. *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırt edilmesi ve *E. histolytica*'nın erken teşhisi ve tedavisiyle toplumu tehdit eden büyük bir sağlık problemini engellemek mümkündür (7). Hastaların % 90'ında *E. histolytica*'nın asemptomatik kolonizasyonu vardır. *E. histolytica*'nın invaziv infeksiyon yapmasına neden olan faktörler henüz yeterince anlaşılamamıştır. Sistein proteaz, Gal/GalNAc-inhibitör lektin ve amebopor gibi pek çok olası virülans faktörleri vardır (4). Doku invazyonunu *E. histolytica*'nın kollajenaz ve nötral proteaz gibi proteolitik enzimleri ve sistein proteazlarının kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Amibin yüzeyinde nöraminidaz ve  $\beta$ -glikozaminidaz da içeren karmaşık bir enzim topluluğu bulunduğu bilinmektedir (6). *E. histolytica*'nın virülansı ile elektron-yoğun granülleri arasında bir korelasyon vardır. *E. histolytica* patogenezi için gerekli olan komponentler kalsiyum bağlayan protein ve kalmodulin bağımlıdır (4). İnfeksiyon dört nükleuslu *E. histolytica* kistlerinin oral-fekal yolla alınması ile başlar. Ekskiste dönem geçtikten sonra trofozoitler kalın barsakta kolonize olurlar. *E. histolytica* trofozoitleri parazitin Gal/GalNAc-inhibitör lektini ile konağın buna yüksek afinitesi olan glikoproteinlerinin bağlanması sayesinde barsak epiteline yapışır. Gal/GalNAc-binding lektin hedef hücreye yapışmayı, kompleman direncini ve sitotoksiteyi sağlar. Lektine karşı oluşmuş monoklonal antikorlar hem in vitro tutunma, hem de sitotoksiteyi azaltır. Gal/GalNAc lektin, disülfid bağlarıyla bağlanmış ağır (170 kDa) ve hafif (31-35 kDa) alt üniteleri ve nonkovalent olarak bağlanmış bir ara alt ünitesi (150 kDa) olan 260 kDa ağırlığında bir heterodimerdir. Ağır, orta ve hafif alt üniteler farklı genler tarafından kodlanırlar. *E. histolytica* ve *E. dispar* farklı yapıda olan ve farklı fonksiyonları olan Gal/GalNAc lektinlere sahiptirler. *E. dispar*'ın lektini daha sınırlı yapışma, bağlanma ve temas bağımlı sitotoksite kapasitesine sahiptir. İki ağır ve dört hafif alt ünitesi vardır (4). Yapılan son çalışmalar, sadece

Gal/GalNAc lectin değil, lipofosfopeptidoglikan ve serin-treonin-izolösinden zengin proteinin de adhezyon ve sitotoksiteden sorumlu olduğunu göstermektedir (8). Amebiyazın laboratuvar tanısı mikroskopik yöntemler ve ELISA, indirekt hemaglutinasyon (IHA) ve lateks aglutinasyon gibi serolojik yöntemlere dayanmaktadır. Son 10 yılda moleküler biyolojik tanı yöntemlerinin hızlı bir şekilde gelişmesi sonucu, kesin tanı sadece dizanteriyi önlemek için değil, gelişmekte olan ülkelerdeki kötü sanitasyon şartlarından kaynaklanan yaygın asemptomatik kist taşıyıcılığına da engel olabilmek açısından çok önemlidir (2). *E. histolytica* tanısı yakın zamana kadar sadece protozoon morfolojisinin direkt mikroskopik incelenmesine dayanıyordu. Fakat daha sonra benzer morfolojik yapılar arasında tür ayrımı yapmanın olanaksız olduğu anlaşılmıştır. Konvansiyonel mikroskopik yöntemlerle tek bir dışkı örneğinde amipi saptamak ve tür ayrımı yapmak duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça düşük bir çalışmadır. İntestinal amip infeksiyonu için endemik bölgelerdeki birçok insan *E. histolytica*'ya defalarca maruz kalır. Vakaların çoğunda semptom görülmez. Eski ve yeni infeksiyon farkını ortaya koyamayan antikor tayini kesin tanı için yetersizdir.

