



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İSHALLİ HASTALARDA *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* ‘NIN
SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sema TORTOP

Antalya, 2016



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İSHALLİ HASTALARDA *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* ‘NIN
SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sema TORTOP

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Gözde ÖNGÜT

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir ”

Antalya, 2016

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından TTU-2015-1141 Proje No ile desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan, bana yardımcı olan tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof.Dr. Gözde ÖNGÜT 'e, tezimde istatistik bilgilerinin oluşturulmasında katkıları olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Levent DÖNMEZ'e, eğitimim süresince öğrenimime katkıda bulunan Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma,

Eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında birlikte olduğum Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

Sevgileri ve destekleri ile her zaman yanımda olan aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vi
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Sınıflandırma	3
2.3. Morfolojisi	3
2.3.1. Trofozoit şekli	3
2.3.2. Prekist şekli	4
2.3.3. Kist şekli	4
2.3.4. Metakist şekli	5
2.4. Yaşam siklusu	5
2.5. Patogeneze	7
2.6. Epidemiyoloji	8
2.7. Klinik	9
2.6.1. Aseptomatik kolonizasyon	10
2.6.2. İntestinal amibiyaz	10
2.6.3. Ekstrainestinal amibiyaz	11
2.8. Laboratuvar tanısı	11
2.8.1. Dışkı mikroskopisi	12
2.8.2. Kültür ve Izoenzim analizi	18
2.8.3. Antikor saptama yöntemleri	19
2.8.4. Antijen saptama yöntemleri	19
2.8.5. Moleküler tanı yöntemleri	20
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Çalışma sahası	21

3.2. Etik kurul onayı	21
3.3. Direkt ve Kalıcı Boyalı Mikroskopik İnceleme	21
3.4. Dışkıda <i>E. histolytica</i> adezin antijeni saptamaya yönelik ELISA testi	23
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
4.BULGULAR	26
5.TARTIŞMA	31
6.SONUÇLAR	37
7.ÖZET	39
8.ABSTRACT	40
9. KAYNAKLAR	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKA	Amibik karaciğer apsesi
BT	Bilgisayarlı tomografi
CF	Kompleman fiksasyon testi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Gal/GalNAc lektin	Galactose/N-acetylgalactosamine-inhibitable lectin
HIV	Human immunodeficiency virus
IFA	İndirekt floresan antikor testi
IHA	İndirekt Hemaglutinasyon Testi
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
OD	Optik dansite
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PZR	Gerçek zamanlı (real-time) PZR
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: <i>E. histolytica</i> 'nın yaşam döngüsü	7
Şekil 2: Trikrom boyama yöntemi ile boyanmış <i>E.histolytica/dispar</i> kist ve trofozoiti	14
Şekil 3: Test akış ve sonuç şeması	30



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Yaygın intestinal yerleşimli <i>Entamoeba</i> türlerinin trofozoit ve kistlerinin nitelikleri	15
Tablo 2: Trofozoitlerin diğer özellikleri	16
Tablo 3: Kistlerin diğer özellikleri	17
Tablo 4: Örneklerin makroskopik özellikleri	28
Tablo 5: Örneklerin mikroskopik özellikleri	29



1.GİRİŞ

Çok eski yıllardan beri bilinen bağırsak yerleşimli protozoon *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), diğer amiplerden farklı olarak patojendir ve invaziv seyir göstererek intestinal ve ekstraintestinal amipli dizanteri (amibiyaza) neden olmaktadır.

İnvaziv amibiyaz tanısında yaygın kullanılan tanı yöntemi direkt ve boyalı mikroskopik bakıdır. Dışkı örneklerinde amip antijenlerini saptamaya yönelik testler [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hızlı tanı testleri] ve özellikle bağırsak dışı tutulumu olan hastalarda oldukça yararlı olan antikor saptamaya yönelik serolojik testler [ELISA, indirekt hemagglütinasyon (İHA), kompleman fiksasyon (CF), lateks agglütinasyon testleri] hali hazırda pratik ve sürekli geliştirilen yöntemlerdir. Dışkı, rektal biyopsi ve karaciğer apse örneklerinden parazit, ksenik (difazik ve monofazik) ve aksenik kültürlerde üretilmektedir. Moleküler yöntemler de, *E. histolytica*'nın tanımlanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuç verir. Gerek dışkıda antijen saptama testlerinin gerekse moleküler testlerin en önemli avantajı mikroskopi hatalarını da ortadan kaldırmalarıdır.

Bu çalışma ile; ishal şikayeti ile başvuran ve intestinal amibiyaz ön/ayırıcı tanısı için *E. histolytica* araştırılması istenen hastaların dışkı örneklerinde, direkt ve boyalı mikroskopik inceleme, dışkıda *E. histolytica* adezin antijeni saptanmasına yönelik ELISA testi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testlerinin çalışılması ve bu testlerin tanı değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Amibiyaz, *E. histolytica*'nın oluşturduğu tüm dünyada yaygın olarak görülen parazitik bir enfeksiyondur. Tropikal ve ılıman tüm bölgelerde endemiktir (1). Genellikle sosyoekonomik durumu kötü, hijyen alışkanlıkları yetersiz, kötü beslenen gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tüm dünyada amibiyazın malarya ve şistozomiyazisten sonra üçüncü paraziter enfeksiyona bağlı ölüm nedeni olduğunu açıklamıştır (3).

2.1. Tarihçe

Amibiyaz ilk olarak Hipokrat (M.Ö. 460-377) tarafından ateş ve dizanteri ile karakterize ölümcül bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Fedor Losch 1875 yılında St Petersburg'da kanlı ishal şikayetiyle kliniğe başvuran hastanın dışkıında paraziti belirlemiştir (4). Schaudinn ise 1903 yılında bu mikroorganizmaya *Entamoeba histolytica* adını vermiş ve amiplerin değişik biçimlerini tanımlamıştır (5). Parazitin yaşam döngüsü ise 1925 yılında Dobell tarafından açıklığa kavuşturulmuştur. Diamond'ın 1961'de ilk amip kültürünü yapması *E. histolytica*'nın hücre biyolojisi ve biyokimyasının anlaşılmasında dönüm noktası olmuştur (6,7).

Türkiye'de 1904 yılında *E. histolytica*'yı mikroskopa görerek ilk bilimsel yayını yapanlar Dycke ve Reşat Rıza'dır (7).

Entamoeba dispar (*E. dispar*) ise ilk kez 1925 yılında Brumpt tarafından bildirilmiştir. Aynı kompleks içinde yer alan *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın sadece zimodemleri bazında ayırt edilebildikleri 1978 yılında Sargeant ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (8).

Morfolojik olarak *E. histolytica/dispar* ile benzer olan *Entamoeba moshkovskii* (*E. moshkovskii*) ilk defa 1941 yılında Moskova'da kanalizasyon sularında tanımlanmıştır. *E. moshkovskii* türünün çevresel örneklerdeki izolatları, kirli atık sularında taze, az tuzlu ve tuzlu sularda bulunabilmektedir. C. Graham Clark ve Louis S. Diamond 1991 yılında moleküler yöntemlerle, *E. histolytica* 'nın patojen olmayan Laredo suşunun *E. moshkovskii* ile identik olduğunu göstermişlerdir (9).

2.2. Sınıflandırma

İnsan sindirim sisteminde yaşayan amiplerin sınıflandırması şu şekildedir (10).

Üst bölüm	: Eukaryot
Bölüm	: Protozoa
Üst sınıf	: Sarcodina
Sınıf	: Rhizopodea
Takım	: Amoebida
Aile	: Entamoebidae
Cins	: <i>Entamoeba</i>
Tür	: <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Entamoeba dispar</i> <i>Entamoeba moshkovskii</i> <i>Entamoeba coli</i> <i>Entamoeba hartmanni</i> <i>Entamoeba polecki</i>

2.3. Morfolojisi

E. histolytica'nın insanda trofozoit, prekist, kist, metakist ve metakistik trofozoit şekilleri görülmektedir (11-14).

2.3.1. Trofozoit şekli

Bu form amorf yapıda olup; boyutları 12-60 µm arasında değişmektedir. Aktif olarak yalancı ayaklarla hareket eden, büyüyen, beslenen ve çoğalan dönemdir. Sitoplazması ekto ve endoplazma diye ikiye ayrılır ve bu iki tabaka özellikle yalancı ayaklar bölgesinde birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilir. Ektoplazma refraktif yapıda iken endoplazma granüler yapıdadır. Taze dışkılarda hızlı hareket ederken, beklemiş dışkılarda hareket yavaş ve yalancı ayakları kısa ve geniş şekilde görülebilmektedir.

Trofozoit şeklinin iki tipi bulunmaktadır:

1. Doku Şekli: Enfektif, invaziv veya patojen şekil adı da verilmektedir. Gerçek parazit ve patojen olan bu şekil 20-60 µm büyüklüğünde görülmektedir. Enfeksiyon sırasında bazen sitoplazması içinde eritrosit bulunabilmektedir. Direkt mikroskopik bakıda nükleus seçilememektedir ancak boyanmış preparatlarda nükleus kese biçiminde ve amibin büyüklüğü ile orantılı görülmektedir. Nükleusda; aynı büyüklükte ve düzgün sıralanmış periferik kromatin tanecikleri, nokta gibi küçük ve merkezi bir karyozom (nükleolus) bulunmaktadır.
2. Bağırsak Boşluğu Şekli: Kommensal, apatojen veya minuta şekli adı da verilmektedir. Sitoplazma içinde eritrositlerin görülmediği bu form 12-20 µm büyüklüğünde olup, akut amipli dizanteri dönemini geçirmiş kişilerin ve portör olanların dışkılarında bulunmaktadır (11-13,15).

2.3.2. Prekist şekli

Enfeksiyonun kronikleştiği durumlarda ve tedavi olan kişilerin dışkılarında görülmektedir. Trofozoitlerin bölünmesinden sonra oluşmaktadır. Kist dönemi öncesi besin vakuollerinin kaybolmasından sonra, nükleus yapısı trofozoitin nükleus yapısına benzemektedir. Ektoplazma ve endoplazmanın ayrılamadığı, sitoplazmasında çomak şeklinde ve tanecikler halinde kromatoid cisimciklerin görülebildiği geçici bir şekil olarak bilinmektedir (11-13).

2.3.3. Kist şekli

Prekistlerden gelişen evrim şekilleri olup, büyüklükleri ortalama 12-15 µm arasında bulunmaktadır. Kistler hareketsiz, yuvarlak, 1-4 nükleuslu, 0,5 µm kalınlığında kitinden yapılmış refraktil bir kist zarı ile çevrilidir. Nükleus yapısı trofozoitlerle aynı özelliktedir. Fakat kist matürasyonu sırasında nükleuslar, progresif olarak her bölünmeyi takiben daha küçük hale gelmektedir. Boyanmış preparatlarda, kistler içindeki nükleuslar daha iyi görülmektedir. Bir iki nükleuslu kistler içinde görülebilen kromatoid cisimcikler bir veya iki adet olup, ışık kırıcı, sosis şeklinde görülmektedir. Ancak bu yapılar, kist oluştuktan bir süre sonra yani

dört nükleuslu olgun kistlerde kaybolmaktadır. Bir veya iki nükleuslu kistlerde görülen vakuolün içinde glikojen depolanmıştır. Iyotla boyalı preparatlarda esmer-kırmızı renkte görülmektedir. Boyanmamış preparatlarda olgun (dört nükleuslu) kistlerdeki nükleuslar ve vaküol görülememektedir. Dış koşullara dayanıklı olan olgun kistler enfeksiyonun yayılışında birinci derecede rol oynamaktadırlar (11-13,15,16).

2.3.4. Metakist şekli

Olgunlaşmış dört nükleuslu kistlerin su ve yiyecekler aracılığıyla sindirim yolundan alınmasından sonra, kalın bağırsaklarda dört nükleuslu metakistik amip şekline dönüşmektedir.

Metakistte bulunan nükleusların bölünmesiyle sekiz adet nükleus etrafına sitoplazma toplanarak küçük amipler oluşmaktadır. Bu amipler kalın bağırsağa yerleşirler ve burada büyüyerek, patojen trofozoitler veya kommensal trofozoitler şekline dönüşmektedirler (11-13,15).

E. histolytica ve *E. dispar* trofozoitleri morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemezler. *E. dispar*'ın trofozoitleri içinde sıklıkla eritrosit bulunmamaktadır. (17). Haque ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, *E. dispar* saptanan örneklerin %15,7'sinde, *E. histolytica* saptananların da %68'inde eritrositlerin fagosite edilmiş olması, mikroskopi yöntemiyle amip içinde eritrosit varlığının tek başına *E. histolytica*'yı işaret edemeyeceğini göstermektedir (11-13).

