

Şanlıurfa'da Parazit Faunası ve ELISA Yöntemi ile Dışkıda *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* Sıklığı

Fadile YILDIZ ZEYREK¹, Hatice ÖZBİLGE¹, M. Fehmi YÜKSEL¹,
C. Dost ZEYREK², Fatma SIRMATEL³

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ²Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,
³Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

ÖZET : Amebiasis, gelişmekte olan ülkeler için halen önemli bir sağlık sorunudur. İnsanlar *Entamoeba*'nın amebik kolit ve karaciğer absesine neden olan *E.histolytica* ve nonpatojen *E.dispar* olmak üzere morfolojik olarak ayırt edilemeyen iki türü tarafından enfekte olmaktadır. Çalışmamızda laboratuvarımıza başvuran hastaların dışkılarında ELISA yöntemiyle *E.histolytica*/*E.dispar* antijeni araştırmak amaçlanmıştır. Toplam 1600 dışkı nativ-lugol ve çoklaştırma yöntemlerinden modifiye Ritchie metodu ile incelenmiştir. Toplam 583 (%36,4) kişide bir veya birden fazla parazit bulunurken, parazit görülen kişilerin %3,8 (22/583)'inde iki parazit, bir kişide (%0,2) de üç parazit birlikte görülmüştür. En sık görülen parazit *Ascaris lumbricoides* (%18,4) olmuştur. Nativ-lugol ile şüpheli bulunan 87 dışkıya *E.histolytica* spesifik sensu-lato antijen tespitine dayalı mikro ELISA ve trikrom boyama yöntemleri uygulanmıştır. 87 dışkının 19'un da (%21,7) ELISA ile 23'ünde (%26,4) mikroskopi ile *E.histolytica*/*E.dispar* pozitif saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda hastaların yanlış tanı ve bunun sonucunda gereksiz tedavi almalarının önlenmesi açısından tanıda diğer spesifik testlerle kıyaslandığında ucuz ve deneyimli personel gerektirmeyen ELISA yönteminin kullanılmasının doğru olacağı düşünülmüştür

Anahtar Sözcükler: *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, ELISA, mikroskopi, tanı, antijen tespiti

Parasitic Fauna and the Frequency of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* Detected by ELISA in Stool Samples in Sanliurfa, Turkey

SUMMARY: Amoebiasis is a significant health problem in developing countries. Humans are infected by two morphologically identical species of *Entamoeba*. *Entamoeba histolytica* causes amebic colitis and liver abscess, and *Entamoeba dispar* is noninvasive. The aim of this study was to determine the prevalence of the *E. histolytica*/*E. dispar* complex using the ELISA method on stools of patients. A total of 1600 stool specimens were examined using Lugol preparations and the modified Ritchie method. A total of 583 (36.4%) of the stool specimens were found to be positive for one or more than one parasite. Twenty two subjects (3.8%) of the study population with intestinal parasites harbored two parasites and one subject (0.2%), three parasites. A total of 87 stool specimens that were doubtful using the Lugol method were examined by the *E. histolytica* specific sensu-lato antigen based ELISA test and the trichrome staining method. Of these 87 specimens, 23 (26.4%) specimens were positive for *E. histolytica*/*E. dispar* trophozoites/cysts microscopically using trichrome staining and 19 (21.7%) of the stool specimens were found to be positive for the *E. histolytica*/*E. dispar* complex by the ELISA test.

Key Words: *E. histolytica*/*E. dispar*, ELISA, microscopy, diagnosis, antigen

GİRİŞ

Her yıl 500 milyon insanın amebiasis'e yakalandığı bilinmektedir. Ancak bunların sadece %10'u semptomatik seyretmektedir (13, 14). Amebiasis gelişmekte olan ülkeler için halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. İnsanlar *Entamoeba*'nın amebik kolit ve karaciğer absesine neden olan

E.histolytica ve nonpatojen *E.dispar* olmak üzere morfolojik olarak ayırt edilemeyen iki türü tarafından enfekte olmaktadır. *E. histolytica* ve *E.dispar* ayırımının yapılması dışkının mikroskobik incelenmesi ile mümkün olmamaktadır (6).

