

Bir yıllık sürede dışkı örneklerinde ELISA ile *Entamoeba histolytica* araştırılması

Investigation of Entamoeba histolytica in stool specimens by ELISA during a year

Tuba Dal¹, Mehmet Sinan Dal²

¹Bismil Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır, Türkiye

²Çınar İlçe Entegre Hastanesi, Diyarbakır, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmadaki amacımız; mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen dışkı örneklerinde ELISA yöntemi ile *Entamoeba histolytica* varlığının araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: Çalışmamıza; Ocak 2009 - Aralık 2009 tarihleri arasında Bismil Devlet Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, farklı yaş gruplarındaki hastalara ait 800 dışkı örneği dahil edilmiştir.

Bulgular: Nativ-lugol yöntemi ile incelenen 800 dışkı örneğinin 31'inde (% 3.9) *Entamoeba histolytica*/dispar kist ve/veya trofozoitleri görülmüştür. Örneklerin tamamında ELISA yöntemi ile *Entamoeba histolytica* spesifik antijeni araştırılmıştır. Sadece 12 (% 1.5) dışkı örneğinde *Entamoeba histolytica* spesifik antijeninin varlığı tespit edilmiştir. *Entamoeba histolytica* spesifik antijeni saptanan olgulara uygun tedavi başlanmıştır.

Sonuç: *Entamoeba histolytica* varlığı araştırılarak hastaların gereksiz tedavi almalarının önlenmelidir. *Klin Deney Ar Derg* 2011; 2(1): 50-54

Anahtar kelimeler: *Entamoeba histolytica*, spesifik antijen, kist, trofozoit, ELISA, amebiyazis.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate *Entamoeba histolytica* in the stool samples that have been sent to microbiology laboratory by ELISA method.

Materials and methods: This study was performed on 800 stool specimens belonging to different age groups and different patients sent to Microbiology Laboratory of a State Hospital between January 2009 and December 2009.

Results: In this study *Entamoeba histolytica*/dispar cysts and/or trophozoites were observed in 31 (3.9%) out of a total of 800 stool specimens which were examined by native-lugol. *Entamoeba histolytica* specific antigen was investigated by ELISA in all stool specimens. *Entamoeba histolytica* specific antigen was detected in 12 (1.5%) of these stool specimens. The diagnosis of amoebiasis for the patients whose ELISA tests were "positive" and appropriate therapy was begun.

Conclusion: *Entamoeba histolytica* in the stool samples should be investigated and unnecessary treatments should not given to patients. *J Clin Exp Invest* 2011; 2(1): 50-54

Key words: *Entamoeba histolytica*/dispar, specific antigen, cyst, trophozoite, ELISA, amoebiasis.

Yazışma Adresi / Correspondence: Dr. Tuba Dal,

Bismil Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır/Türkiye E-mail: tuba_dal@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 10.12.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 29.12.2010

Copyright © Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi 2011, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

Amebiyazis, *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu, bağırsak ve bağırsak dışı olmak üzere iki farklı klinik tablo halinde seyreden paraziter bir hastalıktır. Bu hastalık, ülkemiz gibi gelişmekte olan diğer ülkelerde de halen önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmakta, tanısı ve ayırıcı tanısında oldukça büyük zorluklar yaşanmaktadır.^{1,2}

E. histolytica insan kalın bağırsağındaki mucoza kriptalarında bazen non-patojen olarak bulunabilmekte, bakteri ve gıda artıkları ile beslenmekte, bazen ise patojen olarak bağırsakta ve dokularında enfestasyon oluşturabilmektedir.^{1,2}

Enfestasyonun prevalansı kültürel alışkanlıklara, kişisel ve toplumsal sanitasyona, kalabalık ortamda yaşamaya ve sosyoekonomik koşullara bağlı olarak değişmektedir. Bu oran kalabalık ve alt yapısı yetersiz yerleşim yerlerinde özellikle tropikal bölgelerde çok yüksek olup, kişisel ve toplumsal sanitasyon düzeyi ile orantılı olarak yayılım göstermektedir. Epidemiyolojik faktörler arasında; yaş, cinsiyet, ırk, iklim, yaşam koşulları, ekonomik düzey ve beslenme bulunmaktadır.^{1,2,3}

Dünyada her yıl yaklaşık olarak 500 milyon kişinin *E. histolytica* ile enfekte olduğu, bu kişilerden 40-50 milyonunun bu mikroorganizmaya bağlı kolit ve karaciğer absesine yakalandığı, 40-110 bin kişinin de bu hastalıktan öldüğü tahmin edilmektedir. Ülkemizde bağırsak parazitleri dağılımında *E. histolytica* insidansı % 0.3-17.4 olarak tespit edilmekle birlikte bu oran bazı bölgelerimizde % 70'in üzerine çıkmaktadır.¹⁻⁷