2.4. Yaşam siklusu

E. histolytica'nın tek konağı insandır. *E. histolytica* ile enfekte olmuş kişiler dışkılarıyla enfeksiyöz kistleri dışarı atarlar. Kistlerin karıştığı suların içilmesi veya suyla temas eden yiyeceklerin yenmesi ile oral yoldan bulaş olur. Bu protozoonun hiçbir hayvan rezervuarı bulunmamaktadır (15). Amibiyaz dört çekirdekli kistlerin ağız yolu ile alınmasıyla oluşmaktadır (7,10). *E. histolytica*'nın yaşam siklusu enfekte kist ve çoğalan trofozoit basamaklarından oluşur (Şekil 1).

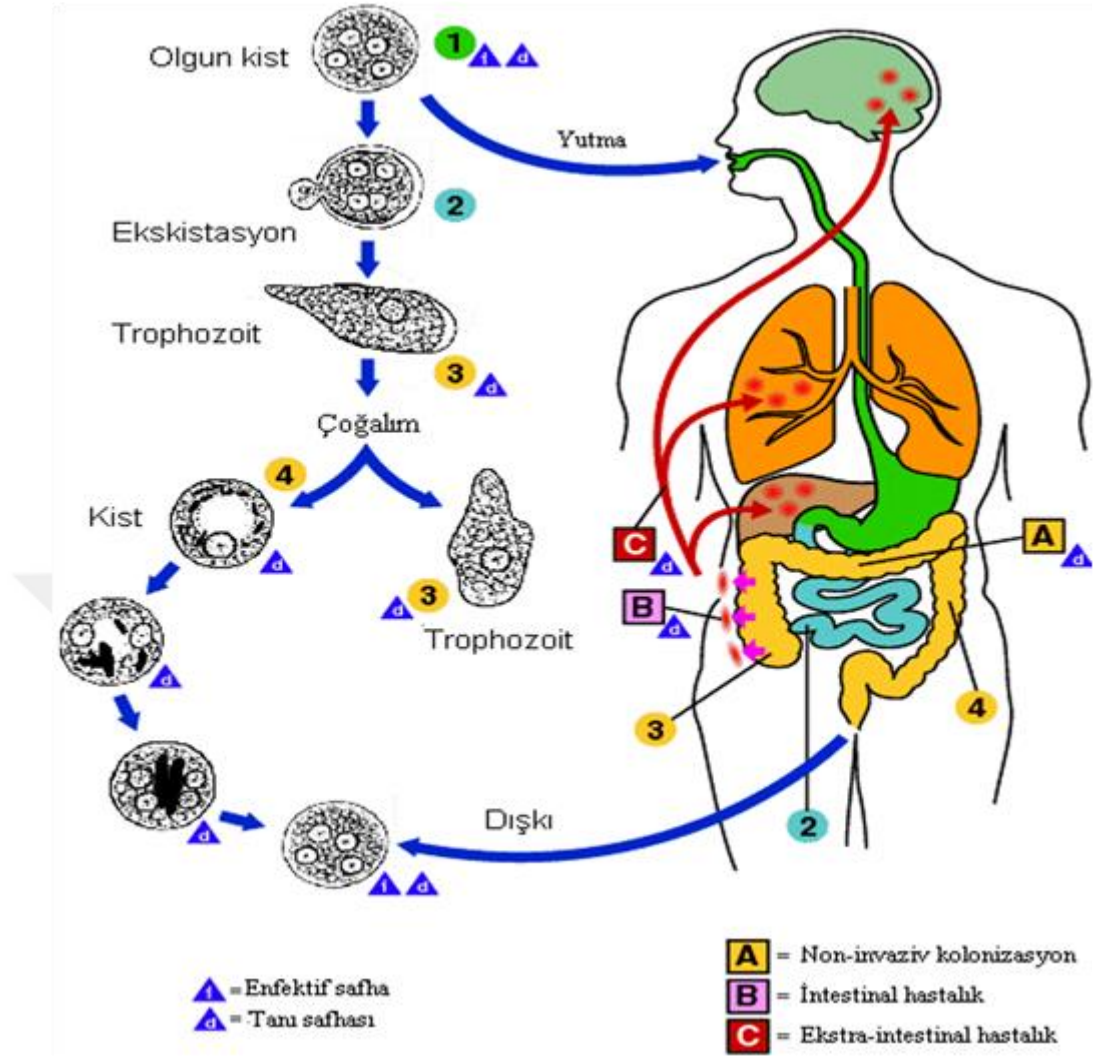
Ağız yolu ile alınan kistler barsak lümeninde terminal ileuma kadar ilerler ve burada sekiz yavru trofozoit eksiste olur. Bu immatür trofozoitler sıklıkla çekal ve sigmoidorektal bölge olmak üzere kalın bağırsaklara kolonize

olmaktadır. Burada bakteri ve hücre kalıntılarıyla beslenmekte ve ikiye bölünerek çoğalmaktadırlar (15). *E. histolytica* trofozoiti her zaman tek nükleusludur. Sitoplazması sindirilmiş eritrosit içerir. Çevre şartlarına dayanıksızdır ve dakikalar içinde parçalanır (3,18).

Trofozoitlerin aseksüel replikasyonuna alternatif olarak aynı zamanda enkistasyon meydana gelebilmektedir. Enkistasyonu indükleyen faktörler bilinmemektedir. Fakat müsin tabakasında trofozoitlerin toplanmasının enkistasyonu tetikleyebileceği ileri sürülmektedir. Enkistasyon, trofozoitlerin daha yuvarlaklaşmasıyla ve sitoplazmada kromatoid cisimciklerin belirmesiyle başlamaktadır. Kist matürasyonu olurken hücre bölünmesi olmaksızın iki tur nükleer replikasyon meydana gelmekte ve matürasyon sürecinin tamamlanmasıyla dört nükleuslu kistler oluşmaktadır (15).

Dört nükleuslu kist yiyecekleri veya suyu kontamine ettiğinde hastalık oluşturan enfeksiyöz formdur (3).

Kistler konak dışında özellikle nemli ortamlarda haftalarca, hatta aylarca canlı kalabilirler. Ancak -5 °C'nin altında ve 40 °C 'nin üstündeki sıcaklık koşullarında hızla parçalanırlar (3). Kistler invaziv değildir. Sadece trofozoitler gastrointestinal mukozaya penetre olabilirler (19). Bazı hastalarda trofozoitler kan akımı ile karaciğer, akciğer ve beyin gibi başka organlara göç ederek ekstraintestinal enfeksiyonlara sebep olurlar. Bulaş aynı zamanda seksüel yolla da (kist ve trofozoitler) görülmektedir (15).



Şekil 1: *E. histolytica*'nın yaşam döngüsü (51).

2.5. Patogenez

E. histolytica'nın hastalık oluşturmada konak genetik özellikleri yanında amibin virölansı, sayısı, trofozoitler tarafından salınan enzimler önemlidir. Enfeksiyon sonuçları asemptomatik kolonizasyon, ishal, invaziv kolit, karaciğer apsesi veya metastatik enfeksiyon şeklinde değişebilmektedir (20). Hastaların %80'inde asemptomatik kolonizasyon vardır. Parazitin sistein proteaz, galactose/N-acetylgalactosamine-inhibitable lectin (Gal/GalNAc lektin) ve amebopor gibi pek çok olası virölans faktörü vardır (3). Amibin yüzeyinde nöraminidaz ve β -glukozaminidazı da içeren karmaşık bir enzim topluluğu bulunduğu bilinmektedir (21). *E. histolytica* patogenezi için gerekli olan komponentler kalsiyum bağlayan protein ve kalmodulin bağımlıdır (3).

Enfeksiyon dört nükleuslu *E. histolytica* kistlerinin oral yolla alınması ile başlar. Ekskiste dönem geçtikten sonra trofozoitler kalın barsakta kolonize olurlar. *E. histolytica* trofozoitleri yüzey proteini lektin aracılığıyla kolon epitel hücreindeki galaktoz ve N-asetil galaktozamin (GalNAc)'e yapışırlar. Lektin hedef hücreye yapışmayı, kompleman direncini ve sitotoksisiteyi sağlar. Lektine karşı oluşmuş monoklonal antikolar hem in vitro tutunma, hem de sitotoksisiteyi azaltır. Lektin, disülfid bağlarıyla bağlanmış ağır (170kDa) ve hafif (31-35kDa) alt üniteleri ve nonkovalen olarak bağlanmış bir ara alt ünitesi (150kDa) olan 260kDa ağırlığında bir heterodimerdir. Ağır, orta ve hafif alt üniteler farklı genler tarafından kodlanırlar (22). Yapılan son çalışmalar, sadece Gal/GalNAc lektin değil, lipofosfopeptidoglikan ve serin-treonin-izolösinden zengin proteinin de adhezyon ve sitotoksiteden sorumlu olduğunu göstermektedir (23,24).

Gal/GalNAc'lı lektinin inhibisyonu konak hücre yıkımını önler ve yüzeyinde Gal/GalNAc eksikliği olanlar yapışma ve sitolize dirençlidir (25,26).

Enterositlere bağlanmanın ardından, parazitin endotel altına yayılmasını engellemek amacıyla konak doku tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretilmeye başlar (27).

Penetrasyon çoğunlukla mukoza altında kalıp, musküler tabakayı aşmaz. *E. histolytica* trofozoitlerinin submukozaya yayılımı ile ağzı dar, tabanı geniş şişe biçimli ülserler görülür. Nekroz nedeni ile kılcal damarlar açılır ve kanama başlar. Ödeme rağmen fazla lökosit migrasyonu olmaz.

Çok ender olarak nekroz musküler tabakayı da aşar ve barsak perforasyonu gelişebilir.

Kolondaki bakteriyel flora trofozoitlerin çoğalma ve penetrasyonunu kolaylaştırır, sekonder enfeksiyona neden olabilir. Trofozoitler venöz dolaşımla karaciğere ulaşacak olursa özellikle sağ lopta amip apsesi meydana gelir. Buradan direkt yolla sağ akciğere geçiş mümkündür (20,28).

2.6. Epidemiyoloji

Moleküler tekniklerin kullanımıyla elde edilen prevalans ve morbidite verileri dünyada amibiyanın endemik olduğu bölgelerin geçerli bir haritasının

çıkarılmasını sağlamıştır. Buna göre Asya’da Hindistan ve Bangladeş, Afrika, Asya Pasifik Ülkeleri (Tayland ve Japonya), Güney ve Orta Amerika (Meksika ve Kolombiya) endemik bölgeler olarak saptanmıştır (39,40).

Amibiyaz; sanitasyonun ve eğitim düzeyinin yeterli olmadığı gelişmekte olan ülkelerin önemli bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. Göçler, uluslararası insan hareketliliğinin artması hastalığın insidansını etkilemektedir. Hastalığın görüldüğü toplumlarda daha çok 15 yaş altı popülasyon etkilenmekte, özellikle de 5-9 yaş grubu çocuklarda enfeksiyonun daha fazla tespit edildiği bildirilmektedir. Aşırı yağışların olduğu ve sellerin görüldüğü yağmur mevsimlerinde enfeksiyon sıklığının artışı dikkat çekmektedir (39-41).

Gelişmekte olan ülkelerde amibiyaz prevalansının kültürel özellikler, yaş, sanitasyon düzeyi, nüfus yoğunluğu, sosyekonomik duruma bağlı olduğu görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise enfeksiyon çoğunlukla *E. dispar*’a bağlı olup endemik bölgelerden göç edenler veya o bölgelere seyahat edenler, homoseksüel erkekler ve HIV ile enfekte hastalar gibi belirli durumlarda sınırlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde, *E. histolytica/dispar* sıklığı kullanılan yöntemlere ve coğrafi bölgelere göre değişmek üzere, %0 ile %29,5 arasında bildirilmektedir. Tanyüksel ve arkadaşları Van ve Şanlıurfa illerinde ishal ve dizanteri bulguları olan hastalara ait dışkı örneklerinin mikroskopik inceleme ile %24’ünde *E. histolytica/dispar*, spesifik ELİSA ile %13’ünde *E. histolytica* tespit etmişlerdir. Ak ve arkadaşları ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde dokuz ili kapsayan ve 4470 olguyu içeren çalışmalarında dışkı örneklerinin mikroskopik incelenmesi ile tüm popülasyon genelinde %0-%9.1 sıklığında *E. histolytica/dispar* saptadıklarını ifade etmişlerdir (42-46).

2.7. Klinik

E. histolytica enfeksiyonları genel olarak üç farklı şekilde karşımıza çıkar.

1. Asemptomatik kolonizasyon
2. İntestinal amibiyaz
3. Ekstraintestinal amibiyaz

2.6.1. Aseptomatik kolonizasyon

Tüm *E. moshkovskii* ve *E. dispar* enfeksiyonları ile *E. histolytica* enfeksiyonlarının %80'i aseptomatiktir. *E. histolytica* ile enfekte aseptomatik taşıyıcılar aynı zamanda invaziv amibiyaza ilerleme açısından da belirli bir risk taşımaktadır. Bangladeş’de *E. histolytica* ile kolonize çocuklarla yapılan bir çalışma, 651 aseptomatik enfekte çocuğun 25’inin (%4) amibik ishal veya dizanteri geliştirdiğini ortaya koymuştur (30). Kanlı dışkısı olmayan hastaların rektosigmoidoskopilerinde patoloji görülmemiştir. İnvaziv enfeksiyonu olmayanlar dahil tüm *E. histolytica* enfeksiyonlu hastaların serumlarında spesifik antikor saptanmıştır.