Bu çalışmada, *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın saptanması ve tür ayrımında PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak *E. histolytica* ve *E. dispar* ayrımı yapılarak gereksiz antibiyotik kullanımını sınırlamak ve bu gereksiz tedavinin komplikasyonlarının engellenmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Proje İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından T-775/27122005 numarası ile desteklenmiştir. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Polikliniği'nden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen ve dizanteri tablosu olduğu bilinen hastalara ait dışkı örneklerinin, yapılan mikroskopisinde *Entamoeba kisti* görülen 83 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklerde, *E. histolytica* ve *E. dispar* ayrımını sağlamak amacıyla ELISA ve PCR yöntemleri çalışılmıştır.

### Mikroskopi

2.4 mL %10 tamponlanmış formol içeren düz tüp içine, 0.6 mL eter ve 1-1.5 g taze dışkı konulmuştur. Dışkı örneği eküvyon çubuğu ile süspanse edilmiş ve ağız sıkıca kapatılarak vortekslenmiştir. Önce süzgeç ve santrifuj tüpü, süzgeç aparatı düz tüpün içine girecek şekilde monte edilmiştir. Bu kapalı sistem çökelti kısmı üstte kalacak şekilde ters çevrilip, 1000xg, 2 dakika santrifuj edilerek süzölmüştür. Santrifuj sonrası en alttaki çökelti tabakasından 2 lam üzerine bir miktar çökelti aktarılmıştır. Bir tanesi üzerine lam kapatılıp incelemeye alınırken, diğer örnek-lugol damlatılıp boyama yapıldıktan sonra incelenmiştir.

### ELISA

*E. histolytica* II, bir monoklonal ELISA testidir ve adhezine karşı oluşturulmuş antikorları kullanır. Kuyucuklar *E. histolytica/dispar* adhezine bağlanan poliklonal antikorlarla kaplanmıştır. Konjuge, *E. histolytica* adhezini için spesifik bir monoklonal antikor-peroksidaz konjügedir. Eğer örnekte *E. histolytica* adhezini varsa inkübasyon periyodu sırasında konjugeye ve poliklonal antikora bağlanır. Bağlanmamış materyal yıkama basamakları sırasında uzaklaştırılır. Substrat eklendiğinde enzim-antikor-antijen kompleksi oluşmuşsa renklenme olur. Şekilli dışkının 0.15-0.20 g'ı, sulu dışkının 400 µL'si 400 µL diluentle vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Her bir kuyucuk bir hasta için, birer kuyucuk da negatif ve pozitif kontroller için kullanılmıştır. Her kuyucuğa bir damla (50 µL) konjuge eklenmiştir. Pozitif kontrolden 50 µL, negatif kontrolden 100 µL ve diluentle karıştırılmış dışkı örneklerinden 200'er µL konjuge damlatılmış kuyucuklara eklenmiştir. Plağın üstü plastik bir kapakla kapatılıp 2 saat oda ısısında bekletilmiştir. % 5 oranında sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandıktan sonra 100 µL substrat eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 50 µL stop solüsyonu eklenince mavi rengin sarıya döndüğü görülmüş, spektrofotometrede 450-620 nm optik dansitede (O.D.) okunmuştur. Pozitif kontrolün 0,500 O.D.'den büyük ve negatif kontrolün 0.150 O.D.'den düşük absorbans vermesi gerekliliği göz önünde bulundurulmuştur. 0.050'den düşük

