

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

***ENTAMOEBİA HISTOLYTICA* TANISINDA REAL-TIME  
PCR YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

Uz. Bio. Hanifi AKTAŞ  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

ADANA-2012

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

***ENTAMOEBİA HISTOLYTICA* TANISINDA REAL-TIME  
PCR YÖNTEMİNİN KULLANILMASI**

Uz. Bio. Hanifi AKTAŞ  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TF.2009.D.11 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez No: TF.2009.D.11

ADANA-2012

## KABUL VE ONAY FORMU

### Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “*Entamoeba histolytica*’nın Tanısında Real-Time PCR Yönteminin Kullanılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 04 / 2012

#### İmza

Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

Çukurova Üniversitesi

Jüri Başkanı

#### İmza

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

Çukurova Üniversitesi

Jüri Üyesi

#### İmza

Prof. Dr. Mehmet Macit İLKİT

Çukurova Üniversitesi

Jüri Üyesi

#### İmza

Prof. Dr. Süleyman YAZAR

Erciyes Üniversitesi

Jüri Üyesi

#### İmza

Doç. Dr. Derya ALABAZ

Çukurova Üniversitesi

Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ'a teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Uzm. Bio. Fadime EROĞLU'na teşekkür ederim.

Örneklerin toplamasında bana yardımcı olan ve doktora eğitimim boyunca beni destekleyen Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu uzun eğitimim boyunca bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta eşim Halime AKTAŞ'a, kızlarım Merve ve Ayőe Nur AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmasını TF.2009.D.11 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Uzm. Bio. Hanifi AKTAŞ

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sınıflandırma	3
2.1.1 <i>Entamoeba</i> cinsi	3
2.2. <i>Entamoeba histolytica</i>	4
2.2.1. Tarihçe	4
2.2.2. Morfolojik Yapı	4
2.2.2.1. Trofozoit	4
2.2.2.2. Prekist	5
2.2.2.3. Kist	5
2.2.2.4. Metakist	6
2.2.2.5. Metakistik trofozoit	6
2.2.3. Moleküler Yapı ve Metabolizma	6
2.2.4. Evrim	6
2.2.5. Epidemiyoloji	8
2.2.6. Patogenez	8
2.2.7.Amebiyazda Klinik Belirtiler	10
2.2.8.Tanı	10

2.2.8.1. Mikroskobi	11
2.2.8.2. Kùltür	11
2.2.8.3. İzoenzim Analizleri	11
2.2.8.4. Antikor Tanı Testleri	12
2.2.8.5. Antijen Tanı Testleri	12
2.2.8.6. İmmünokromatografik Yöntemler	13
2.2.8.7. Deoksiribonùkleik asit (DNA) Temelli Tanı Testleri	13
2.2.8.7.1. Konvansiyonel PCR	14
2.2.8.7.2. Real-time PCR	15
2.2.8.7.2.1. SYBR Green I	16
2.2.8.7.2.2. TaqMan prob	18
2.2.8.7.2.3. Molekùler Boncuk Yöntemi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Örneklerin Toplanması	21
3.2. Copra-Antijen ELISA Testi	21
3.3. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu	21
3.4. Konvansiyonel PCR Amlifikasyonu	23
3.4.1. Primerler	23
3.4.2. PCR Karışımı	23
3.4.3. Termal Cyclus Protokolü	24
3.4.4. Agaroz Jelde Yürütme	24
3.5. Real-Time PCR Amlifikasyonu	24
3.5.1. Primer ve Problar	24
3.5.2. Real-Time PCR Karışımı	25
3.5.3. Real-Time Termal Cyclus Protokolü	25

4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	40
7. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Entamoeba histolytica*' nın evrimi

Şekil 2. RT-PCR' ın doğruluğu ve tekrarlanabilirliği.

Şekil 3. Syber green boya tekniği.

Şekil 4. TaqMan Prob çalışma prensibi.

Şekil 5. Moleküler boncuk yöntemi.

Şekil 6. *Entamoeba dispar* pozitif RT-PCR sonuçlarından bazıları.

Şekil 7. *Entamoeba histolytica* pozitif RT-PCR sonuçlarından bazıları.



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. PCR amplifikasyonu için kullanılan primer nükleotid dizilimleri.

Çizelge 2. Termal Cyclus protokolü

Çizelge 3. RT-PCR primer dizileri

Çizelge 4. RT-PCR amplifikasyonu

Çizelge 5. Çalışılan 74 örneğin sonuçları

Çizelge 6. Sonuçların karşılaştırılması

Çizelge 7. Örneklerin yüzde dağılımı

Çizelge 8. Test metotları hassaslık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer çizelgesi

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonuna
RT-PCR	Real-Time PCR
SAF	Sodyum asetat-asetik asit-formol
İHA	İndirekt hemaglutinasyon
İFA	İndirekt immüno floresan
ELISA	Enzim Linked İmmünosorbent Assay
TPP	Triage parazit paneli
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAM	6-karboksifloresin
TAMRA	6- karboksi- tetrametil- rodamin
PPD	Pozitif prediktif değer
NPD	Negatif prediktif değer
UNESCO	Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü
MIC	Minimal inhibisyon konsantrasyon

## ÖZET

### *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* TANISINDA REAL-TIME PCR YÖNTEMİNİN KULLANILMASI

Protozoon parazit *Entamoeba histolytica* dünyanın geniş bir kısmında endemiktir ve her yıl milyonlarca dizanteri ve karaciğer absesinin sorumlusu olarak kabul edilir. İnvaziv hastalık öncesinde *Entamoeba histolytica* belirtisiz enfeksiyon gibi aylarca hatta yıllarca insan bağırsağında bulunabilir. Dünya Sağlık Örgütü *Entamoeba histolytica* için mutlaka spesifik tanısının konulmasını ve eğer bulunursa mutlaka tedavi edilmesi gerektiğini önermektedir. Klasik mikroskopik incelemeyle patojen *Entamoeba histolytica* ile patojen olmayan *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba moshkovskii*'nin ayrımı mümkün olmamaktadır.

Son yıllarda *Entamoeba histolytica*'nın *Entamoeba dispar*'dan ayrımı için protein ve DNA tanı sistemleri gibi bir dizi tanı yöntemleri geliştirilmiştir. PCR ile amip DNA parçalarının amplifikasyonu insan dışkısında *Entamoeba histolytica* veya *Entamoeba dispar*'ın ayrımında duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Son zamanlarda geliştirilen kapalı tüp ile RT-PCR metodu ile bazı sorunları aşmak mümkündür. Bu yöntem PCR esnasında bir ya da iki floresan işaretli problemlerin bağlandığı ampikon spesifik algılamaya izin verir. Bu nedenle sonuçları almak için analizin sonuçlanması beklenmemektedir. Buna ek olarak kapalı reaksiyon tüpü çapraz kontaminasyon riskini en aza indirir ve kalitatif rakamsal sonuç ile uygun bir tanı istatistiği uygulanabilir.

Bu çalışmada, *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar*'ın ayrımı için dışkı örnekleri mikroskopi, antijen tanı testi, konvansiyonel PCR ve RT-PCR yöntemleri karşılaştırıldı. 74 dışkı örneğinin 13 tanesi *E. histolytica* spesifik antijen tanı testi ile pozitif bulunurken 61 tanesi negatif bulundu. Dışkıdan QIAGEN metoduyla DNA elde edildi ve PCR ile RT-PCR'da rRNA'nın küçük alt birimi amplifiye edildi. Toplam 74 dışkı örneğinin 19 tanesi RT-PCR ile *E. histolytica* pozitif bulunurken 16 örnek konvansiyonel PCR ile pozitif bulundu. RT-PCR ile karşılaştırıldığında antijen tanı testi %79 duyarlı ve %96 özgül bulundu. Konvansiyonel PCR ile RT-PCR karşılaştırıldığında konvansiyonel PCR'in duyarlılığı %84,2 ve özgüllüğü %100 bulundu. Sonuç olarak, RT-PCR diğer yöntemlerden daha duyarlı ve özgül bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** *Entamoeba histolytica*, koproantijen ELISA, PCR, Real-Time PCR

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF ENTAMOEBEA HISTOLYTICA BY REAL-TIME PCR METHOD

The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is endemic in large parts of the world and is considered responsible for millions of cases of dysentery and liver abscess each year. Prior to invasive disease, *E. histolytica* may reside in the human gut for months or even years as symptomatic infection. The World Health Organization has recommended that *Entamoeba histolytica* 'should be specifically identified and if present should be treated'. Classic microscopic examination of the parasite *E. histolytica* in stool can not differentiate it from the nonpathogenic but identically appearing parasites *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii*.