Gelişmiş ülkelerde *E. histolytica* enfeksiyonundan daha sık görülen *E. dispar* enfeksiyonunda kolit ve karaciğer apsesi görülmemektedir (21).

Günümüzde amibiyaz tanısı için, pek çok ülkede dışkı mikroskopisi kullanılmaktadır. Aseptomatik *E. histolytica* hastalarının oranı bilinmemektedir. Güney Afrika’da yapılan bir çalışma, *E. histolytica* ile kolonize kişilerin %10’unda bir sene içerisinde invaziv amibiyaz geliştiğini göstermiştir (31).

Aseptomatik *E. dispar* enfeksiyonlarında hastalık belirtisi veya serum anti-amibik antikor cevabı gözlenmez (21).

2.6.2. İntestinal amibiyaz

DSÖ’nün tanımladığı iki klinik formu içerir; dizanterik olmayan kolit ve amibik dizanteri (32). Dizanterik olmayan kolit mukuslu veya mukussuz ishal ile birlikte, dışkıda eritrosit fagosite etmemiş trofozoitlerin varlığı ve dışkıda görülür kan olmaması ile karakterizedir. Sigmoidoskopik bulgular genelde normaldir. Amibik dizanteri, dışkıda kan ve mukusun, dışkı veya dokuda hematofagöz trofozoitlerin olduğu ishaldir. Sigmoidoskopik bulgular ülserli veya ülseriz inflamasyonlu mukozadır (33,34).

E. histolytica kaynaklı invaziv hastalığın başlangıç kliniği genellikle 1-3 haftada giderek belirginleşen şekilde kendini gösterir. Karın ağrısı, hassasiyet ve mikroskobik hematokezya birçok hastada oluşurken, daha az sayıda hastada gros olarak kanlı dışkılama mevcuttur, üçte bir hastada yüksek ateş mevcuttur. Amibik dizanterik kolit tüm yaş grupları ve her iki cinsi eşit olarak etkilemektedir.

Tanıda anahtar nokta hemen tüm dışkı örneklerinde kan pozitifliğidir (35).

Amibik kolitte inkübasyon süresi ortalama 21 gündür. Üç dört hafta içerisinde kademeli olarak şiddeti artan amibik ishalin başlangıcı akut olabilir veya başlangıç aylarca sürebilir. Kilo kaybı sık görülen bir bulgudur (36).

Intestinal amibiyazın komplikasyonu olarak akut fulminan kolit, toksik megakolon, ameboma, kutanöz amibiyaz ve rekto-vajinal fistül gelişebilir.

Genç yaş, gebelik, kortikosteroid tedavisi, malignansi, malnutrisyon ve alkolizm gibi diğer konak faktörleri artmış mortalite açısından risk faktörleridir.

2.6.3. Ekstraintestinal amibiyaz

Enfeksiyonun portal dolaşım aracılığı ile kan dolaşımına geçmesi sonucunda karaciğer apsesi, plöropulmoner amibiyaz, perikardiyal, serebral, genitoüriner, kutanöz ve oftalmik amibiyaz ile karakterize olan ekstraintestinal amibiyaz tablosu gelişir. Karaciğer apsesi endemik ve endemik olmayan bölgelerde ekstraintestinal amibiyazın en sık görülen klinik şeklidir. *E. histolytica* ile enfekte olan bireylerin %1'inden azında gelişmektedir (20). Amibik karaciğer apsesi (AKA) erişkinlerde çocuklardan daha sık görülmektedir. Çoğu amibik karaciğer apseli hastada ateş ve karın ağrısı vardır. Akut fazda sağ üst karın ağrısı ve hassasiyeti gözlenirken, subakut fazda kilo kaybı, ateş ve yaygın karın ağrısı görülür (3). Dışkıda *E. histolytica* hastaların çok az bir kısmında gözlenmektedir (21). Intestinal hastalık hikâyesi olmayan hastalarda *E. histolytica*'ya bağlı karaciğer apsесinin tanısı zordur (3). Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) piyojenik karaciğer apsесine benzer ve serolojik bulgular zayıftır.

AKA'nın kesin tanısı BT, MR ve teknesyum-99 karaciğer taramasıyla hepatik lezyonun görüntülenmesi ve serolojik testlerle *E. histolytica* antikor pozitifliğinin saptanması ile doğrulanır (37,38).

2.8. Laboratuvar tanısı

Amibiyazın tanısı laboratuvar incelemesine dayanır. Patojen olan ve olmayan türlerin ve tiplerin ayrımı tedavi ve hastalık kontrolü ile ilgili

uygulamaları yakından ilgilendirdiği için barsak amibiyazının laboratuvar tanısı özellik arz eder. Amibiyazın laboratuvar tanısı mikroskopik yöntemler ve ELISA, IHA ve lateks aglütinasyon gibi serolojik yöntemlere dayanmaktadır. Son 10 yılda moleküler biyolojik tanı yöntemleri oldukça hızlı bir şekilde gelişmiştir. Kesin tanı sadece dizanteriyi önlemek için değil, gelişmekte olan ülkelerdeki kötü sanitasyon şartlarından kaynaklanan yaygın asemptomatik kist taşıyıcılığına da engel olabilmek açısından çok önemlidir (19).

2.8.1. Dışkı mikroskopisi

E. histolytica'nın tanımlanması yakın zamana kadar sadece protozoon morfolojisinin direkt mikroskopik incelenmesine dayanıyordu. Ne yazık ki basit ve ekonomik olması nedeniyle yaygın bir şekilde uygulanan direkt mikroskopinin tek başına tanısal değeri yoktur. *E. histolytica* ile morfolojik olarak benzer olan diğer amip türleri arasında ayırım yapılması direkt mikroskopik inceleme ile imkansızdır. Amiplerin morfolojik mikroskopik özellikleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Dışkı örnekleri hem boyasız hem de Lugol veya D'Antoni iodin ile boyalı olarak incelenmelidir. İyot çekirdekleri görünür hale getirmektedir.

Trofozoitler sıklıkla kanlı ve mukuslu taze dışkıda gözlenmektedirler. Lam-lamel arası direkt mikroskopi preparatlarında trofozoit nükleusu kolay görülememektedir. Bir saat içinde hazırlanmış taze preparatlarda hareketli görülebilir. Trofozoitler yalancı ayakları ile çizgisel doğrultuda hareket yapmaktadır. 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. Trofozoitlerin sitoplazmasında fagosite edilmiş eritrosit bulunması sıklıkla *E. histolytica* enfeksiyonu için tanı koydurucu kabul edilmekle birlikte, akut dizanteri tablosu görülmeyen hastalarda eritrosit içeren trofozoitler görülmeyebilir. Bunun yanı sıra bazı çalışmalarda *E. dispar* saptanan örneklerde de eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin görüldüğü bildirilmiştir. Asemptomatik kişilerde daha çok kistlerle karşılaşmaktadır (21,47).

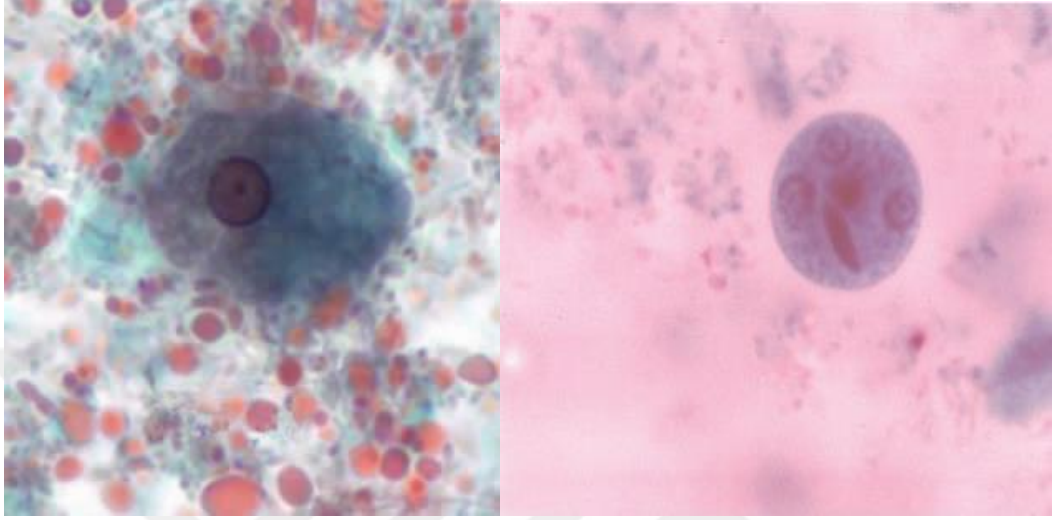
Boyanmamış preparatlarda olgun kistlerdeki nükleuslar ve vaküol görülememektedir. Boyanmış preparatlarda, kistler içindeki nükleuslar daha iyi görülmektedir. Bir iki nükleuslu kistler içinde görülebilen kromatoid cisimcikler bir veya iki adet olup, ışık kırıcı, sosis şeklinde görülmektedir. Ancak dört nükleuslu olgun kistlerde bu yapı kaybolmaktadır. Bir veya iki nükleuslu kistlerde görülen vakuolün içinde glikojen depolanmıştır. Iyotla boyalı preparatlarda esmer-kırmızı renkte görülmektedir.

Ayrıca dejenere olmuş eozinofil kalıntıları olan Charcot-Leyden kristalleri (eozinofillerin salgıladığı ürünler) ve kümelenmiş eritrositler görülebilir.

Bağırsak protozoonlarını artefaktlar, konak hücreleri, lökositler, makrofajlar ve maya hücrelerinden ayırt edebilmek için kalıcı boyama yöntemleri kullanılır. Kalıcı boyaların en yaygın kullanılanları trikrom ve demir hemotoksilen boyalarıdır. Trikrom boyama daha kolay ve daha az zaman alıcı olması nedeniyle daha çok tercih edilir. Kalıcı boyalı preparat hazırlanması ile direkt incelemede gözden kaçan protozoonlar daha kolay tanınır ve morfolojik yapıları ayrıntılı olarak incelenir. Ayrıca preparatın bozulmadan uzun süre saklanmasına ve pozitif örneklerin eğitim amaçlı kullanılmasına olanak sağlar. Ancak tanının morfolojik esaslara göre yapılması nedeniyle *E. histolytica*'ya morfolojik olarak benzer olan *E. dispar* ve *E. moshkovskii* ile ayırımını yapmada yetersizdir (48).

Mikroskopinin duyarlılığı en iyisi %10-60 arasında değişmektedir. Bu oranı yükseltmek için en çok 10 gün içinde en az üç kere olmak üzere dışkı örneği alınıp incelenmelidir. Bu sayede oranlar %85-95'lere çıkabilmektedir. Mikroskopik incelemeyi yapan kişinin yeterince deneyiminin olmaması, uygunsuz örnek alımı (örnek idrar ve suyla kontamine olmamalı), antibiyotik (tetrasiklin veya sulfonamid), laksatif antiasid, müshil (magnezyum sülfat), antidiyareik ilaçlar(kaolin veya bizmut) ve lavman kullanımı, uygun sayıda örnek almamak, dışkı örneklerini uygun fiksatiflerle saklamamak, ortamda benzer diğer amiplerin bulunması mikroskopiye olumsuz etkileyen nedenlerdir. Ayrıca direkt mikroskopik incelemede hareketsiz trofozoitleri polimorf lökositler, makrofajlar ve doku hücreleri ile ayırmak zordur. (21,47,49).

Direkt mikroskopiye dayalı olarak rapor edilmiş sonuçlar çok büyük olasılıkla hem hasta tedavisini hem de hastalık kontrolüne yönelik çalışmaları hatalı yönlendirmektedir (50-51).



Şekil 2: Trikrom boyama yöntemi ile boyanmış *E. histolytica/dispar* trofozoit ve kisti (51).

Tablo 1: Yaygın intestinal yerleşimli *Entamoeba* türlerinin trofozoit ve kistlerinin nitelikleri (47).

Nitelikler	<i>E.histolytica/dispar/moshkovskii</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. polecki</i>
Trofozoit (Büyüklik, çekirdek ve hareket)	15-20 µm, bir çekirdek (boyasız preparatlarda görmek güç), yalancı ayaklarla aktif hareketli	8-10 µm, bir çekirdek, (boyasız preparatlarda görmek güç), genellikle hareketsiz	20-25 µm, bir çekirdek (sıklıkla boyasız preparatlarda görülür); yavaş, kısa ve küt yalancı ayak	15-20 µm, bir çekirdek (genellikle boyasız preparatlarda görülür), yavaş
Kist	10-15 µm, olgun kist dört çekirdekli, olgun olmayan kist bir veya iki çekirdekli, boyasız preparatta çekirdek yapısını görmek güç	6-8 µm, olgun kist dört çekirdekli, olgun olmayan kist bir veya iki çekirdekli, iki çekirdek çok daha yaygın	15-25 µm, olgun kist sekiz çekirdekli, arada sırada 16 veya daha fazla çekirdek	10-15 µm, olgun kist bir çekirdekli nadiren iki veya dört çekirdek

Tablo 2: *Entamoeba* türlerinin trofozoitlerinin özellikleri (47).