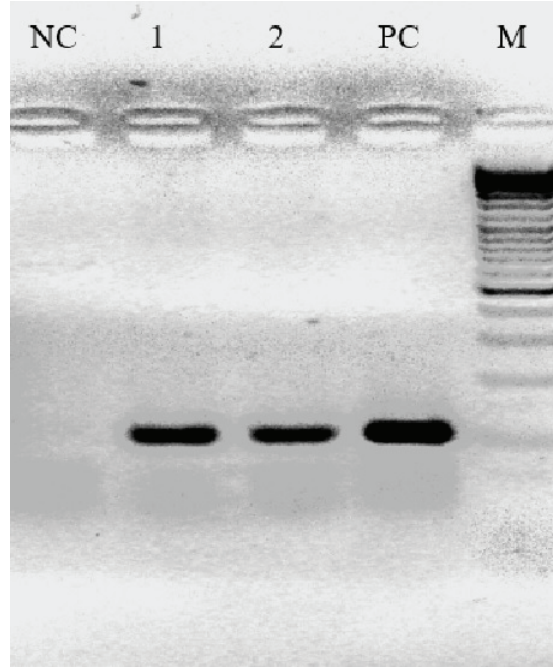
O.D.'deki örnekler negatif, 0.050'den büyük O.D.'deki örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

### PCR

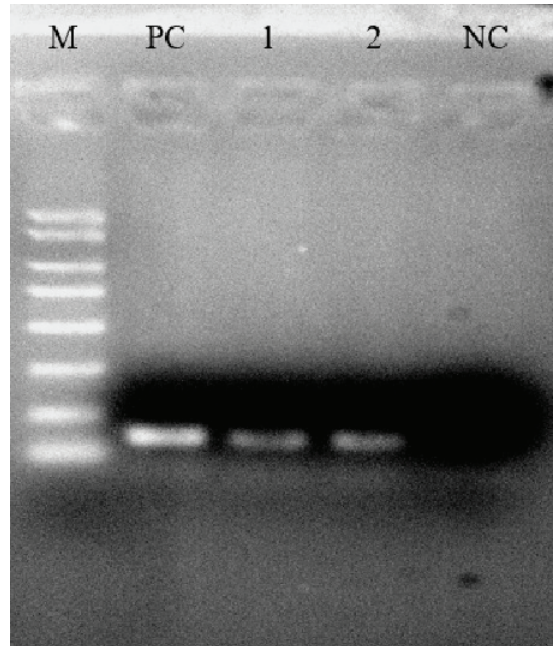
DNA ekstraksiyon kiti (QIAamp, Qiagen, CA) yardımıyla, DNA dışkı mini kiti protokolü kullanarak, referans suşlardan ve hasta örneklerinden, parazit DNA'sı saptanmış ve elde edilen ürünlerin türe özgü primerler kullanılarak Multipleks PCR yöntemi ile tür düzeyinde tanısı yapılmıştır. Türe özgü PCR protokolünde, *E. histolytica* ve *E. dispar* için (EhP1:5'-CGATTTTCCCAGTTAGAAATTA-3', EhP2:5'CAAATGGTCGTCGTCTAGGC-3') (EdP1:5'-ATGGTGAGGTTGTAGCAGAG3, EdP2: 5'-CGATATTGGATACCTAGTACT-3') özgü genleri tanımlamak için, elde edilen DNA örnekleri 10xBuffer (Biolab, 10xDyNAzyme II Hotstart Reaction Buffer), dNTP, Taq DNA polimeraz (Biolab, DyNAzyme II Hotstart DNA polimeraz) ve primerler karıştırılarak toplam hacim 50 µL oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir. PCR döngüsü üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler için % 4'lük agaroz jel hazırlanıp, soğumadan önce 5 mg/mL'lik etidyum bromür eklenmiş PCR ürünlerinden 5 µL alınıp 2 µL yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Jel üzerindeki kuyucuklara konan bu karışım, 1xTBE tamponu bulunan elektroforezde 100 volt altında 45 dakika yürütülmüş, DNA bantları UV altında incelenip, görüntülenmiştir.