A number of assays have been developed during recent years, such as protein and DNA detection systems, which are able to distinguish *E. histolytica* from *E. dispar*. Amplification of ameba DNA fragments by PCR has been proven to constitute a sensitive and specific method to detect *E. histolytica* or *E. dispar* from feces. Recently developed closed-tube, real-time PCR methods can circumvent these problems. These methods allow specific detection of the amplicon by binding to one or two fluorescence-labeled probes. The time needed to obtain results. In addition, the closed reaction tube minimizes the potential for cross-contamination, and the assay output is numerical rather than qualitative, allowing appropriate diagnostic statistics to be applied.

In this study, stool samples were tested by microscopy, antigen detection assay, traditional PCR and RT-PCR methods for identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. A total of 74 stool samples, 13 (17,6%) of which were positive by the *E. histolytica*-specific antigen detection test, while the other 61 (82,4%) stool samples were negative by the antigen detection test. DNA was extracted from the stool by the QIAGEN method and the small-subunit rRNA gene of *E. histolytica* was then amplified by traditional and real-time PCR. A total of 74 stool samples, 19 were positive by real-time PCR assay and 16 were positive by the traditional PCR test. Compared to the real-time PCR assay, the antigen detection test was found 79% sensitive and 96% specific. When the traditional PCR test results were compared to the real-time PCR assay, the sensitivity of traditional PCR was 84,2% and the specificity was 100%. In conclusion, real-time PCR being the more sensitive and specific than the other methods.

**KEY WORDS:** *Entamoeba histolytica*, Coproantigen ELISA, PCR, Real-Time PCR

# 1.GİRİŞ

*Entamoeba* cinsi insan intestinal sistemi içerisinde *Entamoeba moshkowski*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba histolytica* gibi altı farklı tür bulunur. *Entamoeba histolytica* bunlar içerisinde insanda hastalık yapan yegâne patojen etkindir. Diğerleri patojen değildir<sup>1,2,3,4</sup>.

*Entamoeba histolytica* insanların ölümünden sorumlu olan çok yerde yaygın görülen parazit ajan olarak amebiyaza neden olur. *Entamoeba histolytica*'nin neden olduğu amebiyazın klinik özellikleri, asemptomatik kolonizasyondan amipli dizanteriye ve karaciğer apsesine neden olur. Ayrıca akciğer ve plevra, perikard, beyin, dalak, üreme ve idrar organları ve deri amebiyazı gibi seyrekte olsa görülen tutulumları vardır<sup>2,4,5</sup>.

Amebiyaz etkeni olan *Entamoeba histolytica* ile dünyada 500 milyondan fazla insan enfektedir ve her yıl yaklaşık 100.000 kişi hayatını kaybetmektedir. Amebiyaz sıtma ve şistozomiyozdan sonra, parazitozlara bağlı ölümlerin nedeni olarak üçüncü sırada yer almaktadır. Amebiyazın yaygınlığı toplumun sosyo-ekonomik düzeyi, insanların yaşadıkları hijyenik koşullar ile doğrudan ilişkilidir. Gelişmekte olan ülkelerde özellikle orta ve güney Amerika, Afrika, Hindistan, Endonezya ve Bangladeş gibi ülkelerde amebiyaz yaygın olarak hastalıktan ve ölümlerden sorumludur. Bangladeş'te çocukların %50 si 5 yaşından önce seropozitifdir. Dünya üzerinde yayılım göstermesine rağmen birçok ülkede görülme sıklığı en çok %10'lar civarındadır<sup>4,6,7,8,9,10</sup>.

*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba moshkowski* parazitlerinin epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Çünkü çok sayıda bilgi morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemeyen bu parazitlerin ayırımını yapabilecek kapasitede olmayan metotlarla yapılan bildirimlerden kaynaklanmaktadır. *E. dispar*, *E. histolytica*'dan 10 kat daha fazla görülme sıklığına sahiptir. *E. moshkowski*'nin epidemiyolojisi ve insidansı hakkında çok az bilgi vardır<sup>1,2,4</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemeyen *Entamoeba* türlerinin tanımlanmasında ve *E. histolytica*'nin özellikli tanısı için yöntem

geliştirilmesini önermektedir. Amebiyazın epidemiyolojik çalışmaları *E. histolytica* ve *E. dispar*' in ayırıcı tanısını içermek zorundadır. *E. histolytica* tanısında karşılaşılan sorunlar, beraberinde tedavi sorunlarını da getirmektedir. *E. histolytica*' nın identifikasyonu klinik parazitoloji laboratuvarlarının önemli hedefleri içerisinde olmalı ve moleküler tanıları *E. histolytica* ile enfekte hastaların spesifik tedavisi için sunulmalıdır. Çalışmada, *Entamoeba histolytica*' nın diğer türlerden ayırımını yapmak için direk bakı, boyama, antikor ve antijen tanı testleri ve konvensiyonel Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) göre daha duyarlı ve özgül bir test olan Real-Time PCR (RT-PCR) yapıldı ve diğer testler ile karşılaştırıldı. Çalışmada bölgemizde görülen *Entamoeba*' nın türünü tespit etmek, kesin tanı koymak ve sonuç olarak gereksiz tedavinin meydana getireceği zararları önlemek amaçlanmıştır<sup>11, 12, 13, 14</sup>.

## 2. GENEL BİLGİLER

Amipler trofozoit şekillerinde vücutları kabukla çevrili olmayan yani çıplak ve lobopodlarla hareket eden canlılardır. Bunların sitoplâzması endoplazma ve bundan daha sert ve saydam ektoplazma olarak ikiye ayrılır. Çoğalma eşeysiz olarak genellikle ikiye bazen birkaç parçaya bölünme iledir <sup>4, 5, 15</sup>.

İnsanda sığıntı veya parazit halinde bağırsakta yaşayan amiplerin başlıcaları Entamoebidae ailesinde toplanmışlardır. Bunlar başlıca *Entamoeba*, *Endolimax* ve *Iodamoeba* cinslerinde bulunur. Bunların ortada veya ortaya yakın olarak oldukça küçük bir karyozomu vardır <sup>5</sup>.

### 2.1. Sınıflandırma

İnsan sindirim sisteminde yaşayan amiplerin sınıflandırması şu şekildedir <sup>16</sup>.

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 moshkowski</i>

#### 2.1.1 *Entamoeba* cinsi

Bu cinse ait amipler, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar. Kesecikli bir çekirdek, merkeze yakın veya merkezde yerleşmiş küçük bir karyozoma sahiptir. Çevre kromatin granülleri çekirdek zarına yerleşmiştir ve bu kromatin tanecikleri düzenli veya düzensiz şekilde periferik bir tabaka halindedir<sup>4, 5, 16, 17</sup>.

## **2.2. *Entamoeba histolytica***

### **2.2.1. Tarihçe**

*Entamoeba histolytica*, ilk kez 1869 yılında dışkı örneklerinde Lewis tarafından tespit edilmiştir. Amipli dizanteri ilk kez 1875 yılında St. Petersburg da Losch tarafından tanımlanmıştır. Koch ve Gaffky dizanterili hastaların bağırsak ülserasyonlarında amip varlığını göstermiştir. Amip kistleri ilk olarak Quinke ve Ross tarafından 1893 yılında bulunmuştur. 1903 yılında Schaudin amiplerin değişik biçimlerini tanımlamış, Walker ve Sellards 1913 yılında *Entamoeba histolytica*'nın kesin patojenitesini saptamışlardır. S. Shimura 1918 yılında ve E. Brumpt 1925 yılında kisti 4 çekirdekli olan iki ayrı amip göstermiş, E. Brumpt kedilerde virülan olmayanlara *E. dispar* adını vermiş fakat öneri benimsenmemiştir. Fakat sonradan yapılan çalışmalarda *E. dispar*'ın *E. histolytica* ile farklılıkları kültür, boyama ve malik enzim elektroforeziyle ayırt edilemediği anlaşılmıştır<sup>3, 4, 5, 15, 18</sup>.