Nitelikler	<i>E.histolytica/dispar/moshkovskii</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.polecki</i>
Kromatin (boyanmış)	Kromatin periferel, boncuklu görüntüye sahip	Çekirdek <i>E. histolytica</i> 'ya göre daha koyu boyanabilir, kromatin boncuklu görünümünden daha çok solid halka tarzındadır.	Kromatin küme şeklinde ve düzensiz dizilmiş, boncuk şeklinde değil daha çok solid halka şeklinde	Kromatin ince granüler halde, kromatin küme şeklinde veya membranın her iki yanında olabilir.
Karyozom (boyanmış)	Karyozom küçük, kompakt, merkezi yerleşimli ve eksantrik görünüşlü	Karyozom genellikle küçük ve kompakt; merkezi yerleşimli veya eksantrik	Karyozom büyük, kompakt değil, eksantrik olabilir-olmayabilir, yaygın olabilir veya koyu boyanır	Karyozom küçük ve genellikle merkezi yerleşimli
Sitoplazma (boyanmış)	Sitoplazma berrak, granüler, bakteri içerebilir; eritrositin varlığı bazı <i>E. dispar</i> suşlarında da nadiren görülse de <i>E. histolytica</i> için tanı koydurucudur.	Sitoplazma ince granüllü, bakteri içerebilir, eritrosit içermez.	Sitoplazma içinde farklı boyutlarda granüller ve vakuoller bulunur; bakteriler, mantarlar ve diğer artıklar bulunabilir.	Sitoplazma ince granüllü; bakteri içerebilir.

Tablo 3: *Entamoeba* türlerinin kistlerinin özellikleri (47).

Nitelikler	<i>E.histolytica/dispar/moshkovskii</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.polecki</i>
Kromatin (boyanmış)	Kromatin eşit dağılmış düzgün büyüklükte granüler şeklinde, periferik yerleşimli	Kromatin dağınık bir şekilde (çekirdek karakteristiklerini görmek zor olabilir)	Kromatin kaba granüler, küme şeklinde olabilir, düzenmiş şekilde dizilmiş	Kromatin ince granüllü
Karyozom (boyanmış)	Karyozom küçük, kompakt, genellikle merkezi yerleşimli fakat nadiren eksantrik	Karyozom küçük, kompakt, genellikle merkezi yerleşimli	Karyozom büyük, eksantrik, nadiren merkezi yerleşimli	Karyozom küçük ve genellikle merkezi yerleşimli
Sitoplazma (boyanmış)	Bulunabilecekler; genellikle küt, yuvarlak, düz olarak sonlanan uzun kromatoid cisimcikler; yuvarlak veya oval şekilli; kromatin olgun kiste yaygın veya hiç olmayabilir; kümeleşmiş kromatin kitlesi erken kist formlarında bulunabilir.	Genellikle bulunabilecekler; genellikle küt, yuvarlak, düz olarak sonlanan uzun kromatoid cisimcikler; yuvarlak veya oval şekilli; kromatin olabilir veya olmayabilir.	Bulunabilecekler (<i>E. histolytica</i> ' dan daha az sıklıkla); olgun kistlerde diffüz veya hiç görülmeyen kaba şekilde sonlanan kıymık şekilli yapılar, olgun kistlerde nadiren küme şeklinde kitleler	Açısal sonlanan bol kromatoid cisimcikler, yiv tarzı kromatoid cisimcikler de bulunabilmektedir. Kistlerin yarısı yuvarlak veya oval inklüzyon cisimcikleri içermektedir.

2.8.2. Kültür ve Izoenzim analizi

Kültür yöntemleri ksenik (difazik ve monofazik) ve aksenik sistemler şeklinde uygulanmaktadır. Ksenik kültürler tanımlanmamış bir florada parazitin varlığını gösterir. Aksenik kültürler diğer hücrelerin yokluğunda yapılan parazit kültür işlemleridir.

E. histolytica kültürünü ilk kez 1925 yılında Boeck ve Drbohlav difazik yumurtalı besiyeri kullanarak yapmışlardır. Robinson besiyeri ve Diamond'ın TYSGM-9 besiyeri *E. histolytica*'nın ksenik kültürü için en yaygın kullanılan besiyerleridir. *E. histolytica*'yı kültüre etme oranları %50-70 arasında değişmektedir.

E. dispar daha çok ksenik kültürde  reyebilirken sadece birkaç suçu aksenik kültürde  retilibilmi tir. *E. moshkovskii*'nin kültürü için tercih edilen besiyerleri monofazik TTY-SB, monofazik TP-S-1-GM'dir. *E. histolytica*'nın kültürü ve izoenzim analizi genellikle yetersiz ve rutinde kullanmaya uygun olmayan yöntemlerdir. Kültürde ve zimodem analizinde mikst enfeksiyonlu olgularda bir etkenin diğer etkenleri baskılaması sorunu unutulmaması gereken bir noktadır (21, 47).

Kültür mikroskopiden daha az duyarlılığı olan bir yöntemdir. Bakterilerin aksine protozoon kültürü tanı laboratuvarları için hem zor hem de uzun zaman alan işlemler gerektirmektedir. Patojen olmayan *E. dispar*'ın da kültürde kolay  remesinden dolayı iki türün ayırımını tam olarak sağlayamaz. Sonuç olarak *Entamoeba* kültürü tanıdan çok araştırma için kullanılabilecek bir yöntemdir. Amip kültürünün bir başka sorunu da özellikle *Blastocystis hominis* gibi istenmeyen parazitlerin üremesi ve bu  remelerin *E. histolytica*'yı g lgelemesidir. Unutulmamalıdır ki, kültürde üremenin olmaması *E. histolytica* enfeksiyonunu ekarte ettirmez (52).

Patojen ve patojen olmayan formları birbirlerinden ayırmak için amibik kültür lizatlarından izoenzim analizi yapılması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yirmi biri insan *E. histolytica* ve *E. dispar* izolatlarından,     deneysel amibik kültür izolatlarından elde edilen 24 farklı zimodem tanımlanmıştır. Bu zimodemler malik enzim, heksokinaz, glukoz fosfat izomeraz ve fosfoglukomutaz enzimlerinin elektroforetik paternlerini içerirler. Zimodem analizi, *E. histolytica*

ve *E. dispar*'ın ayrımını, farklı genetik özellikler gösteren hegzokinazlara sahip olmaları özelliğine dayanarak yapar. Zaman alıcı ve uygulanması zor bir yöntem olmasına rağmen, biyokimyasal özellikler kullanılarak farklı zimodemlerin tanımlanması, endemik bölgelerde epidemiyolojik durumu ortaya koymak açısından faydalıdır (21).

2.8.3. Antikor saptama yöntemleri

İntestinal amip enfeksiyonu için endemik bölgelerdeki birçok insan *E. histolytica*'ya defalarca maruz kalır. Vakaların çoğunda semptom görülmez. Eski ve yeni enfeksiyon farkını ortaya koyamayan antikor tayini kesin tanı için yetersizdir. Serolojik testler *E. histolytica* enfeksiyonunun endemik olmadığı gelişmiş ülkelerde faydalı olabilir. Tüm vakalarda serolojik testlerin paraziti tespit eden yöntemlerle (antijen saptama ve PZR) birlikte kullanılması tanı açısından en akılcı yaklaşımdır. Ancak antikor titrelerinin hastalığın ağırlığıyla ya da tedaviye cevap alınıp alınmadığıyla ilişkisi bilinmemektedir (21).

Antikorların saptanması özellikle dışkı örneklerinde parazit saptanamayan hastalarda AKA tanısında yararlıdır. Akut AKA düşünülen bir hastada antikor saptanamazsa 7-10 gün sonra ikinci bir örnek istenmelidir. Eğer hala serokonversiyon gelişmemişse etken olarak diğer ajanlar düşünülebilir. *E. dispar* ile enfekte hastalarda serum anti-amibik antikor titreleri yükselmemektedir (49,51).

Semptomatik *E. histolytica* enfeksiyonu olan hastaların %75-85'inde *E. histolytica* serum antikorları pozitif olarak bulunur. Yöntem olarak IHA, karşıt immunoelektroforez, amibik jel diffüzyon testi, kompleman fiksasyon deneyi (CF), indirekt floresan antikor deneyi (IFA), lateks aglütinasyon ve ELISA kullanılabilir (21,47).

2.8.4. Antijen saptama yöntemleri

Amibiyaz tanısında kullanılan antijen saptamaya yönelik ELISA yönteminin kullanılan diğer yöntemlere pek çok açıdan üstünlüğü vardır; bazı testlerle *E. histolytica*-*E. dispar* ayrımını yapmak mümkündür; duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksektir; deneyimsiz laboratuvar personeli tarafından bile uygulanabilirler; aynı

anda çok sayıda hasta örneğinin birden çalışılabilir olması epidemiyolojik çalışmalar için daha uygun olmasını sağlar. Ancak formalinle fikse edilmiş dışkı örneklerinde antijenin denatüre olduğu, taze veya dondurulmuş dışkı ile çalışılması gerektiği bilinmektedir.

Günümüzde kullanılan kitler ya *E. histolytica*'nın Gal/GalNAc lektinine karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar ya da *E. histolytica*'nın serinden zengin antijenine karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar kullanarak antijen tespiti yaparlar. Bunların dışında lizinden zengin yüzey antijeni, lipofosfoglikan ve tükrük adherence lektin antijeni ile hazırlanan kitler de araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadırlar.

ELISA yöntemiyle antijen saptama deneylerinde dışkı dışında tükrük, serum ve apse sıvısı gibi örneklerde de antijen saptanmıştır (38).

2.8.5. Moleküler tanı yöntemleri

Moleküler yöntemler, mikroskopi ve kültür tabanlı yöntemlerden duyarlılık ve özgüllük açısından daha avantajlı olmaları sebebiyle son yıllarda yaygın kullanım alanı bulmuşlardır.

PZR metodu intestinal amibiyaz tanısında duyarlılık ve özgüllük açısından antijen saptama yöntemleri ile yarışmaktadır. Dışkının miligramındaki tek bir *E. histolytica* trofozoitini bile bu yöntemle saptamak mümkündür. Ancak hem teknik olarak ELISA'dan zordur, hem de daha pahalı bir yöntemdir. Profesyonel laboratuvar elemanı ve özel ekipman gerektirdiğinden amibiyazın endemik olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanımı sınırlıdır. *E. histolytica*'nın genetik polimorfizm araştırmalarında da kullanılmaktadır. Yine de PZR'ın çapraz kontaminasyona açık olduğu ve dışkıdaki inhibitörlerden kolay etkilendiği unutulmamalıdır.

PZR amibik karaciğer apsesi tanısında da kullanılabilir, ancak DNA izolasyonu öncesinde aspirasyon materyalini proteazlarla muamele etmek gerekmektedir (21).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma sürecinde ishal şikayeti ile başvuran ve intestinal amibiyaz ön/ayırıcı tanısı için *E. histolytica* araştırılması istenen hastalarda, literatür verilerine göre bilinen pozitiflik oranı %7 olarak kabul edildiğinde, çalışmamızda %4-10 arasında bir orana ulaşılacağı düşünüldükçe, %95 güvenilirlik ile 630 örnek alınması planlanmıştır. Olanaklar dahilinde, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde 1 Ekim 2015-31 Temmuz 2016 tarihleri arasında çeşitli servis ve polikliniklerden Merkez Laboratuvarı'na gelen kanlı ve/veya mukuslu, şekilsiz toplam 546 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. Bu örneklerde, *E. histolytica* varlığını araştırmak için direkt ve boyalı mikroskopi, ELISA ve PZR yöntemleri çalışılmıştır.

3.1. Çalışma sahası

Antalya ili Türkiye'nin güneybatısında yer alır. Türkiye'nin beşinci büyük şehridir. Nüfusu 2015 Adrese Dayalı Nüfusa Kayıt Sistemi sonuçlarına göre 2 288 456'dır. Nüfusun %100'ü il ve ilçe merkezlerinde yaşamaktadır. Yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlıdır. Yazın ortalama sıcaklık 28-36 °C arasındadır. Öğle saatlerinde termometrenin 40 °C üzerine kadar çıktığı görülür. Ocak ayında ise sıcaklık ortalama 10-20 °C arasında değişir. İle kar düşmez. Yağış olmadığı günler hava açık ve güneşlidir. İlde yıllık ortalama nispi nem %64 civarındadır. Yılın ancak 40-50 günü kapalı ve yağışlıdır. Yağmur ilk ve sonbahar aylarında sağanak halinde yağar. Yılda ortalama yağış 1074,6 mm'dir.

3.2. Etik kurul onayı

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından, 09.09.2015 tarihinde, 191 sayılı kararla onaylanmıştır.