### Bulgular

Çalışmaya, mikroskopisinde Entamoeba kisti görülmüş, dizanteri tanısı olan toplamda 83 hastaya ait dışkı örneği dahil edilmiştir. Dışkılarda, PCR yöntemiyle *E. histolytica* (EhP1 ve EhP2) ve *E. dispar*'a (EdP1 ve EdP2) spesifik primerler kullanılarak parazit DNA'sı aranmıştır. 48 örnek, *E. histolytica* (118 bp) açısından, 30 örnek *E. dispar* (151 bp) açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. 5 örnek, her iki türe ait primerlerle de negatif olarak tanımlanmıştır (Şekil 1-2). PCR ile *E. histolytica* açısından pozitif olarak tanımlanan dışkı örneklerinde, Techlab *E. histolytica* II ELISA kitiyle, adhezin aranmış, 40 örnekte *E. histolytica* antijeni pozitif olarak bulunmuştur.



Şekil 1. *E. histolytica* bant sonuçları. (M: Moleküler standart – 100 bp, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, 1 ve 2: Hasta örnekleri)



Şekil 2. *E. dispar* bant sonuçları. (M: Moleküler standart - 100 bp, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, 1 ve 2: Hasta örnekleri)

## Tartışma

*E. histolytica* tüm dünyada oldukça yaygın ve her yıl 100.000'den fazla ölüme yol açan önemli bir parazittir. Başlangıçta sadece mikroskopiye dayalı tanı yöntemleriyle tanımlanmış ama zamanla patojen tanındıkça mikroskopik olarak aynı görünümde olan türlerin de tanısının yapılması önem kazanmıştır. Patojen olan form, asemptomatik taşıyıcılarda bile tedavi edilirken, patojen olmayan form tedaviye ihtiyaç duymamaktadır. Son yıllarda mikroskopinin yanı sıra antijen saptama yöntemleri ve PCR gibi *E. histolytica* ve *E. dispar* ayırımı yapabilen yöntemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. PCR yöntemi, özgüllük ve duyarlılığının oldukça yüksek olması sebebiyle son yıllarda antijen saptayan ELISA kitleri kadar yaygınlaşmıştır. Rosmaria ve ark. Meksika'da PCR yöntemiyle semptomatik çocuk hastalardan aldıkları mikroskopisi pozitif 120 dışkı örneğinin 13 tanesinde *E. histolytica*, sadece bir tanesinde *E. dispar*'a rastlamışlardır (9). Lebbad ve ark. (10) İsveç'te 207 hastaya ait 228 dışkıyı mikroskopi ve PCR ile incelemişlerdir. Mikroskopisi pozitif 161 örneğin 151'i PCR ile *E. dispar* olarak bulunurken, yalnızca 10 tanesinin *E. histolytica* olduğu görülmüştür. Mikroskopisi negatif 46 örneğin ise 14 tanesinin *E. dispar* olduğu PCR ile ispatlanmıştır. Çalışma Kanada ve Hollanda gibi gelişmiş ülkelerin sonuçlarıyla kıyaslanmış ve pozitif hasta oranının az olması endemik olmayan ülkeler olmalarıyla bağdaştırılmıştır. Ayrıca hastaların tamamının sanitasyon koşullarının kötü olduğu bölgelere seyahat öyküsü olduğu da belirtilmiş, hastalıktan korunmada sanitasyonun önemi vurgulanmıştır. Negatif örnek sayısının çok olmasının bir başka nedeni olarak da hemen hemen her hastadan tek dışkı örneği alınmış olması gösterilmiştir. *E. histolytica/dispar* kistlerinin intermitant atılımının yalancı negatif sonuçlara sebep olabileceği birden fazla örnek alınan hastalarda örneklerin yalnızca birinin pozitifliğiyle ispatlanmıştır.

Calderaro ve ark. (11), 108 hastaya ait 166 örneği *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın görülme sıklığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, sonuçları sırasıyla % 5.6 ila % 8.3 olarak bulmuşlardır.