E. histolytica'ya mikroskopik özellikleri açısından çok benzeyen ama patojen olmayan bir diğer amip türü de *Entamoeba dispar*'dır. *E. dispar*, insanlarda tespit edilen *Entamoeba* türlerinin yaklaşık % 90'ını oluşturmaktadır. *E. histolytica* ve *E. dispar* kist ve/veya trofozoitlerini dışkının nativ-lugol incelemesi ile ayırt etmek çok zordur.⁸ Birbirine karıştırılan bu iki *Entamoeba* türünün ayırımında farklı metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Trichrom boyama bu ayırımında yarar sağlamasına

rağmen, çalışan kişinin bu konuda deneyimli olması gerekmektedir. Oysa amebiyazis tanısında dışkı örneklerinde antijen saptamaya yönelik ELISA testleri hali hazırda güven duyulan ve deneyim gerektirmeyen, kolaylıkla uygulanabilen yöntemlerdir. ELISA testlerinin çoğunda *E. histolytica*'nın önemli bir virülans faktörü olan 260 kDa'lık lektine karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar kullanılır. *E. histolytica* kolon epitelyum hücrelerine adezyonu Gal/GalNAc lektin aracılığı ile olmaktadır. Değişik ülkelerdeki amebiyazisli olgulardan elde edilen klinik izolatlarla yapılan çalışmalarda, lektinin ağır altbirimindeki Carbohydrate Recognition Domain (CRD) diye isimlendirilen bölgesinde mutasyon görülmemesi, hem tanı hem de aşı amaçlı araştırmalarda hedef olmasını sağlamıştır.⁹⁻¹¹ Günümüzde ise *E. histolytica*'nın değişik antijenlerine spesifik ELISA testleri kullanılmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız ticari ELISA kiti (Seramun Diagnostica GmbH, Wolzig, Almanya), poliklonal peptid antikorların serinden zengin 30 kDa'lık bir membran proteini olan SREHP'yi tanıma prensibine dayanan bir testtir. Bu testin duyarlılık ve özgüllük oranları % 95'in üzerindedir.^{11,12}

Amebiyazis tanısında son yıllarda giderek önem kazanan diğer yöntemler ise moleküler temele dayalı yöntemlerdir. Bu yöntemler hem klinik örneklerden genetik materyalin saptanmasına hem de *E. histolytica*'nın genotiplendirilmesine (RFLP, RAPD ve DNA mikroarray) olanak sağlamakla birlikte oldukça pahalı yöntemlerdir.^{1,2}

Bu çalışma ile bir ilçe devlet hastanemizde, *E. histolytica*'ya spesifik ELISA yöntemini kullanarak nativ-lugol yöntemi ile *E. histolytica*/*dispar* kist ve/veya trofozoitleri görülen dışkı örneklerinde *E. histolytica* ve *E. dispar* ayırımını yaparak hastalara gereksiz ilaç verilmesinin önlenmesini amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2009 ile Aralık 2010 tarihleri arasındaki 12 aylık sürede Bismil Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen dışkı örnekleri makroskopik olarak şekilli-şekilsiz ayırımı yapılmaksızın incelenmiştir. Bu süre boyunca toplam 1000 dışkı örneği laboratuvara gelmesine rağmen aynı hastalara ait tekrarlayan örnekler çıkarılarak geriye kalan 800 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Dışkı örneklerinde ilk inceleme nativ-lugol yöntemi ile yapılmıştır. Nativ-lugol yöntemi ile yapılan incelemede *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri görülen dışkı örneklerinde ticari ELISA kiti (Seramun Diagnostica GmbH, Wolzig, Almanya) ile *E. histolytica* spesifik anti-jeni araştırılmıştır. ELISA testi firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

BULGULAR

Nativ-lugol yöntemi ile yapılan incelemede 800 dışkı örneğinin 31'inde (% 3.9) *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri görüldü. Ayrıca dışkı örneklerinin tamamında ticari ELISA testi çalışılmış olup *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri görülen 31 dışkı örneğinin 12'sinde (% 1.5) *E. histolytica* spesifik anti-jeni saptandı. ELISA pozitif bulunan dışkı örnekleri Mart-Eylül ayları arasındaki dönemde dağılım gösterdi. Buna göre Mart, Nisan, Mayıs ve Eylül aylarında birer, Haziran ve Ağustos aylarında ikişer ve Temmuz ayında dört örnekte pozitif saptandı. Cinsiyet ile ELISA pozitifliği arasında istatistiksel olarak herhangi bir ilişki saptanmadı (Tablo 1). Amebiyazisli 12 hastanın 11'i ishal şikayetiyle hastanemize başvurdu ve dışkı örneklerinden sadece biri şekilli dışkıydı (Tablo 1).