3.3. Direkt ve Kalıcı Boyalı Mikroskopik İnceleme

Laboratuvara ulaşan dışkı örneklerinden mikroskopik değerlendirme için iki adet lama yayma hazırlandı. Bir lam örneği serum fizyolojik ile diğeri ise lugol ile hazırlanarak X400 büyütmede incelendi. Şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist/trofozoiti görülen dışkı örneklerinden yayma

preparat hazırlanarak Wheatley'in trikrom boyası ile boyandı ve ışık mikroskobunda X1000 büyütmede incelendi.

Trikrom boyama yöntemi gelen dışkı örneklerine şu şekilde uygulandı;

1. Taze örnek bir aplikatör çubuk veya öze ile dışkıdan alınarak iki adet temiz lam üzerine yayma yapıldı. Yaymanın kalınlığı makroskobik olarak kontrol edildi.
2. Yayma kurumadan Schaudinn fiksatifine içine daldırıldı. En az 30 dk bu şekilde tutularak yayma sabitlendi. Gerektiğinde bir gece fiksatifin içinde bırakıldı.
3. Boyamayı yapmak için önceden 12 adet cam şaleye -set halinde- sıralı bir şekilde reaktifler konmuş halde hazır bulunduruldu.
4. Preparat %70'lik alkol solüsyonunda 2 dk bekletildi.
5. D'Antoni'nin iyot solüsyonunda 3-5 dk bekletildi.
6. %70'lik alkol solüsyonunda 2-5 dk bekletildi.
7. Tekrar %70'lik alkol solüsyonunda 2-5 dk bekletildi.
8. Lamlar trikrom boyasında 5-8 dk bekletildi.
9. Lamların fazla boyası dik biçimde kâğıt havlular üzerine yerleştirilerek süzülür.
10. Lamlar 2-3 sn %90 asit alkole batırıldı.
11. Lamlar kâğıt havluya değdirildikten sonra iki farklı şalede bulunan %100 alkolde çalkalandı.
12. %100 alkolde 2-5 dk bekletildi.
13. Tekrar %100 alkolde 2-5 dk bekletildi.
14. Ksilende 2-5 dk bekletildi.
15. Tekrar ksilende 2-5 dk bekletildi.

Trikrom boyalı preparatlarda, ışık mikroskobunda X1000 büyütmede, merkezi ve ufak bir karyozom ve hemen hemen her yerinde aynı büyüklükte düzgün bir periferik kromatin içeren, tipik nükleus yapısı gösteren kist ve/veya trofozoitler *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti olarak değerlendirildi.

3.4. Dışkıda *E. histolytica* adezin antijeni saptamaya yönelik

ELISA testi

Dışkı örneklerinde *E. histolytica* antijeni araştırılması için *Entamoeba* CELISA Path (Cellabs, Avustralya) ticari kiti kullanıldı. *Entamoeba* CELISA Path, dışkı örneğinde *E. histolytica*'ya özgü adezin antijenini tespit eden bir enzim immünassay kitidir. ELISA plağında bulunan kuyucuklar adezine bağlanan immobilize poliklonal antikörler içerir. Konjugat, *E.histolytica* adezini için spesifik bir monoklonal antikördür. Eğer örnekte *E.histolytica* adezini varsa inkübasyon fazında konjugata ve immobilize poliklonal antikora bağlanır. Bağlanmamış materyal yıkama basamakları sırasında uzaklaştırılır. Substrat eklendiğinde enzim-antikör-antijen kompleksi oluşmuşsa renklenme olur.

Çalışma için, laboratuvara gelen taze dışkı örneklerinden ayrılarak -20 °C'de saklanmış olan örnek porsiyonları kullanıldı. Şekli dışkının 0,15-0,20 gr'ı, sulu dışkının 0,4 ml'i 400µl diluentle 10 sn vortekslenildi. Her bir kuyucuk bir hasta için, birer kuyucuk da negatif ve pozitif kontroller için kullanıldı. Her bir kuyucuğa bir damla konjugat eklendi. Pozitif kontrol kuyucuğuna pozitif kontrolden bir damla, negatif kontrol kuyucuğuna 0,1 ml dilüent ve test kuyucuklarına 0,2 ml dışkı örneği eklendi. Plağın üstü plastik bir kapakla kapatılıp iki saat oda ısısında bekletildi. Ardından %5 oranında sulandırılmış yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandıktan sonra iki damla substrat eklendi ve karanlıkta 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bir damla stop solüsyonu eklenince mavi rengin sarıya döndüğü görüldü, plak spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu. Sonuçlar değerlendirilirken, pozitif kontrolün 0,050 optik dansiteden (OD) büyük veya eşit ve negatif kontrolün 0,150 OD'den düşük absorbans vermesi gerekliliği göz önünde bulunduruldu. OD'si 0,150'den düşük örnekler negatif, 0,150'den büyük ve eşit örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR çalışması için, BD Max sistemi ile çalışılan BD Max Enteric Parasite Panel (Becton Dickinson, ABD) otomatize multipleks moleküler testi kullanıldı.

Bu test ile taze veya formalin ile fiske edilmiş dışkı örneklerinde direkt ve kalitatif olarak üç farklı enterik parazit saptanmaktadır:

- *Giardia lamblia* (SSU rRNA)
- *Cryptosporidium hominis* ve *C. parvum* (*Cryptosporidium*-spesifik DNA parçacığı),
- *Entamoeba histolytica* (SSU rRNA).

Laboratuvara gelen taze dışkı örnekleri vortekslendi, 10 µL öze ile alınan örnek BD MAX Sample Buffer Tube'e aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Sample Buffer Tube, septum bir başlık ile kapatıldı ve parazit organizmaların lizisini kolaylaştırmak için BD Pre-warm Heater'da ısıtıldı. Isıtma işleminin ardından Sample Buffer Tube vortekslenerek BD MAX Sistemi'ne aktarıldı. Örnek, BD MAX Enteric Parasite Panel Unitized Reagent Strip ve PZR Cartridge ile birlikte BD MAX cihazına yüklendikten sonra çalışma başlatıldı.

BD MAX sistemi hedef organizma lizisi, DNA ekstraksiyonu ve konsantrasyonu dahil örnek hazırlanmasını, reaktif rehidrasyonu, hedef nükleik asit sekansının amplifikasyonu, gerçek zamanlı PZR kullanılarak saptanmasını ve sinyalin yorumlanmasını otomatik olarak gerçekleştirir.

BD Pre-warm Heater'da, yüksek bir sıcaklıkta enzimatik hücre lizisi sonrasında serbest kalan nükleik asitler manyetik afinite boncuklarında yakalanır. Bağlı nükleik asitlerin bulunduğu boncuklar yıkanır ve nükleik asitler Elüsyon Tamponu'nda ısıyla ve yüksek pH ile elüsyona uğratılır. Elüe edilmiş DNA nötralize edilir ve PZR reaktiflerinin rehidrasyonu için Master Mix Tube içine aktarılır. Rehidrasyon sonrasında, BD MAX Sistemi BD MAX PZR Cartridge'a PZR için sabit bir hazır solüsyon hacmi verir. BD MAX PZR Cartridge'daki mikrovalfler PZR başlamadan önce amplifikasyon karışımını sınırlamak ve böylece buharlaşma ve kontaminasyonu önlemek için sistem tarafından mühürlenir. Amplifiye DNA hedefleri bir uçta söndürücü kısım ve öteki uçta bir floresan raportör boya (florofor) ile etiketlenmiş hidroliz (TaqMan) probleleriyle saptanır. Farklı floroforlarla etiketlenmiş problemler, BD MAX Sistemi'nin dört farklı optik kanalında enterik parazit hedefleri (*Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* ve *Cryptosporidium* spesifik DNA fragmanından SSU rRNA genleri) saptamak amacıyla kullanılır. Problemler doğal durumundayken florofor floresansı

söndürücüye yakınlığı nedeniyle söndürölür. Ancak hedef DNA varlığında proplar tamamlayıcı sekanslarına hibridize olur ve DNA polimerazın, DNA şablonu boyunca yeni oluşan iplikçığı sentezlerken 5'-3' ekzonökleaz aktivitesi ile hidrolize uğrar. Bunun sonucunda floroformlar söndürücü moleküllerden ayrılır ve floresan yayılır. BD MAX Sistemi bu sinyalleri her döngüde izler ve program sonunda verileri son sonuçları raporlamak üzere yorumlar. Doğrudan örnek üzerinde yapılan bu testte spesifik hedeflerin amplifikasyonu için gerçek zamanlı (real-time) PZR (RT-PZR) kullanılır. Testte amplifiye DNA'nın saptanması için florojenik gene özgü hibridizasyon proplar kullanılır.

Bu test ayrıca ekstraksiyon tüpünde bulunan ve ekstraksiyon, konsantrasyon ve amplifikasyon adımlarına tabi olan bir internal kontrolü içerir. İnternal kontrol, potansiyel inhibitör maddelerin varlığını ve sistem veya reaktif arızalarını izlemek için lizis, ekstraksiyon, konsantrasyon ve amplifikasyon adımlarına dahil edilmiştir.

Çalışma sonunda, BD MAX sistemi bilgisayar programı tarafından otomatik olarak, hedef ve internal kontrol amplifikasyonunu temel alarak, negatif, pozitif ve geçersiz sonuç olarak verilen test sonuçları değerlendirildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya alınan örneklerin 257 (%47)'si kadın, 289 (%53)'u erkek hastalara aittir. Hastaların yaş ortalaması $23,77 \pm 24,05$ olarak bulunmuştur. En küçük hasta 0, en büyük hasta 92 yaşındadır. Hastaların %53'ünü çocuk yaş grubu oluşturmaktadır. Çocuk hastaların yaş ortalaması $4,62 \pm 4,63$ olarak bulunmuştur.

Hastaların 167 tanesi Çocuk Acil Servisi'nden, 109 tanesi Acil Servis'ten, 65 tanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nden, 61 tanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nden, 25 tanesi Dâhiliye Servisi'nden, 23 tanesi Çocuk Gastroenteroloji Polikliniği'nden ve 96 tanesi de çeşitli poliklinik ve servislerden başvurmuştur.

Örneklerin makroskobik özellikleri tablo 4'de gösterilmiştir.

Direkt mikroskobik incelemede 147 örnekte bol lökosit ve bol eritrosit, 119 örnekte bol lökosit ve nadir eritrosit, 87 örnekte bol lökosit ve 5-10 eritrosit, 70 örnekte bol eritrosit ve nadir lökosit, 32 örnekte nadir lökosit, 31 örnekte bol eritrosit ve 5-10 lökosit, 19 örnekte nadir eritrosit, 16 örnekte 5-10 lökosit, 12 örnekte nadir eritrosit ve lökosit, altı örnekte 5-10 eritrosit, dört örnekte 5-10 lökosit ve eritrosit görülmüş, üç örnek ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Direkt mikroskobik inceleme ile örneklerin 198 (%36.3)'inde şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüş ve bu örnekler trikrom boyama yapılarak incelenmiştir. Bu örneklerle ait direkt mikroskobik inceleme sonuçları şöyledir; 45 örnekte bol lökosit ve bol eritrosit, 36 örnekte bol lökosit ve nadir eritrosit, 20 örnekte bol lökosit ve 5-10 eritrosit, 20 örnekte nadir lökosit, 18 örnekte bol eritrosit ve 5-10 lökosit, 13 örnekte bol eritrosit ve nadir lökosit, 10 örnekte nadir eritrosit ve lökosit, sekiz örnekte nadir eritrosit görülmüştür (Tablo 5).

Trikrom boyama yapılan 49 örnekte şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti, üç örnekte *Blastocystis hominis* kistleri, iki örnekte *Entamoeba coli* kistleri, bir örnekte *E. hartmanni* kistleri, bir örnekte de *Blastocystis hominis* ve *Entamoeba coli* kistleri bir arada görülmüştür.

Trikrom boyama yöntemi ile *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti açısından şüpheli bulunan 49 örnekte PZR ve dışkıda *E.histolytica*'ya özgü adezin antijeni varlığını araştıran ELISA testi çalışılmıştır. PZR yöntemi ile örneklerin 44'ü negatif bulunmuştur. Üç örnekte PZR inhibitörü nedeniyle, iki örnekte ise sistem hatasına bağlı olarak geçerli sonuç elde edilememiştir. ELISA yöntemi ile örneklerin hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır.