Araştırmacılar mikroskopi, kültür ve seroloji ile tanısı konmuş hastalarda PCR testiyle doğrulama yapmak gerektiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada kullanılan real-time PCR yöntemi ise tanı amaçlı kullanılabilir daha pratik bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Nohynkova ve ark. (12), Çek Cumhuriyeti'nde yılda toplam 40-50 *E. histolytica/dispar* infeksiyonu bildirildiğini belirtmişler ve *E. histolytica/E. dispar* oranını belirlemek amacıyla multipleks nested PCR kullandıkları 68 hastalık bir çalışma yapmışlardır. Bu hastalardan 65 tanesi (% 95.6) *E. dispar* olarak belirlenmiş, yalnızca 3 tanesi (% 4.4) *E. histolytica* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, araştırmacılar Çek Cumhuriyeti'nde *E. histolytica* oranının çok düşük olduğu ve *E. histolytica/E. dispar* infeksiyonlu hastaların tanısında PCR kullanılarak tür ayırımı yapılması gerekliliğini belirtmişlerdir.

*E. histolytica/E. dispar* ayırımı yapmak için PCR ve antijen saptama deneylerini kıyaslamak amacıyla da çalışmalar yapılmıştır. Gonin ve ark. (13) 95 dışkı örneğini mikroskopta incelemişler, *E. histolytica* II test kiti ile antijen aramışlar ve PCR uygulamışlardır. 51 hastada ELISA, mikroskopi ve PCR sonuçları pozitif çıkarken, 9 hastada PCR ve mikroskopi, 4 hastada sadece PCR pozitif çıkmıştır. Bu çalışmanın sonucu *E. histolytica - E. dispar* ayırımı yapmada ELISA'nın duyarlılığının düşük olduğu şeklinde yorumlanmış, PCR kullanılması önerilmiştir. Ülkemizde Kurt ve ark. (14) 2047 hastadan aldıkları dışkı örneklerinin 59 tanesinin (% 2.9) mikroskopi veya kültür incelemesini *E. histolytica/E. dispar* açısından pozitif olarak bulmuşlardır. Pozitif örneklerin 14 tanesi (% 23.7) PCR ile, 5 tanesi (% 8.5) antijen spesifik ELISA ile pozitif olarak bulunmuştur. *E. dispar* PCR ile 31 hastada (% 52.5), ELISA ile 52 hastada (% 88.1) pozitif olarak bulunmuştur. Dağcı ve ark. (15) 7 dışkı örneğini *E. dispar/E. histolytica* primerleri kullanarak PCR yöntemiyle incelediklerinde, örneklerin tamamının *E. dispar* olduğunu göstermişlerdir. Mengeloğlu ve ark. (16) Kasım 2006 ile Eylül 2007 tarihleri arasında direkt mikroskopi ile incelenen 1720 dışkı örneğinin 44'ünde (% 0.37) amip kistleri görmüş olup, kist

görülen örneklerde ELISA ile *E. histolytica* spesifik antijen araştırmışlardır. Örneklerin 26'sında (% 59.1) spesifik antijen varlığı saptanmıştır. Amebiyaz şüphesi olan hastalarda tanıyı doğrulamak için, direkt mikroskopi duyarlılığının düşük olmasından dolayı, ELISA metodunun uygulanmasının hastaya verilecek tedavinin belirlenmesi veya hastanın gereksiz tedavi almasının önlenmesi açısından uygun olduğunu belirtmişlerdir. ELISA yöntemi ile dışkıda antijen aranması, mikroskopiye göre daha duyarlı bulunmuş, ELISA ile antijen arama yönteminin rutin laboratuvarlarda mikroskopi yerine kullanılması önerilmiştir. Araştırmamızda, Gastroenteroloji Polikliniği'nde takip edilen, kronik inflamatuvar barsak hastalığı bulunanlar çalışma grubuna alınmış ve bu araştırmalar bir adım ileriye götürülerek mikroskopi, ELISA ve PCR yöntemlerinin kıyaslandığı en kapsamlı çalışma olmuştur.