### **2.2.2. Morfolojik Yapı**

*Entamoeba histolytica*, trofozoit döneminde lobopodlar oluşturarak hem biçimlerini değiştirirler hem de hareket ederler. Kist dönemine geçtiğinde bu özelliklerini yitirir ve kist örtüsü ile kaplanır. *Entamoeba histolytica*'nın insan vücudunda trofozit, prekist, kist, metakist ve metakistik trofozoit şekillerine rastlanmaktadır<sup>5, 15, 16</sup>.

#### **2.2.2.1. Trofozoit**

*Entamoeba histolytica*'nın trofozoitleri 12-60µ dur. Taze dışkıdan yapılmış



preparatlarda trofozoitler genellikle hareketlidir. Hareketleri amibin yüzeyindeki bir noktadan çıkan yalancı ayaklarla olmaktadır. Yalancı ayak; kısa şekilden, geniş, uzun ve parmak gibi değişik şekillerde olabilir. Saydam olan ektoplazma, amibin dış tabakasını oluşturur. Yalancı ayak *Entamoeba histolytica*' da ilk oluştuğunda saydamdır. Granüler yapıca zengin olan endoplazma yalancı ayağa doğru akar. Hareket genellikle ileri doğrudur. Eğer ortam soğursa amip önce küt yalancı ayaklar çıkartır ve sonra hareket durur. Endoplazmada vakuoller belirir. Bayat dışkılarda anormal şekiller görülebilir. Çekirdek 3µ dan daha büyüktür ve canlı iken fark edilmez. Ancak tespit edilip boyanınca yapısı net görülür. Çekirdekçik ortada, küçük, yaklaşık 0,5µ kadar olup etrafında saydam bir bölge vardır. Çekirdekçik ile çekirdek zarı arasında linin iplikleri üzerinde kromatin tanecikleri bulunmaktadır<sup>5, 15, 16</sup>.

Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde belirgin bir plazma zarı, az gelişmiş endoplazma ağı, 0,2-2µ çapında birçok vakuol, glikojen demetleri, küçük silindir şeklinde elektron geçirmeyen cisimcikler ve delikli bir çekirdek zarı görülür<sup>5, 16</sup>.

Trofozoitin doku içinde gelişen, dokuyu eriten ve hastalık oluşturan şekli olan doku şekli ile, doku şeklinden daha küçük, içinde eritrosit olmayan sığıntı şeklinde yaşayan bağırsak boşluğu şekli diye iki şekli vardır<sup>5, 16</sup>.

#### **2.2.2.2. Prekist**

Trofozoitlerin bölünmesiyle oluşan küçük amipler prekist haline geçecekleri zaman besinleri dışarı atarlar. Ektoplazma ve endoplazma ayırt edilemez. Dirençsiz trofozoitin dirençli kiste dönüşmesi için tüm sindirim materyalini artırır ve yuvarlaklaşır. Sitoplazmasında besin vakuolleri yoktur. Genellikle glikojen granülleri ile çomak ve tanecikler biçiminde kromatoid cisimcikler görülür. Özellikle hastalık belirtilerinin azaldığı, enfeksiyonun süregenleştiği dönemde yarı katı dışkıda görülmektedir<sup>5, 15, 16</sup>.

#### **2.2.2.3. Kist**

Prekistten oluşan kistler genellikle yuvarlak olup hafif oval veya asimmetrik

şekillerde görülebilir. Çapı ortalama 11-14µ dur. Kistler hareketsiz, yuvarlak, 1-2-4 çekirdekli, 0,5µ kalınlığında bir kist zarı ile çevrilidir. Hematoksilin ve trikrom gibi boyalarla boyandığında çekirdekler görülür. Kistler çoğunlukla şekilli dışkıda görülür ve dış koşullara daha dayanıklı olduğundan hastalığın yayılışı bu dört çekirdekli kist şekilleriyle olmaktadır<sup>5, 15, 16</sup>.

#### **2.2.2.4. Metakist**

Dört çekirdekli olgun kistler, sindirim yolu ile ağızdan alındıktan sonra önce mideye geçmekte ve sonra bağırsaklarda dört çekirdekli metakistik amip biçimine dönüşmektedir<sup>5, 15, 16</sup>.

#### **2.2.2.5. Metakistik trofozoit**

Metakistin çekirdeklerinin bölünmesiyle oluşan sekiz adet çekirdeğin etrafına sitoplazma toplanarak küçük amipler oluşmaktadır<sup>5, 15, 16</sup>.

#### **2.2.3. Moleküler Yapı ve Metabolizma**

*Entamoeba histolytica*'nin diğer ökaryonlu hücrelerden farklı olan bazı özellikleri vardır. Mitokondrileri, golgi aygıtı, sentriolu, endoplazmik retikulumu bulunmamaktadır. *Entamoeba histolytica* mikroaerofil bir organizma olup oksidoredüksiyon olaylarını glutatyon olmadan sürdürmekte, karbonhidrat metabolizmasında değişik basamaklarda kofaktör olarak adenosin trifosfat yerine pirofosfat kullanarak, enerjisini glikozun piruvata dönüşümünden elde etmektedir. Fonksiyonel bir trikarboksilik asit siklusuna sahip değildir. *Entamoeba histolytica*'nin oksijen tüketiminin yalnızca trofozoitin dinlenme döneminde olduğu saptanmıştır. *Entamoeba histolytica* hem kalın bağırsakta çok düşük oksijen basıncında hem de dokularda yüksek oksijenli ortamda yaşayabilmektedir<sup>4, 19, 20</sup>.