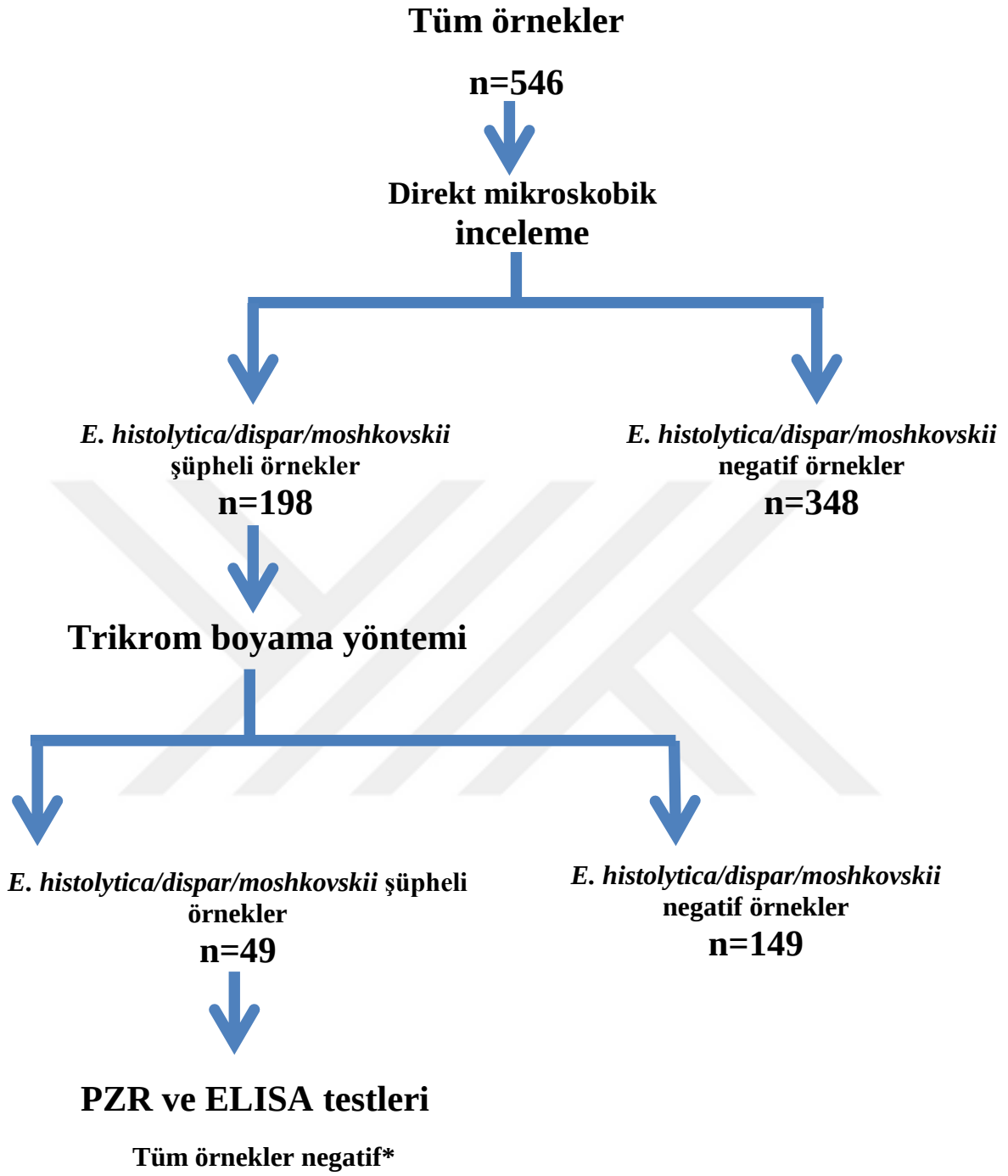
Yaptığımız çalışmada PZR ve antijen pozitiflik oranı %4-10 olarak öngörülmesine rağmen, PZR ve antijen testi ile pozitif örnek saptanmadığı için geçerlilik analizi yapılmamıştır.

Tablo 4: Örneklerin makroskopik özellikleri

	Kanlı	Mukuslu	Kanlı ve mukuslu	Sulu	Yumuşak	Toplam
Tüm örnekler	74	452	16	3	1	546
Direkt bakı ile <i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i> kist ve/veya trofozoiti açısından şüpheli örnekler	34	144	16	3	1	198
Trikrom boyama ile <i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i> kist ve/veya trofozoiti açısından şüpheli örnekler	3	33	9	3	1	49

Tablo 5: Örneklerin mikroskopik özellikleri

	Bol lökosit ve bol eritrosit	Bol lökosit ve nadir eritrosit	Bol lökosit ve 5-10 eritrosit	Bol eritrosit nadir lökosit	Bol eritrosit ve 5-10 lökosit	Nadir eritrosit	Nadir lökosit	Nadir lökosit ve nadir eritrosit	5-10 eritrosit	5-10 lökosit	5-10 lökosit ve 5-10 eritrosit	Negatif	Toplam
Tüm örnekler	147	119	87	70	31	19	32	12	6	16	4	3	546
Direkt bakı ile şüpheli örnekler	53	36	20	13	18	8	20	10	3	10	4	3	198
Trikrom boyama ile şüpheli örnekler	14	12	2	2	2	4	2	2	1	1	4	3	49



Şekil 3: Test akış ve sonuç şeması

*Beş örnekte PZR ile geçerli sonuç elde edilemedi.

5.TARTIŞMA

Gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı problemi olan *E. histolytica*'nın oluşturduğu amibiyazın sıklığı belli değildir. Mikroskopik olarak identik olan *E. dispar* ve *E. moshkovskii*'nin tanımlanmasından sonra yeni geliştirilen tanı yöntemleri ile gerçek *E. histolytica* sıklığı araştırılmaktadır. Ülkemizin değişik bölgelerinde *E. histolytica* enfeksiyonlarının sıklığını araştırmak amacıyla yapılan çalışmalar mevcuttur. Çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklı olması, farklı sosyoekonomik bölgelerde yapılması ya da hasta seçimindeki farklılıklar nedeniyle *E. histolytica* enfeksiyonu prevalansı değişik oranlarda bildirilmektedir (39,46).

Ülkemizde farklı hasta gruplarını içeren, retrospektif veya prospektif olarak yapılan çeşitli çalışmalarda, direkt ve/veya kalıcı boyalı mikroskopik inceleme ile *E.histolytica/dispar* sıklığını; İzmir'de Usluca ve ark. %0,24, Kütahya'da Akdemir ve ark. %0,74, İstanbul'da Özyurt ve ark. %0,43, Kocaeli'de Sönmez ve ark. %0,36, Eskişehir'de Doğan ve ark. %1,14, Yozgat'ta Ataş ve ark. %1,6, Kayseri'de Uyar ve ark. %0,6, Sivas'da Değerli ve ark. %2,4, Van'da Bayram ve ark. %6,2, Gaziantep'de Ekşi ve ark. %12,45, Rize Çamlıhemşin'de Özgümüş ve ark. %9,8, Kars'da Özkan ve ark. 2-6 yaş arası çocuklarda %10,1 olarak bildirmişlerdir (53-64). Bizim yaptığımız çalışmada örneklerin %36,3'ünde direkt mikroskopik inceleme ile şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüştür. Bu örneklerin %75,2'sinde trikrom boyama yönteminin uygulanmasıyla *E. histolytica* ve diğer *Entamoeba* türlerinin varlığı dışlanmıştır.

Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı ve özgüllüğü örnek alımının uygunluğuna, örnek sayısına ve incelemeyi yapan kişinin deneyimine göre değişmektedir. Dışkıda lökositler, makrofajlar ve diğer amip türlerinin varlığı yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Haque ve ark. yaptıkları bir çalışmada direkt mikroskopinin duyarlılığını %60, özgüllüğünü %79 olarak bulmuşlardır (65). Mikroskopi ile *E. histolytica*'nın tanımlanmasında ölçüt, dışkı örneğinde eritrositleri fagosite etmiş amip trofozoitlerinin gözlenmesidir. Ancak *E. dispar* trofozoitlerinin de eritrosit fagosite ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca *E. histolytica*'nın etken olarak kanıtlandığı enfeksiyonlarda

dahi eritrosit fagosit eden trofozoit varlığının sanıldığı kadar çok olmadığı görülmüştür (21) (46).

Direkt mikroskopi ile patojen ve patojen olmayan amip türleri birbirlerinden ayırt edilemezken, ELISA testi ile dışkıda *E. histolytica*'ya özgü adezin antijeninin varlığı araştırılabilir. Bursa'da Alver ve ark. gastroenterit klinik bulguları olan 116 hastanın dışkı örneklerine direkt mikroskopi ve *E. histolytica*'ya özgü antijen varlığını gösteren ELISA yöntemini uygulamışlar ve sadece tek örnekte her iki yöntemle pozitiflik saptamışlardır. Direkt mikroskopi ile negatif bulunan örneklerin %29,3'ü ELISA ile pozitif bulunmuş ve hastaların uygun tedavisi planlanmıştır (66).

Yıldırım ve ark. Sivas'ta ishalleri hastalarla yaptıkları çalışmada, bir yıllık sürede, 259 ishalleri hastada *E. histolytica* adezin antijen pozitiflik oranını %25,1 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada, ELISA adezin antijen testi pozitif olan örneklerin sadece %26,1'i direkt mikroskopik inceleme ile pozitif bulunurken, mikroskopik incelemede amip kisti ve/veya trofozoitine rastlanan hastaların %66,2'sinde ELISA antijen testi pozitif, %33,8'inde ise negatif olarak tespit edilmiştir (67).

Malatyalı ve ark. Sivas'ın bazı köylerinde 1499 çocuktan alınan dışkı örneklerinin 22 (%1,5)'sinde nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemi ile kist saptamışlar ancak ELISA ile tüm örnekleri *E. histolytica* 'ya özgü galaktoz adezin varlığı için negatif bulmuşlardır (68).

Mersin'de Delialioğlu ve ark.'ın 272 ishalleri hasta örneği ile yaptıkları çalışmada, trikrom boyama ile 24 (%8,82) örnekte pozitiflik saptanmış, ELISA yöntemi ile *E. histolytica* sensu lato antijen varlığı, örneklerin 29 (%10,6)'unda pozitif olarak bulunmuştur. *E. histolytica* sensu lato antijen pozitif olan 29 örneğin 21 (%7,7)'inde ise *E. histolytica*'ya özgü antijen pozitif olarak bulunmuştur (69).

Tüzemen ve arkadaşlarının Eskişehir'de yaptıkları çalışmada, ishal şikayetiyle başvuran çocuk ve erişkin hastaların dışkı örnekleri ile tarama amacıyla rastgele seçilen ilköğretim okullarındaki öğrencilerden alınan dışkı örneklerinden, tüm yöntemlerin uygulandığı 354 örneğin değerlendirme sonuçlarına göre; örneklerin %23,7'sinde direkt mikroskopi, %17,2'sinde trikrom boyama, %8,7'sinde ELISA ve %2,5'inde PZR ile pozitiflik saptanmıştır.

Araştırmacılar, amibiyazisli hastaların laboratuvar tanısında, yöntemlerin mümkün olabildiğince kombine olarak kullanılması ve klinik bulgular ile birlikte değerlendirilmesinin en uygun yaklaşım olacağı kanısına varmışlardır (70).

Tanyüksel ve arkadaşlarının endemik bölge olan Van ve Şanlıurfa illerinde diyare/dizanteri şikayeti olan 380 hasta ile yaptıkları çalışmada, trikrom boyama ile %24 oranında *E. histolytica/dispar* kist/trofozoit pozitifliği, ELISA ile %13 oranında *E. histolytica* antijen pozitifliği saptanmış ve ishali olan hastalarda *E. histolytica* enfeksiyon sıklığı %13 olarak bildirilmiştir (46).

Zonguldak'ta Mengeloğlu ve ark. direkt mikroskopi ile incelenen 1720 dışkı örneğinin 44'ünde (%0.37) amip kistleri görmüşler ve bu örneklerin 26'sında ELISA yöntemi ile *E. histolytica*'ya özgü antijen varlığını saptamışlardır (71).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, bir grup öğrencide amibiyaz prevalansını belirlemek, enzim immunoassay yöntemi ile *E. histolytica* enfeksiyonu tanısı koymak ve *Entamoeba sp.* enfeksiyonu tanısında tarama testi olarak kullanılan *E. histolytica/dispar* ELISA test kiti ile alınan sonuçları mikroskopik inceleme sonuçları ile karşılaştırmak amacıyla, 6-14 yaş arası 1403 öğrenciye ait dışkı örneği incelenmiştir. Mikroskopi ile %5,7 (80/1403) oranında *E. histolytica/dispar* bulunurken, ELISA ile %15,7 (220/1403) oranında pozitiflik saptanmıştır. Çalışmada, 45 örnekte her iki test ile pozitiflik saptanırken, 35 örnek yalnız direkt mikroskopi, 175 örnek yalnız ELISA ile pozitif olarak bulunmuştur. *E. histolytica*'ya özgü antijen araştırıldığında ise (43/1403) %3,1 oranında *E. histolytica* tespit edilmiştir. Araştırmacılar, kullandıkları *E. histolytica/dispar* ELISA test kitinin tarama testi olarak kullanılmasını önermişlerdir (72).

Haque ve ark. 202 ishali dışkı örneğiyle yaptıkları bir çalışmada referans yöntemi kültür kabul ettiklerinde, *E. histolytica*'ya özgü antijen saptayan ELISA testinin duyarlılığını %95, özgüllüğünü %93 olarak bulmuşlardır (65).