Çalışmamızda, mikroskopi ile pozitif olarak yorumlanan, kronik inflamatuvar barsak hastalığı olan 83 hastanın dışkı örneklerinden 48 tanesinin (% 51.8) PCR yöntemi ile pozitif olarak bulunması mikroskopik tanı yönteminde *E. histolytica*'nın diğer Entamoebalarla kolaylıkla karıştırılabileceğini göstermektedir. Hem *E. histolytica*, hem de *E. dispar* açısından negatif olarak bulunan 5 örnek, *E. moshkovskii*'ye spesifik primerler kullanılarak tekrar değerlendirilmelidir. PCR yöntemiyle *E. histolytica* açısından pozitif olarak bulunan 48 örneğin 40'ının (% 83.3) *E. histolytica* II antijen saptama testi ile pozitif olarak bulunması, bu testlerin duyarlılıklarının PCR'a göre daha düşük olduğunu göstermektedir. Dışkının direkt mikroskopisi ile patojen ve nonpatojen Entamoeba türlerini ayırmak mümkün olmamaktadır. PCR, *E. histolytica* tanısı için, hızlı bir yöntem olması açısından kültürden ve duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması açısından ise mikroskopi ve antijen saptama deneylerinden daha güvenilirdir. Gereksiz antibiyotik kullanımının engellenmesi ve bunların doğuracağı yan etkilerden mümkün olduğu kadar kaçınılması için, PCR gibi özgüllüğü yüksek bir yöntemle tür tayininin yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Topçu AW., Söyletir G, Doğanay M. Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları. Topçu AW, Güner S, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 4. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. 1901-1908.
2. Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. *Infect Genet Evol* 2019;75:104018
3. Robertson LJ, Clark CG, Debenham JJ, Dubey JP, Kvač M, Li J et al. Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife? *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2019;9:323-341.
4. Ravdin JI. *Entamoeba histolytica* (amebiasis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 5<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone, Inc., Philadelphia, Pa. 2000. 2798-2810.
5. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:329-341.
6. Tanyüksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(4):713-729.
7. Soares NM, Azevedo HC, Pacheco FTF, De Souza JN, Del-Rei RP, Teixeira MCA et al. A Cross-Sectional Study of *Entamoeba histolytica*/*dispar*/*moshkovskii* Complex in Salvador, Bahia, Brazil. *Biomed Res Int* 2019;1-7.
8. Lejeune M, Rybicka JM, Chadee K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* 2009;4(1):105-118.
9. Rosmaria B. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Differentiation by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. *Parasitol Latinoam* 2006;61:37-42.

10. Lebbad M, Svard SG. PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. *Scand J Infect Dis* 2005;37(9):680-685.
11. Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100(5):450-457.
12. Nohinková E, Pysová I, Tùmová P, Tolarová V. Pathogenic *Entamoeba histolytica*-a rare incidence in persons microscopically positive for cysts in faeces. *Cas Lek Cesk* 2007;146(2):132-136.
13. Gonin P, Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):237-241.
14. Kurt O, Demirel M, Östan I, Sevil NR, Mandıracıoğlu A, Tanyüksel M, Ak M, Dağcı H. Investigation of the prevalence of amoebiasis in Izmir province and determination of *Entamoeba* spp. using PCR and enzyme immunoassay. *New Microbiol* 2008;31(3):393-400.
15. Dağcı H, Erdoğan DD, Toz SO, Kurt O, Üstün S, Akarca U. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR: A preliminary study in Izmir, Turkey. *New Microbiol* 2007;30(1):45-48.
16. Mengeođlu FZ, Aktaş E, Külah C, Cömert FB. Dışkı örneklerinde ELISA yöntemi ile *Entamoeba histolytica*'nın saptanması. *Türk Parazitoloji Derg* 2009;33(1):1-3.