WHO son zamanlarda gelişmekte olan ülkelere uygun teknikler kullanarak *E. histolytica*'nın spesifik tanısını yapmalarını önermektedir (14). *E.histolytica* ve *E.dispar* için en güvenli ayırt edici tanı spesifik antijenlerin değişik yöntemlerle gösterilmesidir. Günümüzde ayırım için dışkıda spesifik antijen arama yöntemleri spesifikite ve sensitivite yönünden oldukça

kabul görmektedir. Mikroskopik inceleme, *E.dispar* ve *E.histolytica* ayırımı yapmadığı gibi fekal lökosit, makrofaj ve diğer amiplerle ayırımının zor olması nedeniyle yanlış pozitif sonuçların verilmesine yol açmaktadır.

Hem klinisyenlerin hemde laboratuvar sorumlularının amebiasis tanısını zamanında ve doğru olarak yapması, tedavinin düzenlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada laboratuvarımıza başvuran kişilerde ELISA metodu kullanılarak *E.histolytica/E.dispar* sıklığını belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2003- Haziran 2004 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin tetkik amacıyla başvuran hastalardan elde edilen toplam 1600 dışkı incelenmiştir. Her dışkıya labotatuvara ilk geldiğinde nativ-lugol ve çoklaştırma yöntemlerinden modifiye Ritchie metodu uygulanmıştır. Direk bakı (nativ-lugol) ile şüpheli bulunan toplam 100 dışkı örneği trikrom boyama için preparatlar hazırlandıktan hemen sonra bekletilmeden, herhangi bir fiksatif içine konulmadan -80 °C'de ELISA çalışılncaya kadar saklanmıştır. Diare, kanlı ve/veya mukuslu dışkısı olan yada klinik olarak amebiasis olduğu düşünülen hastalar şüpheli olarak kabul edilmiştir. Seçilen hastaların en az 3 hafta öncesinden tedavi almamış olmasına dikkat edilmiştir. Şüpheli bulunan bu dışkılar için hastalara herhangi bir anket uygulanmamış, klinik bulguları sorgulanmamıştır.

Çalışmanın başında planlanan 100 dışkı örneğine ulaşıldığında dışkı toplama işlemi sonlandırılmış ve tüm dışkılar toplu olarak çalışılmıştır. Daha sonra bu 100 dışkı örneğinin 13 tanesi uygun materyal olmaması nedeniyle (az materyal) çalışma dışı bırakılmış, 87'sine *E.histolytica* sensu lato antijenine karşı monoklonal antikor ile mikro ELISA yöntemi uygulanmıştır. *E.histolytica* sensu lato antijeni patojenik *E.histolytica* sensu stricto ve nonpatojen *E.dispar*'dan oluşmaktadır. Bunun için ticari olarak bulunan ELISA kiti (Ridascreen® Entamoeba; R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır. Bu test dışkıda *E.histolytica/E.dispar* in vitro kalitatif tanısı için kullanılmaktadır. ELISA testi firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

Test kısaca şu şekilde yapılmıştır: Yüzeyleri *E.histolytica* sensu lato antijenine karşı oluşan monoklonal antikor ile kaplanmış olan kuyucuklara, sample diluent buffer ile 1/11 oranında dilüe edilmiş dışkı örnekleri ve kontroller konmuştur. Yabanturbo peroksidadına karşı konjuge edilmiş ikinci bir monoklonal antikor eklenmiş ve oda ısında bekletilmiştir. İnkübasyon Entamoeba antijeninin katı faz ve enzim bağlı antikorlar arasında sandwich olmasıyla sonuçlanmıştır. Kuyulara substrat (üre peroksid) ve kromojen (TMB) ilave edilmiş ve oda ısında inkübasyondan sonra stop solüsyonu eklenmesiyle spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Renk yoğunluğu antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

İstatistiksel yöntemlerde chi-square (X^2) testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışma süresi boyunca %52,6 (842) erkek, %47,4 (758) kadın olmak üzere toplam 1600 dışkı incelendi. Yaşları ortalama 23,8± 18,9 (6 ay-86 yaş) arasında idi. Çalışma grubundaki kadın ve erkeklerin yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p<0.05$).