Brezilya'da Campia Grande'de 2 ile 10 yaş arası çocuklardan toplam 1195 dışkı direkt mikroskopi ve ELISA ile incelenmiş, direkt mikroskopi ile örneklerin %46,3'ünde *E. histolytica/dispar* görülürken ELISA ile *E. histolytica*'ya özgü antijen araştırıldığında tamamı negatif bulunmuştur (73)

Çalışmamızda trikrom boyama yöntemi ile şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülen örneklerin tamamı

ELISA testi ile *E. histolytica*'ya özgü adezin antijen varlığı için negatif bulunmuştur.

Antijen tarama yöntemlerinin en önemli dezavantajları fiksatif içermeyen, taze veya donmuş dışkı ile çalışılabilmesi, dışkısında az sayıda trofozoit olan örneklerde yalancı negatif sonuç vermesi, asemptomatik kist taşıyıcılarını saptayamaması, avantajları ise ucuz, basit ve değerlendirmesinin kolay olması, pahalı bir donanım gerektirmemesi, çok sayıda örneğin eş zamanlı çalışılmasına olanak vermesi ve kısa sürede sonuçlanabilmesidir.

E. histolytica'nın saptanmasında ve diğer *entamoeba* türlerinden ayırımında kullanılan PZR gibi nükleik asit amplifikasyon yöntemleri mikroskopik incelemeden daha duyarlı ve özgül, antijen saptama yöntemiyle benzer duyarlılıkta yöntemlerdir. Çalışmamızda trikrom boyama yöntemiyle şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovski* kist ve/veya trofozoiti görülen 49 örnekten 44'ü PZR yöntemiyle negatif bulunmuş, beş örnekte geçersiz test sonucu elde edilmiştir.

Kurt ve ark. İzmir'de şehrin farklı bölgelerinden topladıkları 2047 dışkı örneğinde kültür ve direkt mikroskopi ile %2,9 oranında *E. histolytica/dispar* pozitifliği saptamışlar, PZR ile %0,68 oranında *E. histolytica* ve %1,5 oranında *E. dispar* bulmuşlardır. Çalışmada, bulunan oranın düşüklüğü yüksek yaşam standartlarına ve sanitasyon koşullarının iyi olmasına bağlanmıştır. Araştırmacılar gecekonduda yaşayan, sosyal güvencesi olmayan, dışarıdan göçle gelmiş kişilerde *Entamoeba sp.* prevalansını yüksek, şişe su kullananlarda kullanmayanlara göre daha düşük bulmuşlardır (74).

Dağcı ve ark. *E. histolytica/dispar* kist ya da trofozoiti içeren yedi dışkı örneğinin tamamında PZR ile *E. dispar* tespit etmişlerdir (75).

Güney Etiyopya'da kırsal alanda yapılan bir çalışmada gastrointestinal şikayetleri olan hastalardan alınan 92 dışkı örneğinin direkt mikroskopik incelenmesi ile üç örnekte *E. histolytica/dispar* kist/trofozoiti görülmüş, PZR ile örneklerin ikisinde *E. dispar*, birinde ise *E. histolytica* saptanmıştır (76).

Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde Güney Doğu Asya ülkelerinden Doğu Timor ve Kamboçya'da 680 kişi ile yapılan bir çalışmada, dışkı örneklerinde PZR ile *E. histolytica* saptanmamıştır (77). Belçika'da yapılan bir

çalışmada araştırmacılar, laboratuvarlarında değerlendirilen 631 dışkı örneğinin hiçbirinde PZR ile *E. histolytica* saptanmadığını ve gelişmiş ülkelerde *E. histolytica* enfeksiyonlarının endemik bölgelere seyahat öyküsüyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (78). Nikaraguay'ın ikinci büyük şehri Leon'da yapılan bir çalışmada diyare şikayeti olan 134 kişiden alınan dışkı örneğinde direkt mikroskopik inceleme ile %24 oranında *E.histolytica/dispar* enfeksiyonu tanısı konulurken, PZR ile örneklerin %1,5'inde *E. histolytica*, %7,5'inde *E. dispar* saptanmıştır. PZR ile pozitif bulunan 12 örneğin sadece beşinde mikroskopi ile *E. histolytica/dispar* tanımlanabilmiştir (79).

Mısır'da yapılan bir çalışmada diyaresi olan 396 hasta ile 202 sağlıklı kişiden alınan dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesi ile diyaresi olan hastalara ait 43 örnekte *E. histolytica/dispar* tespit edilmiştir. Çalışmada PZR yöntemi ile diyareli hastalara ait sekiz örnekte *E. dispar* bulunmuş, sağlıklı kontrol grubundan bir kişiye ait örnekte *E. histolytica* tespit edilmiştir. Araştırmacılar dışkı örneklerinin formol etil asetat ile konsantrasyon yöntemi sonrası incelenmesinin *E. histolytica/dispar* kist/trofozoit tespitinde anlamlı fark gösterdiğini ifade etmişlerdir (80).

Batra ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, çalışmamızda kullandığımız BD Max Enterik Parasite Panel PZR testinin performansı değerlendirilmiştir. Çalışmada 275 örneğin 17'sinde mikroskopi ile *E. histolytica/dispar* saptanmış, bu örneklerin ikisi PZR ve referans laboratuvar PZR testi ile de pozitif bulunmuştur. PZR ile negatif bulunan 15 örnekte referans laboratuvar test sonucu negatif bulunmuş ve bu örneklerde *E. dispar* varlığı düşünülmüş ancak doğrulanmamıştır. Çalışmada mikroskopi ile negatif bulunan 258 örnekten 257'si PZR ile de negatif bulunmuş, bir örnekte saptanan PZR pozitifliği referans laboratuvar PZR testi ile de doğrulanmıştır (81) .

Klinik tanıda BD Max Parasite Panel'in değerlendirildiği başka bir çalışmada testin performansı rutin mikroskopi ve laboratuvar tasarımı PZR ile karşılaştırılmıştır. Mikroskopi ile *E. histolytica/dispar* olarak tanımlanan 12 örnekte BD Max Parasite Panel ve laboratuvar tasarımı PZR ile negatif sonuç elde edilmiş, bu örneklerde laboratuvar tasarımı PZR ile *E. dispar* pozitif olarak saptanmıştır (82).

Çalışmamızda, trikrom boyama ile *E. histolytica/dispar/moshkovskii* varlığı açısından şüpheli pozitif olarak yorumlanan ve PZR ile geçerli sonuç elde edilen 44 dışkı örneğinin tamamının PZR ve *E. histolytica*'ya özgü antijen testi ile negatif olarak bulunması, mikroskopik tanı yönteminde *E.histolytica*'nın diğer *Entamoeba* türleriyle, lökositlerle ve makrofajlarla kolaylıkla karışabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda negatif bulunan örnekler *E.dispar* ve *E.moshkovskii* açısından araştırılmamıştır.

Dışkıda *E. histolytica*'ya özgü antijen varlığını araştırdığımız ELISA ve PZR testini çalıştığımız tüm örnekler uygun şekilde ve koşullarda saklanmıştır.

Dışkı örneklerinde PZR inhibitörlerinin bulunma olasılığı yüksek olduğundan, bu durum test sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda dışkı örneklerinde çalışılacak PZR testlerinin amplifikasyon kontrolü içermesi önerilir. Kullandığımız PZR kiti ekstraksiyon basamağından itibaren eklenmiş olan internal kontrol basamağı içerdiğinden, geçerli sonuç elde edilen örneklerde PZR inhibitörü olma olasılığı yoktur. PZR inhibitörü veya sistem hatası nedeniyle geçersiz PZR sonucu elde edilen örneklerde testin tekrar çalışılması önerilmektedir. Ancak çalışmamızda örneklerin üretici firmanın test tekrarı için önerdiği zaman diliminde saklanması mümkün olmadığından tekrar çalışma yapılamamıştır.

Çalışmamızda ishalleri hastalarda *E. histolytica* pozitifliği saptanmamıştır. Bu sonuç Antalya ilinin sanitasyon koşullarının iyi olduğunu ve çalışılan hasta popülasyonunun sosyo-ekonomik-kültürel düzeyinin gelişmiş olabileceğini düşündürmüştür

6.SONUÇLAR

1. Çalışmamızda ishaller hastalarda, dışkı örneklerinde *E. histolytica* araştırılmasında;

a. Direkt mikroskopik inceleme ile örneklerin %36,3'ünde şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüştür.

b. Direkt mikroskopik inceleme ile şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti saptanan örneklerin %75,3'ünde, trikrom boyama yönteminin uygulanması ile *E. histolytica* ve diğer *Entamoeba* türlerinin varlığı dışlanmıştır.

c. Trikrom boyama yöntemi ile şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülen örneklerin tamamında ELISA testi ile *E. histolytica*'ya özgü adezin antijeni negatif bulunmuştur.

e. Trikrom boyama yöntemi ile şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülen 49 örnekten 44'ü PZR yöntemiyle negatif bulunmuş, beş örnekte geçersiz test sonucu elde edilmiştir.

2. Sonuç olarak mikroskopik inceleme *E. histolytica*'nın tanımlanmasında yeterli değildir. Trikrom boyama basamağı direkt mikroskopi ile şüpheli bulunan örneklerin önemli bir kısmını elemekle birlikte tek başına ayırt edici değildir. Bu nedenle sadece mikroskopik inceleme ile sonuç verilmesi hatalı tanıya ve gereksiz tedaviye neden olacaktır.

3. Mikroskopik inceleme ile *E. histolytica/dispar/moshkovskii* saptanan dışkı örneklerinde *E. histolytica*'ya özgü antijen aranması veya PZR gibi daha özgül bir yöntem kullanılmalıdır.

4. PZR ve *E. histolytica*'ya özgü antijen saptanması benzer duyarlılıkta ve mikroskopik incelemeden daha duyarlı ve özgül yöntemlerdir. PZR yönteminin spesifik antijen testine göre pahalı olması dezavantaj iken, örneklerin biriktirilmeden çalışılabilmesi ve hızlı sonuç vermesi avantaj oluşturmaktadır.

5. Her laboratuvar *E. histolytica*'nın doğru tanımlanması ve rapor edilmesi için koşullarına uygun, maliyet etkin tanı algoritması oluşturmalıdır.

6. Mikroskopi, spesifik antijen testi ve moleküler yöntemlerin birlikte kullanıldığı çalışmamızda, hasta popülasyonumuzda *E. histolytica* saptanmamıştır.



7.ÖZET

İSHALLİ HASTALARDA *ENTAMOEBİA HISTOLYTICA* 'NİN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Entamoeba histolytica'nın neden olduğu amibiyaz tüm dünyada paraziter enfeksiyona bağlı üçüncü ölüm nedenidir. İnvaziv amibiyaz tanısında yaygın kullanılan tanı yöntemi direkt ve boyalı mikroskopik bakıdır. *E.histolytica*'ya benzer morfolojide olup, patojen olmayan *Entamoeba* türlerinin varlığı anlaşılınca, dışkıda *E. histolytica*'ya özgü antijen varlığını araştıran ELISA ve PZR gibi yöntemler tanıda kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışma ile, ishal şikayeti ile başvuran ve intestinal amibiyaz ön/ayırıcı tanısı için *E. histolytica* araştırılması istenen hastaların dışkı örneklerinde, direkt ve boyalı mikroskopik inceleme, dışkıda *E. histolytica*'ya özgü adezin antijeni saptanmasına yönelik ELISA testi ve PZR testinin çalışılması ve bu testlerin tanı değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 546 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. Direkt mikroskopik inceleme ile örneklerin %36,3'ünde şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüştür. Bu örneklerle trikrom boyama yapılmış ve 49 örnek *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti varlığı açısından şüpheli bulunmuştur. Trikrom boyama ile şüpheli bulunan örneklerde PZR ve ELISA testleri çalışılmıştır. ELISA yöntemi ile örneklerin hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. PZR yöntemiyle 49 örnekten 44'ü negatif bulunmuş, beş örnekte geçersiz test sonucu elde edilmiştir. Sonuç olarak amibiyaz tanısında *E. histolytica*'ya özgü antijen aranması veya PZR gibi daha özgül bir yöntem kullanılmalıdır. Sadece mikroskopik inceleme ile sonuç verilmesi, hatalı tanıya ve gereksiz tedaviye neden olacaktır.

Anahtar kelimeler: Amibiyaz, *E.histolytica*, ELISA, PZR

8.ABSTRACT

COMPARISON OF THE METHODS FOR THE DETECTION OF *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* IN DIARRHEAL PATIENTS

Amebiasis caused by *Entamoeba histolytica* is the third most common cause of death from parasitic infections worldwide. Direct and stained microscopic examination is widely used in the diagnosis of invasive amebiasis. But then, it is realised that there are nonpathogen *Entamoeba* species in a similar morphological structure with *E. histolytica*. Therefore stool specific antigen detection based ELISA and PCR methods have been used to introduce. We aimed to study direct and stained microscopic examination, stool specific antigen detection based ELISA and PCR test in patients' stool samples who applied with the clinical signs of amebiasis and compare the diagnostic values of the tests. A total of 546 stool samples were included in the study. %36,3 of stool samples were suspected the presence of *E. histolytica/dispar/moshkovskii* cysts and/or trophozoites by direct microscopic examination. These samples were stained with trichrome and 49 stool samples were suspected the presence of *E. histolytica/dispar/moshkovskii* cysts and/or trophozoites. These samples were tested for pathogenic strain by ELISA and PCR. None of these samples were positive by ELISA. Fortyfour samples were negatif by PCR. Invalid test results were obtained in five samples. As a result, a more specific method such as specific *E. histolytica* antigen detection test or PCR should be used in the diagnosis of amebiasis. Just be with microscopic examination results, it will lead to misdiagnosis and unnecessary treatment.