Tablo 1. *E. histolytica*'ya spesifik ELISA pozitifliğinin yaş, cinsiyet ve semptomlara göre dağılımı.

ELISA pozitif örnek no	Yaş	Cinsiyet	Semptomlar	Dışkı makroskopisi
1	8	K	Karın ağrısı	Şekilli
2	16	E	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
3	5	K	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
4	56	K	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
5	67	E	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
6	32	K	İshal	Şekilsiz
7	45	E	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
8	9	E	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
9	21	E	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
10	12	K	İshal	Şekilsiz
11	61	E	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz
12	6	K	İshal, karın ağrısı	Şekilsiz

TARTIŞMA

E. histolytica'nın neden olduğu, bağırsak ve bağırsak dışı tutulum gösteren paraziter bir hastalık olan amebiyazisin prevalansı kültürel alışkanlıklara, kişisel ve toplumsal sanitoryona, kalabalık ortamda yaşamaya ve sosyoekonomik koşullara bağlı olarak değişmektedir. Bu oran kalabalık ve alt yapısı yetersiz yerleşim yerlerinde, özellikle tropikal bölge-

lerde çok yüksek olup, kişisel ve toplumsal sanitoryon düzeyi ile orantılı olarak yayılım göstermektedir. Epidemiyolojik faktörler arasında; yaş, cinsiyet, ırk, iklim, yaşam koşulları, ekonomik düzey ve beslenme bulunmaktadır. *E. histolytica* ile enfekte olanların % 90'ında ya asemptomatik intestinal amebiyazis ya da non-dizanterik ishal gelişmektedir. Akut intestinal amebiyazisde kanlı

dışkılama, karında kramp tarzında ağrı ve tenezm görülebilmektedir.^{1,2,3}

Çalışmamızda, *E. histolytica*'ya spesifik ELISA pozitifliklerinin tamamı yaz aylarında saptanmıştır. *E. histolytica* spesifik antijeni pozitif olan dışkı örneklerinden sadece 1'i şekilli dışkı örneğidir. ELISA pozitifliğinin cinsiyetle bir ilişkisi saptanmamakla birlikte yaşa göre dağılımı incelendiğinde hastaların yarısının 18 yaşından küçük olduğu, 2'sinin 60 yaşından büyük olduğu belirlenmiştir.

Dışkının taze (fresh) preparat hazırlanarak nativ-lugol yöntemi ile incelenmesi birçok klinik tanı laboratuvarında kullanılan yaygın bir yöntemdir. Ancak bu yöntemde lökositlerin, makrofajların, polenlerin ve özellikle patojen olmayan *E. dispar* kist ve/veya trofozoitlerinin *E. histolytica* kist ve/veya trofozoitlerinden ayırt edilmesinde büyük zorluklar yaşanmaktadır.^{4,6} Nativ-lugol preparatı ile mikroskopik inceleme yönteminin, yüksek özgüllüğe, düşük duyarlılığa, yüksek pozitif prediktif değere ve düşük negatif prediktif değere sahip olduğu belirtilmiş olup, duyarlılığının % 10-60 arasında değişebildiği bildirilmiştir.^{4,7} Yapılan çalışmalarda, amebiyazisin hızlı ve kesin tanısı için serolojik metotların rutin olarak kullanılabilirdiği ve özellikle dışkıda spesifik antijen arama yöntemlerinin duyarlılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Spesifik antijen saptayan ELISA testleri; *E. histolytica* ve *E. dispar*'ı ayırt edebilmesi, duyarlılık ile özgüllüklerinin yüksek olması ve sonuçların objektif olarak değerlendirilebilmesi gibi avantajlarından dolayı tercih edilen testlerdir.^{4,8}

Çalışmamızda nativ-lugol yöntemi ile yapılan mikroskopik incelemede *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri görülen 31 (% 3.9) dışkı örneğinin 12'sinde (% 1.5) ticari ELISA testi ile *E. histolytica* spesifik antijeni pozitif olarak saptanmıştır. ELISA metodunun yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle çalışmamızda ELISA testi pozitif olarak tespit edilen dışkı örneklerini aldığımız

kişiler amebiyazis hastası olarak kabul edilmiştir. Dışkı örneğinde nativ-lugol yöntemi ile *E. histolytica* kist ve/veya trofozoit yapısı görülmesine rağmen spesifik ELISA sonucu negatif tespit edilen kişiler için amebiyazis tanısı büyük oranda ekarte edilmiş ve bu kişilerin "gereksiz" tedavileri önlenmiştir.