Toplam 583 (%36,4) kişide bir veya birden fazla parazit bulundu. Parazit görülen kişilerin %3,8 (22/583)'inde iki parazit, bir kişide (%0,2) de üç parazit birlikte görüldü. En sık görülen parazit *Ascaris lumbricoides* idi. Saptanan diğer parazitler Tablo 1'de verilmiştir. Direk bakı ile (nativ-lugol) şüpheli bulunan 87 dışkının 19'un da (%21,7) ELISA metodu ile *E.histolytica/E.dispar* spesifik antijen pozitif, 23'ünde (%26,4) trikrom boyama yöntemiyle *E.histolytica/dispar* kompleksi pozitif saptandı. Tablo 2'de pozitif saptanan hastaların yaşları ve makroskopik olarak dışkı özellikleri verilmiştir. *E.histolytica/E.dispar* pozitif hastaların yaş cinsler arasındaki dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p<0.05$).

Tablo 1. Mikroskopi ile saptanan parazitlerin dağılımı

Parazit Adı	Sayı	%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	294	18.4
<i>Giardia intestinalis</i>	147	9.2
<i>Entamoeba histolytica/dispar*</i>	23	1.4
<i>Entamoeba coli</i>	62	3.9
<i>Chilomastix mesnili</i>	20	1.2
<i>Taenia saginata</i>	2	0.1
<i>Hymenolepis nana</i>	91	5.7
<i>Trichuris trichura</i>	12	0.7
<i>Blastocystis hominis</i>	22	1.4
<i>Iodamoeba butschlii</i>	11	0.7
<i>Endolimax nana</i>	3	0.2

*Trikrom boyama sonuçları

Tablo 2. *E.histolytica/E.dispar* saptanan hastaların yaş ve dışkılarının makroskopik özellikleri

Yaş	ELISA pozitif n=19 (%)	Trikrom pozitif n=23 (%)
0-12	6 (32)	8 (35)
13-25	9 (47)	9 (39)
26+	4 (21)	6 (26)
Diare	16 (84)	20 (87)
Kanlı diare	3 (16)	2 (9)

TARTIŞMA

E.histolytica enfeksiyonu dünyada tropikal ve subtropikal birçok bölgede özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık problemidir. Her yıl 100 binin üzerinde kişinin ölümün-

den sorumludur (10). WHO 1997 yılında *E.histolytica* ve *E.dispar*'ın morfolojik olarak benzer olduğu ve bu nedenle ışık mikroskobu ile ayırımının imkânsız olduğunu bildirmiştir. Bunların *E.histolytica/E.dispar* olarak rapor edilmeleri ve asemptomatik vakaların tedavi edilmemeleri ve ancak kesin *E.histolytica* tanısı konulan vakaların tedavi edilmeleri gerektiğini bildirmiştir. *E.histolytica*'nın dışkıda tespiti için izoenzim analizi, antijen aranması, spesifik DNA probu ile hibridizasyon ve PCR gibi spesifik testler mevcuttur (1, 4). Haque ve ark antijen tespitine dayanan testlerin mikroskobiden daha sensitif ve spesifik olduğunu bildirmişlerdir (4).