Key words: Amebiasis, *E. histolytica*, ELISA, PCR

9. KAYNAKLAR

1. Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L. Seroepidemiology of Amebiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg 1994; 50(4):412-419.
2. Haque R, Ali IKM, Akter S, WA Petri JR. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection of diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36(2):449-452.
3. Ravdin, J. I. *Entamoeba histolytica* (amebiasis),. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, Inc.; 2000 p.2798–2810.
4. Ackers, J.P. The diagnostic implications of the separation of *E. histolytica* and *E. dispar*. J. Biosciences. 2002; 27(3):573-578.
5. Altıntaş K. Genel parazitoloji. Ed: Altıntaş K, Tıbbi Parazitoloji. İstanbul: MN Medical & Nobel Tıp kitapçıları; 2002.p.1-49.
6. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. İzmir: Dizgi Baskı Es-Form Ltd.; 2009.
7. Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5.Baskı. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları; 1995.
8. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre Enfeksiyonlar. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2008. p.2557-2570.
9. <http://www.atlas-protozoa.com/Entamoebamoshkovskii.php>.
10. Çetin E.T, Anđ Ö, Töreci K. Tıbbi Paazitoloji. 4. Baskı. İstanbul: Yayın NO:15 Bayda Basın Yayın Dağıtım; 1985.p.50-67.
11. Ak M. Tanyüksel M. Dağcı H. Amebiasis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (eds). Özcelin Tıbbi Parazitik Hastalıkları. 1. Baskı. Bornova-İzmir: Meta Basım; 2007.p.279-307.

12. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Markell and Voges Medical Parasitology. 8th ed. W.B. Saunders Company; 1999.p.24-56.
13. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2. Baskı. Sivas: Es-Form Ofset Ltd.Şti.; 2002.p.34-43.
14. Yaşarol Ş. Medikal Parazitoloji. 2. Baskı. Bornova: Ege Üniversitesi Tıp Fak.Yay. No:93; 1984p.115-42.
15. Wiser MF. *Entamoeba* and Amebiasis. Protozoa and Human Disease. 2010.p.31-46.
16. Lohia A The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. Molecular and cellular biochemistry 2003; 253:217-22.
17. Gatti S, Petithory JC, Ardoin F, ve ark. Asymptomatic amoebic infection:*Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar*? That is the question. Bull Soc Pathol Exot 2001; 94:304-7.
18. Washington C. Winn, Elmer W. Koneman. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th edition. 2006.p.1258.
19. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. Medical Microbiology, Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.p.847-860.
20. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. N Engl J Med 2003; 17:348(16):1565-73.
21. Tanyüksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(4):713-29. Review.
22. Petri WA Jr, Haque R, Mnn BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annu Rev Microbiol 2002; 56:39-64.
23. Lauwaet T, Oliveira MJ, De Bruyne G. *Entamoeba histolytica* trophozoites transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers. Int. J. Parasitol 2004; 34(5):549-556.

24. Macfarlane RC, Singh U. Identification of an *Entamoeba histolytica* serine, threonine and isoleucine rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity. Eukaryot. Cell 2007; 6(11):2139-2146.
25. Ravdin JI, Guerrant RL. The role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J Clin Invest 1981; 68:1305-13.
26. Li E, Becker A, Stanley SL. Use of Chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesions. J Exp Med 1988; 167:1725-30.
27. Lejeune M, Rybicka J.M., Chadee K. Recent Discoveries in the Pathogenesis and Immune Response Toward *Entamoeba Histolytica*. Future Microbiology 2009; 4(1):105-118.
28. Petri WA Jr, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. Clin Infect Dis 1999; 29:1117-25.
29. Garcia LS and DA Bruckner. Diagnostic medical parasitology, 3rd ed. Washington D.C: ASM Press; 1997.
30. Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD, ve ark. Epidemiologic and clinical characteristic of acute diarrhea with emphasis on *E. histolytica* infections in preschoolchildren in urban slum of Dhaka, Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 2003; 69:398-405.
31. Gathiram V, Jackson TF. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *E. histolytica*. South Afr Med J 1987; 72:669-72.
32. Amoebiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. 1969; 421:1-52.
33. Haque R, Mondal D, Duggal P, ve ark. *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. Infect Immun 2006; 74:904-9.
34. Haque R, Mondal D, Karim A, ve ark. Association of common enteric protozoan parasites with severe diarrhea in Bangladesh: a prospective case-control study. Clin Infect Dis 2009; 48:1191-7.

35. Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complication. *Medicine* 1977; 56:315-23.
36. Juniper K: Parasitic diseases of the intestinal tract. In: Paulson M (ed.) *Gastroenterologic Medicine*, Philadelphia:Lea&Febiger; 1969.p.172.
37. Gorbach S.L., Bartlett J.B., Blacklow N.R. *Infectious Diseases*, Lippincott Williams and Wilkins 2004; 2276-2281.
38. John D.T., Petri WA Jr. Markell and Voge's Medical Parasitology. 9th ed. Missouri: Saunders Elsevier; 2006.p.22-48.
39. Ximenez C, Moran P, Rojas L, Vladez A, Gomez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis. State of the art. *Infect Genet Evol* 2009; 9:1023-32.
40. Ali IKM, Clark CG, Petri JR WA. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol* 2008; 8:698-707.
41. Tengku SA, Norhayati M. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: A review. *Trop Biomed* 2011; 28:194-222.
42. Delialioğlu N, Aslan G, Sözen M, Babür C, Kanik A, Emekdas G. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:769-772.
43. Delialioğlu N, Aslan G, Öztürk C, Bayer M, Emekdaş G. Mersin ilinde ilkokul çocuklarında *Entamoeba histolytica* antikorlarının araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2004; 28:185-8.
44. Ak M, Keles E, Karacasu F ve ark. The distribution of the intestinal parasitic diseases in the Southeast Anatolian (GAP=SEAP) region of Turkey. *Parasitol Res* 2006; 99:146-52.
45. 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 Parazitol Derg.* 2006; 30:95-98.
46. Tanyuksel M, Yilmaz H, Ulukanligil M, Araz E, Cicek M, Kuru O, Tas Z, Petri WA Jr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked

immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. Exp Parasitol. 2005; 110: 322-326.

47. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev 2007; 20:511-32.

48. Kaplan RL. Microscopic examination of fecal specimens: Permanent stained smear (Trichrome). In: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 7.3.6.1.

49. Haque R, Petri WA. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. Arch Med Res 2006; 37:273-6.

50. Anonymous. WHO/PAHO/UNESCO, Report of a consultation of experts on amebiasis. Weekly Epidemiology Record 1997; 72:97-99.

51. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/dx.html>.

52. Clark, C. G. and L. S. Diamond. Methods for cultivation of luminal parasitic protests of clinical importance. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15:329–341.

53. Usluca S, İnceboz T, Över L, Tuncay S, Yalçın G. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2005-2008 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2010; 34: 27-31.

54. Akdemir C, Helvacı R. Kütahya'da parazitoloji laboratuvar sonuçlarının 15 ve üzeri yaş grubunda değerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007; 31:129-132.

55. Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardıç N. Bir Eğitim Hastanesi Koproloji Laboratuvarı'nda geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007; 31:306-308.

56. Sönmez Tamer G, Çalışkan Ş, Willke A. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloji dergisi 2008; 32:126-129.

57. Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'nin beş yıllık bağırsak parazit prevalansının türlere ve cinsiyetlere göre dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32:120-125.
58. Ataş AD, Alim A, Ataş M, Oğuzkaya Artan M. Yozgat il merkezinde farklı sosyo-ekonomik bölgelerdeki iki ilköğretim okulunda bağırsak parazitlerinin araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32:261-265.
59. Uyar Y, Yürük M, Erdoğan E, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na 2011-2013 yılları arasında başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Turk Hij Den Biyol Derg. 2014; 71(3): 125-30.
60. Değerli S, Öçelik S, Çeliksöz A. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2005; 29:116-119.
61. Bayram Y, Parlak M, Çıkman A. Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Giardia intestinalis ve Entamoeba histolytica/dispar prevalansı:Dört yıllık izlem. Dicle Tıp Dergisi 2013; 40:40-44.
62. Ekşi F, Doğan Y, Özdemir G, Zer Y, Bayram A, Karslıgil T. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde bir yıllık sürede gaita örneklerinde saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Fırat Tıp Dergisi 2013; 18(4):235-238.
63. Özgümüş OB, Efe Ü. Çamlıhemşin Sağlık Merkezi'nde temmuz 2005 – ocak 2007 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007; 31(2):142-144.
64. Arslan MÖ, Sarı B, Kulu B, Mor N. Kars Doğum ve Çocuk Bakımevi Hastanesi'ne gastrointestinal yakınmalarla başvuran çocuklarda bağırsak parazitlerinin yaygınlığı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32(3):253-256.
65. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri JWA. Rapid diagnosis of Entamoeba infection by using Entamoeba and Entamoeba histolytica stool antigen detection kits. J Clin Microbiol 1995; 33:2558–2561.

66. Alver O, Topaç T, Töre O. *Entamoeba histolytica* tanısında iki metodun (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Nativ-Lugol) değerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloj Derg 2015; 39:185-9.
67. Yıldırım D, Hasbek M, Nur N. İshalli hastalarda bağırsak amebiyazının adezin antijen testi ve direkt mikroskopi ile incelenmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2014; 38:155-8.
68. Malatyalı E, Özçelik S, Çeliksöz A. The investigation of *Entamoeba histolytica* prevalence in some villages of Sivas by ELISA method. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2011; 35:6-9.
69. Delialioğlu N, Aslan G, Öztük C, Özturhan H, Şen S, Emakdaş G. Detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples in Mersin,TURKEY. J. Parasitol 2008; 94(2):530-532.
70. Tüzemen NÜ, Doğan N. *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1):114-122.
71. Mengeloğlu FZ, Aktaş E, Külah C, Beğendik Cömer F. Dışkı örneklerinde ELISA yöntemi ile *Entamoeba histolytica*'nın saptanması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2009; 33(1):1-3.
72. Pereira VV, Conceição Ada S, Maximiano LH, Belligoli Lde Q, Silva ES. Laboratory diagnosis of amebiasis in a sample of students from southeastern Brazil and a comparison of. for screening of infections with *Entamoeba sp.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2014; 47(1):52-56.
73. Silva MT, Santana JV, Bragagnoli G, Marinho AM, Malagueño E. Prevalence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in the city of Campina Grande, in northeastern Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2014; 56(5):451-454.
74. Kurt Ö, Demirel M, Ostan İ, Sevil NR, Mandiracioglu 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 Microbiologica 2008; 31:393-400.

75. Dağcı H, Erdoğan DD, Özensoy Toz S, Kurt Ö, Üstün Ş, Akarca U. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR: a preliminary study in Izmir, Turkey. *New. Microbiol.* 2007; 30(1):45-48.
76. Flecha MJ, Benavides CM, Tissiano G, Tesfamariam A, Cuadros J, ve ark. Detection and molecular characterisation of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba* spp. among patients with gastrointestinal symptoms in Gambo Hospital Oromia Region, southern Ethiopia. *Tropical Medicine and International Health* 2015; 20(9):1213–1222.
77. Llewellyn S, Inpankaew T, Vaz Nery S, Gray DJ, Verweij JJ, Clements ACA, Gomes SJ, Traub R, McCarthy JS. Application of a multiplex quantitative PCR to assess prevalence and intensity of intestinal parasite infections in a controlled clinical trial. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016; 28,doi: 10.1371/journal.pntd.0004380.
78. Van Lint P, Rossen JW, Vermeiren S, Ver Elst K, Weekx S, Van Schaeren J, Jeurissen A. Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in clinical stool samples by using multiplex real-time PCR after automated DNA isolation. *Acta Clinica Belgica* 2014; 68(3):188-192.
79. Leiva B, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Elsevier* 2006; 37:529–534.
80. Nazeer JT, Khalifa ES, Thien H, El-Sibaei MM, Abdel-Hamid MY, Tawfik RAS, Tannich E. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol Res.* 2013; 112:595–601.
81. Batra R, Judd E, Eling J, Newsholme W, Goldenberg SD. Molecular detection of common intestinal parasites: a performance evaluation of the BD Max™ Enteric Parasite Panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; doi: 10.1007/s10096-016-2722-9.
82. Mölling P, Nilsson P, Ennefors T et al. Evaluation of the BD max enteric parasite panel for clinical diagnostics. *J Clin Microbiol* 2016; 54:443–4.