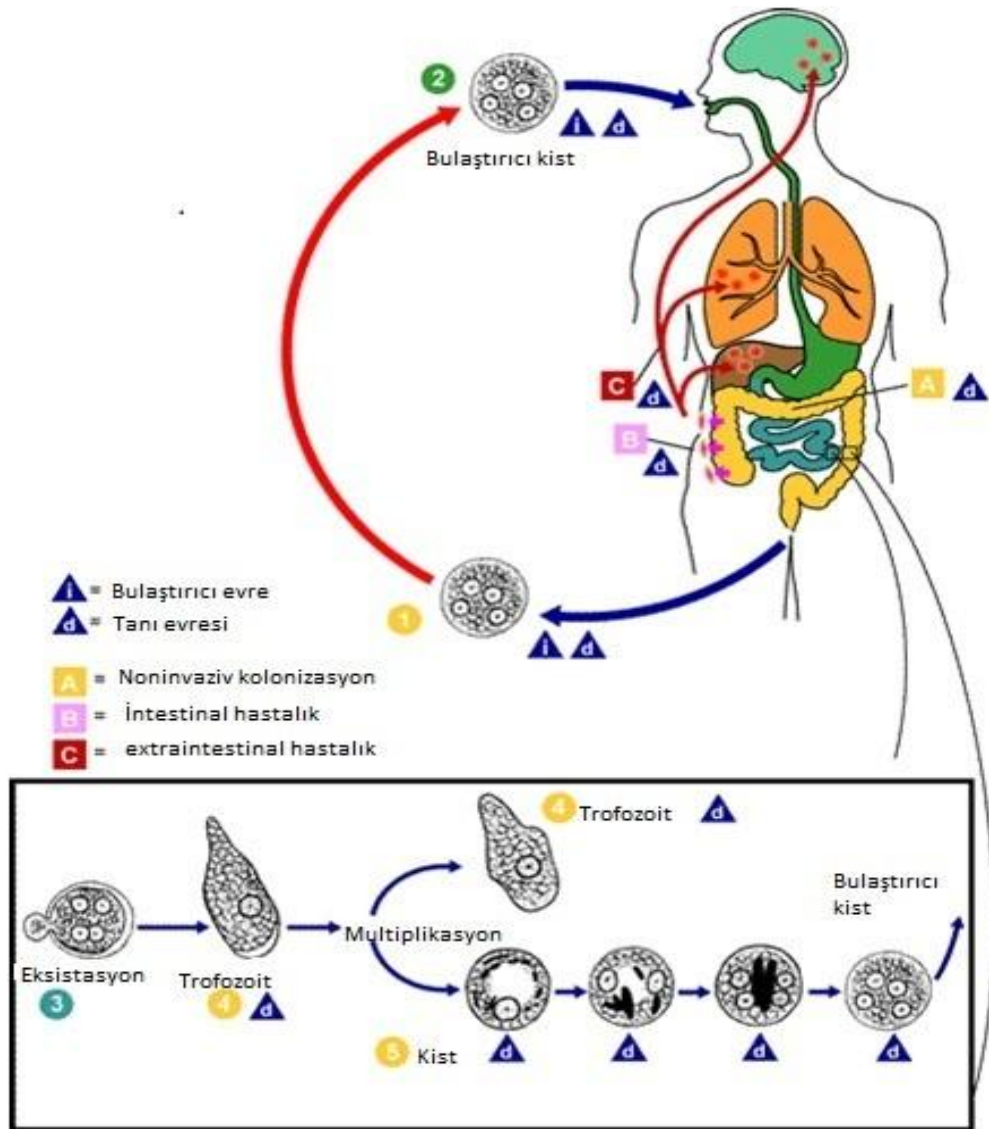
#### **2.2.4. Evrim**

*Entamoeba histolytica*'nin konak zinciri insan-insan-insandır. Amebiyaz dört

çekirdekli kistlerin ağız yolu ile alınması ile oluşmaktadır. *Entamoeba histolytica* insan dışında, köpek ve bazı maymunlarda da bulunmaktadır<sup>5,16</sup>.

Amebiyaz insana doğrudan ağız yoluyla bulaşabileceği gibi, insan dışkısı ile kirlenmiş yiyecek ve içeceklerle de bulaşabilmektedir<sup>3, 16, 18</sup>.

Enfeksiyonun yayılışı kalabalık ve alt yapısı bozuk yerlerde tropik ve subtropik bölgelerde çok yüksektir. Her yaşta ve cinsiyette görülebilir<sup>3, 5, 16, 18</sup>.



Şekil1. *Entamoeba histolytica*' nin evrimi<sup>21</sup>.

*Entamoeba histolytica*' nın biri normal dönemli diğeri patojen dönemli iki evrimi vardır. Normal dönemli evriminde sığıntı olarak yaşar. Ancak trofozoitler sürekli bölünerek daha da büyürler ve bağırsak epitelini geçerek eritrositleri fagosite eden hematofaj şekline dönüşürler. Kist oluşturmaksızın ikiye bölünerek çoğalırlar ve patojen dönemli evrimi sürdürürler. Mukoza katları arasına yayılan amipler özgün amip ülserini oluştururlar<sup>5, 16, 18</sup>.

### **2.2.5. Epidemiyoloji**

Dünya nüfusunun % 10 unu enfekte ettiği kabul edilen *Entamoeba histolytica*, tropik ve subtropik bölgelerde %50 gibi oranlara yükselmektedir. Her yıl yaklaşık 50 milyon insanda doku invazyonlarına ve yaklaşık yüz bin ölüme sebep olduğu bildirilmektedir. Ölüme neden olan parazit hastalıkları sıralamasında sıtma ve şistozomiyazdan sonra üçüncü sırada yer almaktadır. *Entamoeba histolytica*' nın neden olduğu amebiyaz parazit hastalıkları içerisinde en kozmopolit olanıdır<sup>4, 15, 17, 22</sup>.

Kırk üç ülkede yapılan araştırmanın sonuçlarına göre; Avrupa'da %10, Amerika'da %12, Asya'da %26, Afrika'da %17 ve Avustralya'da %15 oranında saptanmıştır<sup>8</sup>.

Enfekte kişilerin yaklaşık %10'unda her yıl amebiyaz gelişmekte ve bunların %80-98' i bağırsak amebiyazı şeklinde görülmektedir<sup>16</sup>.

Amebiyaz *Entamoeba histolytica*' nın kistleri ile bulaşmaktadır. Trofozoitler vücut dışında fazla yaşayamadıkları ve yutulduğunda mide asidine dayanamadıkları için bulaşmada etkisizdirler. En önemli kaynak sessiz enfeksiyonlu insanlardır. Bunlar dışkılarıyla 4 çekirdekli bulaştırıcı kistleri etrafa saçarlar. Kistler çevre koşullarına bağlı olmak üzere haftalarca veya aylarca canlılıklarını sürdürebilirler. Kistler nemli ortamlarda uzun süre canlı kalabilirler. Bulaşma canlı kistlerin yiyecek ve içeceklerle alınması veya dışkının fekal- oral yolla alınması ile olmaktadır<sup>5</sup>.

### **2.2.6. Patogenez**

*Entamoeba histolytica* kistlerin ağız yoluyla alınmasını takiben kalın bağırsakta metakist ve metakistik trofozoit şekillerine dönüştükten sonra kolonize olmaktadır.

Amebiyazda görülen klinik tablolar belirtisiz enfeksiyonlardan yaygın ölümcül hastalığa kadar geniş bir yelpazede konak ile amip arasındaki dengeye bağlı olarak değişmektedir<sup>15, 23, 24</sup>.

*Entamoeba histolytica*'nın patojenite mekanizması iki ana konuda ele alınmıştır.

1. Amibin oluşturduğu toksinler ile gelişen olaylar. Bunlar, salınan enzimler, trofozoitlerden serbest kalan enterotoksinler veya sitokinlerdir.
2. Amip-konak arasında direkt hücresel temas ile gerçekleşen olaylardır. Bunlarda hücre erimesi şeklinde kendini gösterir<sup>15, 23</sup>.

Hücre öldürücü etki, amiplerin konak hücrelerine tutunmaları ile başlar ve diğer hücreleri amiplerin fagozitozu izler. Amibin bu etkinliği dış zarı ile alakalıdır. Patojenitede yapışma, hücre erimesinin yanı sıra konak savunma mekanizmasına karşı parazitin direncinin artmasında da etkili olmaktadır<sup>15, 23, 24</sup>.

Virulans faktörü olarak hücre dışı *Entamoeba histolytica* sistein proteinazların rolü önemlidir. *Entamoeba histolytica* hücre lizatlarından üretilen ve hücre dışı salınan sistein proteinazların miktarı, *Entamoeba dispar* ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 1000 kat daha fazladır. Sistein proteinazlar, trofozoitlerin invaziv hastalık oluşturmak için penetre olmak zorunda oldukları hücre dışı matriksin elementleri olan kollajen, elastin, fibrinojen ve laminin' i ayırma gücüne sahiptir<sup>3, 15, 23</sup>.

*Entamoeba histolytica* insan eritrositi ve kolon epitelyum hücresi de dâhil olmak üzere çoğu hücreye Gal/GalNAc lektin aracılığıyla adhezyonunu gerçekleştirmektedir. Lektin 260kDa ağırlığında heterodimer yapıda önemli bir virülans faktördür. Lektin hem konak galaktozuna hem de N-acetyl-D-galaktosamine' e bağlanır. Aynı zamanda proteaza direnç özelliği veren yüksek oranda sistein içerir<sup>4, 15</sup>.

*Entamoeba histolytica* mukus salgısını artırarak yapışmanın kolaylaşmasını sağlarken artan mukus salgısı sayesinde, musin tüketerek amibin epitel yüzeyine daha rahat girmesini sağlar<sup>5, 15</sup>.