Ankara da yapılan bir çalışmada 142 mental retarde kişide mikroskobi ile %13,3, ayrıca 77 dışkıda ise %9,1 oranında *E.histolytica/E.dispar* kist ya da trofozoiti bulunmuştur. Aynı örnekler ELISA ile tarandığında sırasıyla %19 ve %20,7 oranında pozitiflik bulmuşlardır (7). Mersinde 88 dışkı örneği ile yapılan bir çalışmada mikroskobi ile %20,4, ELISA ile %29,5 *E.histolytica/E.dispar* antijen pozitifliği bulmuşlardır (3). Yine Ankara'dan Tanyüksel ve ark (12) yaptığı bir çalışmada mikroskobi ile %24 kist/trofozoit, *E.histolytica* spesifik antijen tespitine dayalı ELISA ile 380 örneğin %13'ünde pozitiflik saptanmıştır.

Entamoeba'nın iki türünün ayırımının yapılmadığı birçok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Fakat son zamanlarda bu çalışmaların gerçek *E.histolytica* sıklığını saptamakta ne kadar geçerli olduğu sorusu önem kazanmıştır. Dünyada *E.histolytica* sıklığının yaklaşık %10 olduğu ama %50 ya da %80'lere çıktığı yerlerin de bulunduğu bilinmektedir (11). Ülkemizde yapılan çalışmalarda *E.histolytica* sıklığı %0-17 arasında bulunmuştur (9). Daha önce Şanlıurfa'da mikroskobi ile %2,5-13 oranlarında *E.histolytica* sıklığı bildirilmiştir (16, 17, 18). Bu çalışmada mikroskobi ile %1,4 (23/1600), ELISA yöntemiyle %1,2 (19/1600) *E.histolytica/E.dispar* sıklığı bulunmuştur.

Bilinmektedir ki fekal lökositler *E.histolytica* ile çok fazla karıştırılmakta ve yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (12). Bir çalışmada *E.histolytica/E.dispar* kompleksini tespit etmede mikroskobinin spesifitesini *Entamoeba* test ve ProSpect EIA ile karşılaştırdıklarında sadece %9,5 olarak bulmuşlar (8). Konvansiyonel mikroskobinin çok düşük sensitivitesine bağlı olarak dezavantajları olduğu tecrübeli ellerde bile yanlış tanı konulabildiği bildirilmiştir (12).

Bizim tecrübelerimiz de deneyimsiz (hatta bazen deneyimli) kişilerce yapılan mikroskobi (fekal lökositler, makrofajlar, polenler ve diğer barsak parazitlerin *E.histolytica* ile çok kolaylıkla karıştırılabilmekte) sonucunda verilen yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle birçok kişinin gereksiz tedavi aldığı yönündedir. Bu çalışmada da görüldüğü gibi mikroskobi ile 23 *E.histolytica* tanısı alan kişinin 19'u ELISA ile *E.histolytica/E.dispar* olarak tespit edilmiştir. Dünyada *Entamoeba* enfeksiyonlarının %90'ının *E.dispar*'dan kaynak-

landığı düşünüldüğünde, ancak gerçek *E.histolytica* prevalansının *E.histolytica* spesifik bir test uygulandığında, ortaya çıkması mümkündür.

Mikroskobi nonpatojen *E.dispar*'dan patojen *E.histolytica* ayrımı için duyarlı ve yeterli değildir. Ayrıca yanlış pozitif ve negatif sonuç verebilmektedir. Bu yüzden WHO, the Pan American Health Organization ve UNESCO *E.histolytica* spesifik olarak tanıya edilmelidir ortak kararına varmışlardır (14).

Bu çalışmada ELISA ile dışkıda *E.histolytica* sensu lato antijeninin tespitine dayalı bir test kullanılmıştır. Bu test çok sayıda örnekle epidemiyolojik çalışmalarda kolay kullanıma sahip, hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (5).