Zeyrek ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada nativ-lugol yöntemi ile *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri görülen 87 dışkı örneğinin; trichrom boyama ile 23'ünde (% 26.4) *E. histolytica* saptanırken spesifik ELISA pozitifliğinin 19 (% 21.8) olduğu bildirilmiştir.¹³ Renondo ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, *E. histolytica* lektin proteinine spesifik ELISA kullanılmış olup, mikroskopik olarak *E. histolytica* kistlerinin mevcut olduğu düşünülen dışkı örneklerinin % 12'sinde *E. histolytica* lektin proteini pozitif olarak saptanmıştır.¹⁴ Ülkemizde, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Hastanesi'nde 2009 yılında yapılan benzer bir çalışmada ise bu oran % 59.1 olarak bulunmuştur.¹⁵ Delialioğlu ve ark. tarafından 2008 yılında, Tuncay ve ark. tarafından 2007 yılında yapılan çalışmalarda da *E. histolytica* spesifik ELISA pozitifliği sırasıyla; % 54.5 ve % 72.4 olarak tespit edilmiştir.^{4,6}

Nativ-lugol yönteminde *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri görülen dışkı örneklerinde *E. histolytica*'ya spesifik ELISA pozitifliği oranları bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Ancak, nativ-lugol yöntemi ile yapılan direkt mikroskopik incelemenin yanlış pozitif sonuçlara neden olduğu da açıktır. Bu nedenle, *E. histolytica* tanısında ELISA gibi duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek diğer yöntemlerden mutlaka faydalanılmalıdır.

Daha ileri yöntem ve tetkiklerle yapılacak çalışmaların ışığında ülkemiz ve gelişmekte olan diğer ülkeler için büyük bir sorun teşkil eden bu paraziter hastalığın uygun tedavisinin yapılmasının ancak doğru bir ayırıcı tanıyla mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Fırat P, Geçit İ, Depecik F, Karadan M, Karcı E, Karaman Ü, Turan A. Bir Devlet hastanesi çalışanlarında bağırsak parazitlerinin görülme sıklığı. *Dicle Tıp Derg* 2010;37:267-271.
2. Ak M, Tanyüksel M, Dağcı H. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri 2007;280-307.
3. Haque R, Petri WA Jr. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch Med Res* 2006;37:273-276.
4. Delialioğlu N, Aslan G, Oztürk C, Ozturhan H, Sen S, Emekdas G. Detection of Entamoeba histolytica antigen in stool samples in Mersin, Turkey. *J Parasitol* 2008;94:530-532.
5. Doğruman AF, Kuştimur S, Balaban N, Özekinci T, İlhan M. Entamoeba histolytica/dispar tanısında adezin antijeninin ELISA yöntemiyle araştırılması. 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi 2005.
6. Tuncay S, İnceboz T, Över L, et al. Dışkıda Entamoeba histolytica'nın Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Birlikte Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazit Derg* 2007;31:188-93.
7. Taylan Özkan A. Rutin Dışkı Bakısına Alternatif: Antijen Tarama Yöntemleri. 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi 2005.
8. Tanyüksel M, Petri WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2005;16:713-729.
9. Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T. Evaluation of recombinant fragments of Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 2004;42:1069-1074.
10. Beck DL, Tanyüksel M, Mackey AJ, et al. Entamoeba histolytica: Sequence conservation of the GalNAc lectin from clinical isolates. *Exp Parasitol* 2002;101:157-163.
11. Haque R, Kress K, Wood S, et al. Diagnosis of pathogenic Entamoeba histolytica infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J Infect Dis* 1993;167:247-249.
12. Haque R, Neville LM, Hah P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of Entamoeba infection by using Entamoeba and Entamoeba histolytica stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 1995;33:2558-2561.
13. Yıldız Zeyrek F, Özbilge H, Yüksel FM, Zeyrek CD, Sırmatel F. Şanlıurfa'da parazit faunası ve ELISA yöntemi ile dışkıda Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar sıklığı. *Türkiye Parazit Derg* 2006;33:1-3.
14. Redondo RB, Mendez L G M, Baer G. 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.
15. Mengeloğlu FZ, Aktaş E, Külah C, Cömert FB. Dışkı örneklerinde ELISA yöntemi ile Entamoeba histolytica'nın saptanması. *Türkiye Parazit Derg* 2009;30:95-98.