Amipler bağırsak çeperinde, ülserin genellikle kenarlarında ve dibinde bulunurlar. Burada erimiş hücrelerle ve eritrositlerle beslenirler. Ülserlere en çok çekumda, rektumda ve sigmoid kolonda, ağır olgularda ise kalın bağırsağın her

tarafında rastlandığı gibi ince bağırsakta ve kör bağırsakta da lezyonlar görülebilmektedir<sup>5, 15, 23</sup>.

Başlangıçta küçük sarı akıntılar şeklinde görünen lezyonlar açılır, ağzı dar bir şişe tarzında amip yaraları meydana gelir. Amip yaralarının kenarlarının altı oyuktur ve bağırsak kıvrımları yönünde ilerlediklerinden enleri boylarından büyüktür. Burada bulunan amipler venciklerden veya periton boşluğundan geçerek karaciğere varabilirler. Karaciğerden başka akciğerde, beyinde ve diğer organlarda görülebilir<sup>15, 25</sup>.

### **2.2.7.Amebiyazda Klinik Belirtiler**

Bağırsak yüzeyindeki *Entamoeba histolytica* enfeksiyonları genellikle belirtisiz seyreder, parazitin yerleştiği bireylerin %85-90' ında herhangi bir klinik belirti ortaya çıkmaz. Klinik belirtiler, parazitin bağırsak duvarını aşmasıyla ortaya çıkar. Bağırsak amebiyazlı hastalarda en sık ishal, kanlı dışkılama, karın ağrısı ve kilo kaybı görülür. Genellikle ateş ve sistemik belirtiler görülmez. Bu yönüyle bakteriyel kaynaklı dizanteriden rahatlıkla ayrılabilir. Parazitin karaciğere yerleştiği durumlarda ise; sağ üst kadranda ağrı, kilo kaybı, öksürük, ishal, ateş, titreme, terleme, iştahsızlık ve mide bulantısı gibi belirtiler görülür. Ayrıca bu hastalarda ağrılı karaciğer büyümesi vardır. Karaciğerin yüzeyi kanser ve sirozun aksine yumuşaktır<sup>15, 25</sup>.

### **2.2.8.Tanı**

Klinik olarak tanı koymak güçtür. Basilli ve Balantidiumlu dizanteriler, şistozomiyaz, bağırsak kanseri, ülseratif kolit gibi hastalıklarla karışır<sup>8, 22</sup>.

*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba moshkowski* parazitlerinin epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Çünkü çok sayıda bilgi morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemeyen bu parazitlerin ayırımını yapabilecek kapasitede olmayan metotlarla yapılan bildirimlerden kaynaklanmaktadır. *E. dispar*, *E. histolytica*' dan 10 kat daha fazla görülme sıklığına sahiptir. *E. moskowski*' nin epidemiyolojisi ve insidansı hakkında ise çok az bilgi vardır<sup>22</sup>.

DSÖ morfolojik olarak birbirinden ayrılamayan *Entamoeba* türlerinin tanımlanmasında *Entamoeba histolytica*'nın spesifik tanısı için metot geliştirilmesini önermektedir<sup>1,22</sup>.

#### **2.2.8.1. Mikroskopi**

*E. histolytica*, *E. dispar* ve *E. moshkowski*'nin klinik laboratuvar tanısı için dışkıda direkt bakı, konsantrasyon ve boyalı preparatlar şeklinde mikroskopik tetkikler kullanılmaktadır. Eritrosit içeren trofozoitlerin görülmesi için bir saat içinde bakılma zorunluluğu olduğundan çok duyarlı bir metot değildir. Hasta belirtili değilse dışkıda daha çok kistler mevcuttur. Konsantrasyon teknikleri kistlerin görülmesi için oldukça iyi bir yöntemdir. Trikrom ve demir hematoksilin gibi boyalı preparatlar tanı ve *Entamoeba* tür ayırımında önemli bir metottur. Mikroskopik muayene *Entamoeba*'nın tanısında kültür ve antijen tanı testlerine göre oldukça düşük duyarlılık göstermektedir. %60'ın altında duyarlılığı vardır ve yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir. Hemen bakılmayacak dışkının mutlaka Schaudin, SAF veya %5-%10 luk formalinde tespit edilmelidir<sup>1,22</sup>.

#### **2.2.8.2. Kültür**

*Entamoeba* türlerinin izolasyonu için kültür teknikleri yaklaşık 80 yoldan beri kullanılmaktadır. Difazik ve monofazik kültürler kullanılmaktadır. *E. histolytica*'nın kültürdeki başarı oranı referans laboratuvarlarda bile %50-70 arasındadır. Paraziti üretmek için Dobell' in iki fazlı veya Cleve-ton-Callier' in besiyeri, Robinson besiyeri, Diamond besiyeri, Jones besiyeri ve Locke' nin yumurta serum besiyeri gibi besiyerleri kullanılabilir<sup>1,22</sup>.

#### **2.2.8.3. İzoenzim Analizleri**

İzoenzimler, enzimlerin bir türde ve aynı türdeki bir canlının farklı üyelerinde görülen birden çok moleküler şekilleri olup katalizledikleri reaksiyon aynı fakat kinetikleri farklı olan şekillerdir. Brumpt 1925 yılında, *E. histolytica*'nın patojen ve patojen olmayan iki ayrı davranış sergilediğini ve bu davranışları sergileyen şekillerin

morfolojik olarak aynı fakat davranış olarak farklılık gösteren türler olduğunu ileri sürmüştür. Revees ve Bischoff 1968 yılında, *E. histolytica* ayırımında enzim elektroforezi kullanarak insanda hastalık oluşturan ve kültür ortamında 33-39C de üreyebilen tipik şeklin varlığını, aynı zamanda düşük sıcaklıklarda üreyen tipik olmayan şekillerinde varlığını bildirmişlerdir. *E. histolytica* zimodemlerini belirlemede kullanılan enzimler malik enzim, hekzokinaz, fosfoglukomutaz, glukozfosfat izomeraz enzimleridir <sup>1, 22, 26, 27</sup>.

#### **2.2.8.4. Antikor Tanı Testleri**

*Entamoeba histolytica* enfeksiyonlarının tanısı için kullanılan antikor tanı testlerinin, amebiyazın yaygın olmadığı toplumlarda perspektif tanı için kullanılması uygun olacaktır. Amebiyazın tanısı için birçok antikor tanı testleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları indirekt hemaglutinasyon (İHA), lateks aglutinasyon, immün elektroforez, counter-immün elektroforez, jel difüzyon testi, immün difüzyon, indirekt immüno floresan (İFA) ve enzim linked immünosorbent assay (ELISA) dir <sup>1, 22</sup>.

İHA yüksek özgüllüğü (%99) ile basit ve kullanışlıdır. Buna rağmen ELISA' ya göre düşük duyarlıdır ve yalancı negatiflik verebilir. Lateks aglutinasyon İHA' ya benzer on dakikada sonuç verir ancak özgül olmayan reaksiyonlardan dolayı özgüllüğü düşüktür <sup>1, 22</sup>.

İFA testi ELISA' dan daha duyarlı ve özgül olmasına rağmen sürekli kültür gerektirmesi ve antijen preparasyonu yapılması gerektiğinden rutin klinik laboratuvarlarda kullanılması zor bir testtir <sup>1, 22</sup>.

ELISA dünya çapındaki tanı laboratuvarlarında kullanılan en popüler testtir ve belirtisiz hastalıkların epidemiyolojik çalışmalarından intestinal ve ekstraintestinal amebiyazın tanısında oldukça kolay kullanılmaktadır. ELISA %97,9 duyarlılığa ve %94,8 özgüllüğe sahiptir. Burada dikkat edilmesi gereken serum IgG düzeylerinin enfeksiyondan bir yıl sonra bile pozitif olmasıdır. IgM antikorları akut veya geçirilmekte olan enfeksiyonu gösterir <sup>1, 22</sup>.

#### **2.2.8.5. Antijen Tanı Testleri**



Bazı araştırmacılar dışkı örneklerinden antijen tanısı için ELISA geliştirmişlerdir. Bu antijen tarama testleri dışkı kültürü kadar duyarlı ve daha hızlı bir yöntemdir. Antijen temelli ELISA kitleri, *E. histolytica*'nın Gal/GalNAc-lectin karşıtı özgül monoklonal antikor kullanıldığı için *E. histolytica*' ya özgüldür. Geliştirilen diğer antijen tanı testleri *E. histolytica*'nın serine-rich antijeni karşıtı ve lektini için özgül monoklonal antikorlardır <sup>1,22</sup>.