Mısır'da yapılan bir çalışmada dışkıda *E.histolytica* sensu lato antijenini tespit eden monoklonal ELISA kullanılmış ve toplumda *E.dispar*'ın daha yaygın ve bu antijenin *E.dispar* ile *E.histolytica* ayrımında duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (15). Brezilya'da yapılan bir başka çalışmada %25,4 olarak bulunan *E.histolytica/E.dispar* prevalansı, dışkıda *E.histolytica* antijeni ELISA ile bakılmış ve %15 olarak bulunmuştur (2). Haque ve ark. antijen tespitine yönelik test ve mikroskobiyi kültürle karşılaştırdıklarında sırasıyla %94, %37 duyarlılık bulmuşlardır (5).

Sonuç olarak Şanlıurfa ilinde gastroenterit olgularında *E.histolytica/E.dispar* enfeksiyonunun düşünüldüğü kadar sık olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda hastaların yanlış tanı ve bunun sonucunda gereksiz tedavi almalarının önlenmesi için; her laboratuarda subjektif olan mikroskobi metodunun yanında objektif değerlendirmeyi sağlayacak ucuz, hızlı, basit ve herhangi bir ekipman ve deneyimli personel gerektirmeyen antijen tespitine dayalı ELISA testinin kullanılmasının doğru olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Ackers JP, 2002. The diagnostic implications of the separation of *E.histolytica* and *E.dispar*. *J Biosec* (Supl. 3), 27: 573-578.
2. Braga LL, Gomes ML, Silva MW, Paiva C, Sales A, Mann BJ, 2001. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34: 467-471.
3. Delialioğlu N, Aslan G, Sözen M, Babür C, Kanık A, Emekdaş G, 2004. Detection of *Entamoeba histolytica/E.dispar* in stool specimens by using ELISA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 769-772.
4. Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri JWA, 1998. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*, 36: 449-452.
5. Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lyerly DM, Petri JWA, 1997. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis*, 175: 734-736.

6. **Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri JWA**, 1995. Rapid Diagnosis of Entamoeba Infection by Using Entamoeba and *Entamoeba histolytica* Stool Antigen Detection Kits. *J Clin Microbiol*, 33: 2558-2561.
7. **Nar S, Akbaş E, Esen B**, 2003. Dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar* ın araştırılmasında direkt mikroskopi ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırılması. *Flora*, 8: 213-220, 2003.
8. **Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, McPherson DW, Kain KC**, 1999. *E.histolytica* and *E.dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis*, 29: 1315-1318.
9. **Saygı G**, 1998. *Temel Tıbbi Parazitoloji*. Esnaf Ofset Matbaası, Sivas.
10. **Tannich E, Burchard GD**, 1991. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol*, 29: 250-255.
11. **Tanyüksel M, Petri JWA**, 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16: 713-729.
12. **Tanyüksel M, Yılmaz H, Ulukanlıgil M, Araz E, Çiçek M, Koru O, Taş Z, Petri WA**, 2005. Comparison of two methods (microscopy and ELISA) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol*, 110: 322-326.
13. **Walsh JA**, 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*, 8:228-238.
14. World Health Organization Amoebiasis W.H.O. 1997. *Weekly Epidemiol. Rec*, 72: 97-100.
15. **Zaki NR, Ibrahim SA, Atef SM, Omar HM**, 2001. Evaluation of laboratory techniques for differentiation between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Egypt Soc Parasitol*, 31: 335-344.
16. **Zeyrek FY, Özbilge H, Zeyrek CD**, 2003. Şanlıurfa Çocuk Yuvası Ve Yetiştirme Yurdunda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *T Parazitol Derg*, 27: 133-135.
17. **Zeyrek FY, Özbilge H, Zeyrek CD, Taşçı S**, 2002. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Başvuran Hastalarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. *T Parazitol Derg*, 26: 278-281.
18. **Zeyrek FY, Zeyrek CD, Özbilge H, Mızraklı AU**, 2003. Şanlıurfa'da İlköğretim Çocuklarında Barsak Parazitlerinin Dağılımını Etkileyen Faktörler Ve Büyümeye Etkisi. *T Parazitol Derg*, 27: 203-206.