Amip antijen tanı testlerinin düzeyi oldukça yüksektir. Ancak bu testinde dışkı örneklerinin fiksasyonu sırasında antijenlerin denatüre olması gibi bazı dezavantajları vardır. Bu yüzden testin taze veya donmuş dışkı ile yapılması gerekir. Antijen tanı testleri mikroskop ve kültüre göre daha duyarlı ve özgüldür <sup>1,22</sup>.

Fotedar ve arkadaşlarının bildirdiğine göre Mirelman ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *E. histolytica* ve *E. dispar*' ın tanısı için ELISA ve PCR' ın karşılaştırılması yapılmış ve PCR iki türün ayırımı için ELISA' dan 100 kez daha duyarlı olduğu bulunmuştur <sup>1</sup>.

#### **2.2.8.6. İmmünokromatografik Yöntemler**

Triage parazit paneli (TPP) *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* ve *E.histolytica/E. dispar*' ın spesifik antijenlerinin tanımlanması için geliştirilmiş ilk immünokromatografik yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan immünokromatografik strip *E. histolytica/E. dispar*' ın 29 kDa yüzey antijeni, *G. lamblia*'nın alfa-1-giardin' i ve *C. parvum*' un protein disülfide izomerazı için spesifik monoklonal antikorları ile kaplıdır. Kullanılan spesifik antikorlar dışkı örneklerindeki bu organizmalar için spesifik antijenleri yakalar ve membran üzerinde immobilize eder. %96-100 arasında duyarlı ve %99,1-100 arasında özgüldür. TPP kitinin fikse edilmemiş, taze veya donmuş dışkıda 15 dakika içinde sonuç vermesi önemli bir avantajdır <sup>1</sup>.

#### **2.2.8.7. Deoksiribonükleik asit (DNA) Temelli Tanı Testleri**

Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak bulunması ve belirlenmesi zor veya imkânsız olan enfeksiyon ajanların tanımlanmasında halen en değerlisidir <sup>1</sup>.

DNA temelli testler gelişmiş ülkelerde klinik ve araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Dışkı örnekleri direkt PCR testi için en kompleks örnektir. Çünkü bilirubin, bile tuzları ve kompleks karbonhidratlar gibi PCR inhibitörleri vardır. Bu yüzden PCR çalışmalarının başarısı dışkı DNA ekstraksiyon prosedürünün optimizasyonuna bağlıdır. Geçmişte dışkı örneklerinden direkt DNA izolasyonu problemliydi. Şimdi ise dışkıdan parazit DNA' sının izolasyonu için basit ve etkili teknikler geliştirildi. DSÖ amebiyaz çalışmalarında PCR kullanılmasını önermektedir. Buda PCR testinin duyarlılığını artırmıştır. DNA temelli tanı testlerinin birçok adım içermesi ve pahalı olması gibi dezavantajları vardır <sup>1,22</sup>.

#### **2.2.8.7.1. Konvansiyonel PCR**

*E. histolytica*' nın neden olduğu karaciğer abse aspiratı, doku ve dışkı gibi çeşitli klinik örneklerle çalışılabilir. Yapılan araştırmalar *E. histolytica*' nın 18S rRNA gen bölgesini hedefleyen PCR' ın çeşitli antikör temelli ELISA yöntemlerinden 100 kat daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda farklı gen bölgelerini hedef alan çeşitli PCR metotları geliştirilmiştir. Bunlar *Entamoeba* türlerinin ayırımında oldukça başarılı bulunmuştur <sup>1, 22, 28</sup>.

Fotadar ve arkadaşlarının bildirdiklerine göre *Entamoeba* enfeksiyonlarının epidemiyolojik çalışmalarında PCR' ın kullanımı ilk olarak Acun-Soto ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar kültür temelli trofozoitlerden kaçınıp direkt dışkıdan DNA elde etmişler ve ekstrakromozomal sirküler DNA ampifikasyonunu hedefleyen primerleri kullanmışlardır. Bu araştırmacılar DNA ekstraksiyonu için modifiye DNA ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Konvansiyonel PCR' da *Entamoeba*' nın patojenik ve non patojenik türleri arasındaki farkı görmek için 29kDa/30kDa' luk antijen gen bölgesi primerlerini kullanmışlardır <sup>1</sup>.

Fotadar ve arkadaşlarının bildirdiklerine göre Nunez ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında PCR' ın duyarlılığını artırmak için Nested Multipleks PCR geliştirilmiştir. Bu multipleks teknik kullanılarak PCR' ın duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %100 bulunmuştur. Ayrıca bu metot formalinle tespit edilmiş dışkı örneklerinde *E.histolytica* ve *E. dispar*' ın ayırımı için de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır <sup>1</sup>.

PCR temelli tanı yöntemleri morfolojik olarak birbirine benzeyen üç *Entamoeba* türünün ayırıcı tanısı için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak rutin tanı için hala kısıtlıdır. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonunun zorluğu PCR temelli metotların hala güçlü bir engelidir. Ayrıca DNA' nın izolasyonu ve amplifikasyonu uzun zaman gerektirir ve pahalıdır <sup>1,22</sup>.

#### **2.2.8.7.2. Real-time PCR**

Real-time PCR enfeksiyon hastalıklarının tanısı için oldukça etkili bir metottur. Bu test PCR boyunca floresanla işaretlenmiş bir veya iki probun bağlanması ile oluşan amplikonun spesifik tanımlanması temeline dayalıdır. Real-time PCR' ın konvansiyonel PCR ile karşılaştırıldığında önemli bir avantajı daha duyarlı olmasıdır. Bu da dışkının bir gramından elde edilen bir mikrolitre DNA özünün 0,01 ile 100 hücrenin temsil edildiği miktarın tanımını sağlayabilecek kadar duyarlı olduğunu göstermektedir. Diğer bir taraftan Real-time PCR farklı örneklerdeki parazitlerin sayısını tespit edebilen kantitatif bir metottur <sup>1</sup>.

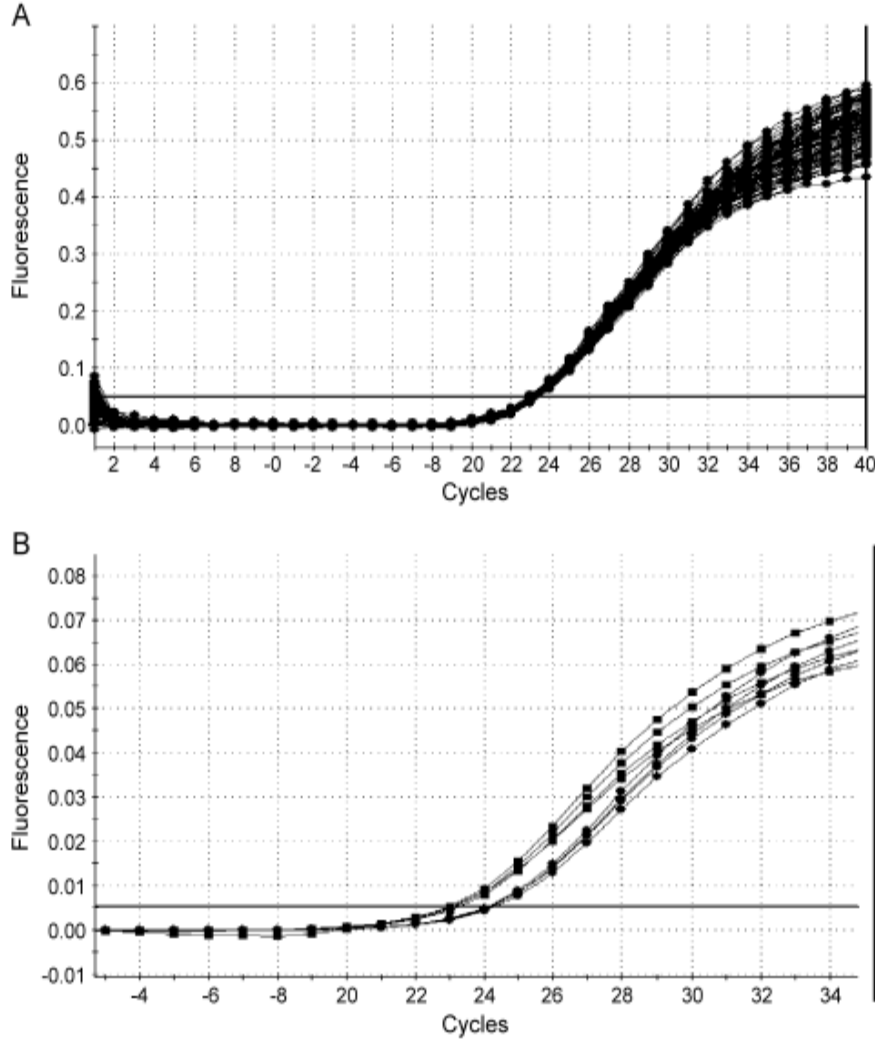
Real-time PCR' da kullanılan floresanla işaretlenmiş problemlerin varlığından dolayı reaksiyonun erken dönemlerinde PCR amplifikasyonu görülür. PCR' ın erken aşamalarında reaksiyon kinetiğini ölçme geleneksel PCR in amplifikasyon tespiti için agaroz jel kullanımına karşı avantaj sağlar <sup>1</sup>.

PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir <sup>29</sup>.

RT-PCR da DNA' ya bağlanabilen özgül olmayan flouoroforlar (SYBR Green) kullanılır ve bu yönteme özgül olmayan belirleme sistemi denir. Diğer taraftan DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli problemler kullanılır. Bu problemlerin başında TaqMan prob, moleküler boncuk yöntemi, scorpion primer gibi floresan işaretli problemler kullanılır <sup>30</sup>.

Şekil 2' de RT-PCR' ın doğruluğu ve güvenilirliği ifade edilmektedir. A' da Tüm 96 örneğin eşik döngüsünün (Threshold Cycles = C<sub>t</sub>) 23± 0,3 olduğu görülmektedir. B' de ise üçlü olarak kurulan iki reaksiyon karışımı görülmektedir. Birisi 1x10<sup>3</sup> hedef DNA

içerir ve  $C_t$  değeri  $23,1 \pm 0,15$  dir. Diğeri  $2 \times 10^3$  hedef DNA içerir ve  $C_t$  değeri  $24,1 \pm 0,1$  dir. Bu da hedef sayılarında iki kat farklılık arasında bile kolayca ayırım yapabilir.



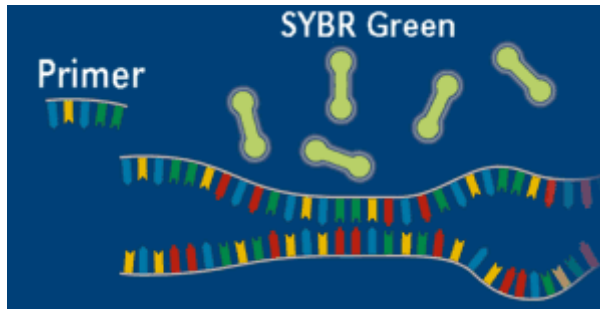
Şekil 2: RT-PCR' in doğruluğu ve tekrarlanabilirliği<sup>30</sup>.

**2.2.8.7.2.1. SYBR Green I:** Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak okunan floresanın miktarda eş zamanlı olarak artmaktadır. SYBR Green I en fazla kullanılan boya çeşididir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder. Çoğaltımın başında reaksiyon

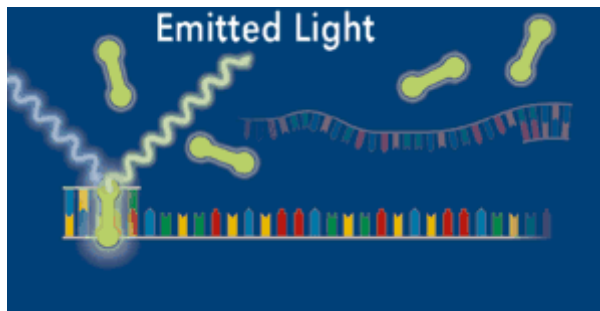
karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green I boyası bulunmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Ürün miktarı arttıkça floresan miktarda artar. Floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Ancak istenmeyen PCR ürünlerinin çoğalması ve primer dimerleri oluşması durumunda da floresan ışımaya verdiği için dezavantajları da vardır<sup>29,31</sup>.

Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi (melting curve) analizleri yapılmak zorundadır. Erime eğrisi analizi yapılmak istenildiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature =T<sub>m</sub>) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı vardır<sup>29</sup>.

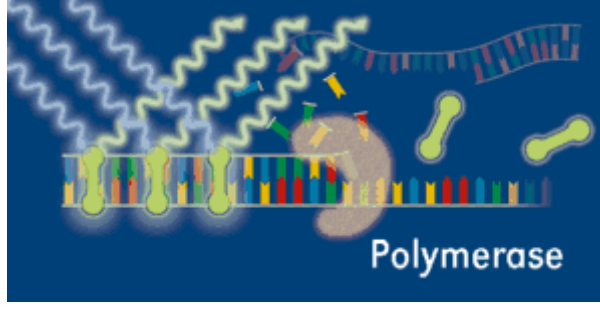
Şekil 3' de SYBR Green boya tekniği görülmektedir.



DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrıldığında SYBR green boya serbest hale geçer.



SYBR Green boya DNA çift iplikli olduğunda DNA'ya bağlanabilir.



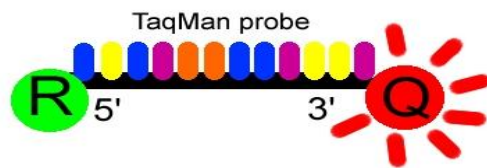
Polimerizasyon tamamlandığında SYBR Green boya çift iplikli DNA'ya bağlanır ve floresan ışığı yayar.

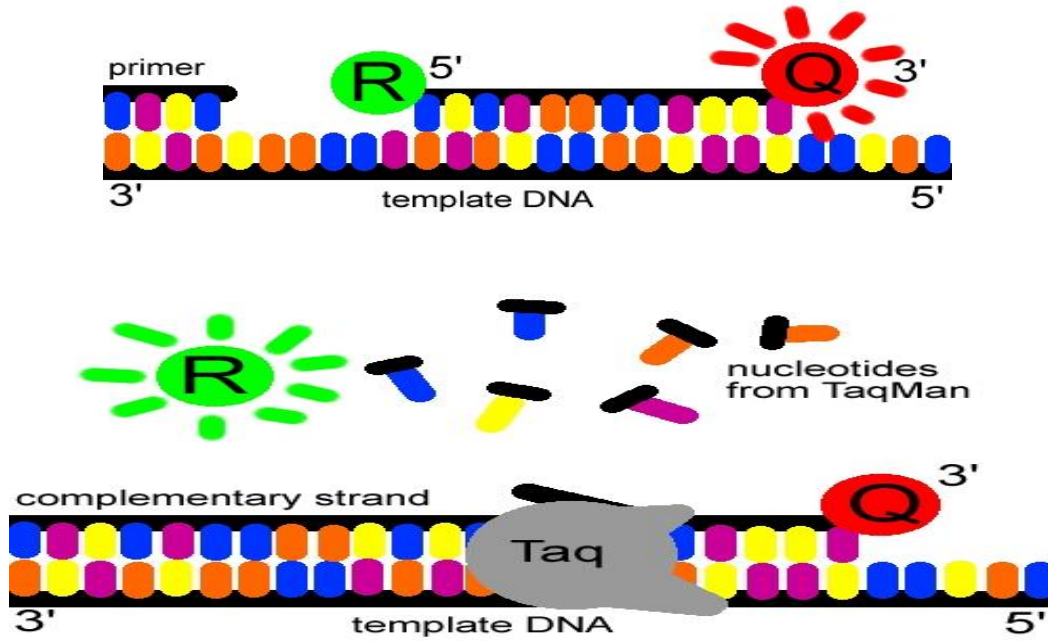
Şekil 3. SYBR Green boya tekniği<sup>32</sup>.

DNA parçasının çoğaltılmak istenen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli probler kullanılır. Bu amaçla TaqMan prob, Moleküler boncuklar, hibridizasyon probu ve scorpion primer gibi floresan işaretli probler kullanılır<sup>29</sup>.

**2.2.8.7.2.2. TaqMan prob:** TaqMan prob yöntemi çoğaltılmak istenen DNA'ya komplementer olan ve floresan ile işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda fluorophore (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda quencher (6-karboksitetrametil –rodamin= TAMRA) bulunur. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında TaqMan probler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'-3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğaltımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder<sup>29,31</sup>.

Şekil 4' de TaqMan prob çalışma prensibi gösterilmektedir.

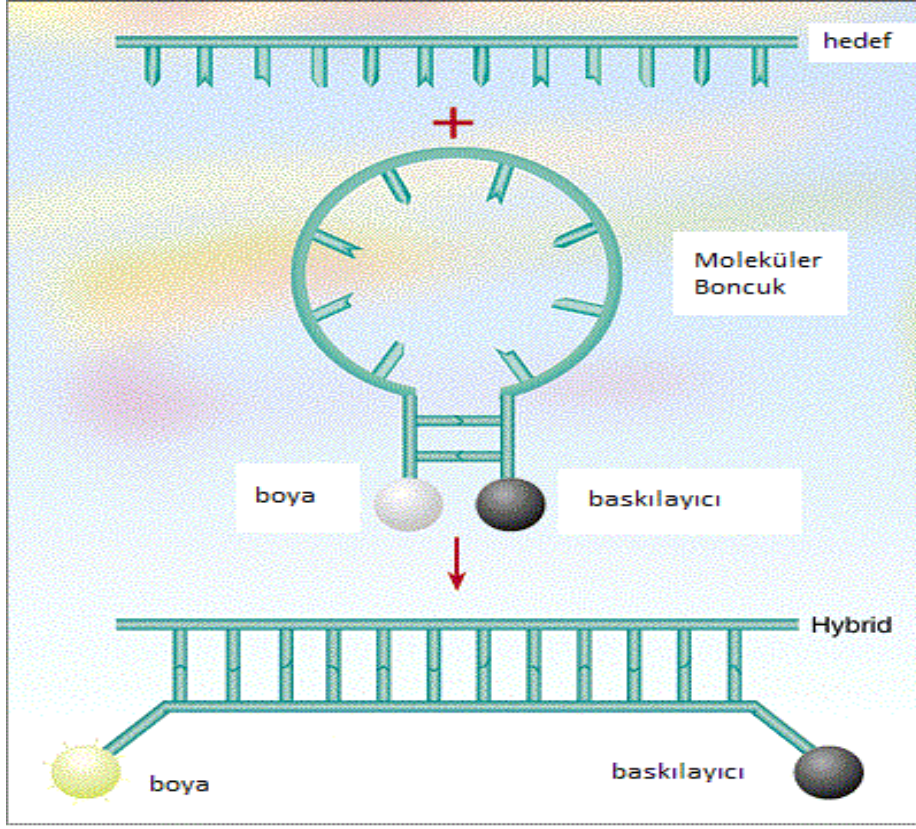




Şekil 4. TaqMan Prob çalışma prensibi<sup>33</sup>.

### 2.2.8.7.2.3. Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi hem yapısı hem de çalışma prensibi ile TaqMan prob ve SYBR Green I yönteminden çok farklıdır. Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içermektedir. Bunlardan baskılayıcı florofofor diğer boyanın floresanını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ışımaya yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre tasarlandığından birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar (Şekil 4)<sup>29,34</sup>.



Şekil 5. Moleküler Boncuk Yöntemi<sup>35</sup>.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada 01.01.2008 ve 01.12.2010 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen amebiyoz şüpheli 74 hastadan alınan dışkı örnekleri kullanıldı.

Dışkı örnekleri makroskopik açıdan incelendikten sonra native-lugol yöntemi ile mikroskopik olarak incelendi. Copro-Antijen ELISA, PCR ve real-time PCR çalışmak üzere dışkı örnekleri ependorf tüplerine aktarıldı, -20<sup>0</sup>C'de muhafaza edildi.

#### 3.2. Copro-Antijen ELISA Testi

Dışkı örneklerindeki *E.histolytica* parazitinde bulunan adezin enzimleri tespit etme prensibine dayalı olan *Entamoeba* CELISA Path (Australia) KE1 ürün kodlu kiti ile daha önce toplanıp -20 °C de dondurulmuş 74 dışkı örneği ile ELISA testi çalışıldı. Kitin kullanım şekli aşağıda verilmektedir.

1. 15 gr dışkı örneği 400µL seyreltici ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı.
2. Homojen haldeki dışkı örneği iki saat bekletildi.
3. ELISA plağının bir kuyucuğuna pozitif kontrol diğer kuyucuğuna ise negatif kontrol olarak seyreltici solüsyon konuldu.
4. ELISA plağının örnekler için ayrılan her bir kuyucuğa dışkı örneklerinden 200 µL konuldu. Üzerine birer damla enzim konjugat eklendi ve iki saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Üç defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
6. ELISA plağının her bir kuyucuğuna iki damla substrat solüsyonu damlatıldı.
7. ELISA plağı on dakika karanlık ortamda bekletildi.
8. Plaktaki her bir kuyucuğa bir damla stop solüsyonu ilave edildi.
9. Dışkı örnekleri ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutuldu. 0,15'den küçük değerler negatif, 0,15'den büyük değerler pozitif kabul edildi.

#### 3.3. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu

Direkt dışkı örneklerinden QIAamp DNA stool mini (QIAGEN, Germany) (Katalog No:51504) DNA arıtma kiti kullanılarak DNA izole edildi. DNA' nın saflaştırılmasında hiçbir fenol-kloroform yöntemi veya alkolle çöktürmeye gerek yoktur. Bu kit ile DNA düşük tuz tamponunda yıkanır ve protein, nükleik asit ve diğer yabancı maddeler veya inhibitörlerden arındırılır. Aşağıda QIAamp DNA stool mini kitinin içeriği ve kullanım şekli verilmektedir.

1. Yaklaşık 180-200 mg dışkı örneği ependorf tüplerine aktarıldı.
2. Dışkı örneklerinin üzerine parçalamak için 1400 µL ASL tamponu eklenip, karışım homojen hale gelene kadar vortekslendi.
3. Dışkı örnekleri su banyosunda 70<sup>0</sup>C'de 5 dakika bekletildi.
4. Su banyosundan çıkartılan dışkı örneklerinin her birine inhibitörleri uzaklaştırmak için bir adet InhibitEX tablet ilave edildi.
5. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımlar temiz ependorf tüplerine aktarıldı.
6. Süpernatantların üzerine 15µL Proteinaz K ve 200 µL AL solusyonu ilave edildi.
7. Su banyosunda 70<sup>0</sup>C'de 5 dakika bekletildi.
8. Dışkı örneklerinin üzerine 200µL %95'lik etanol ilave edildi ve karışım vortekslenerek homojen hale getirildi.
9. Homojen hale gelen dışkı örnekleri filtreli tüplere aktarıldı.
10. Filtreli tüplere 500 µL AW1 tamponu ilave edildi.
11. 10000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi.
12. Filtreli tüplerin altındaki ependorf tüpleri atıldı ve yerine temiz ependorf tüpleri yerleştirildi.
13. Filtreli tüplere 500 µL AW2 tamponu ilave edildi.
14. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
15. Filtreli tüplerin altındaki ependorf tüpler atıldı ve yerine temiz ependorf tüpler yerleştirildi.
16. Filtreli tüplere 100 µL AE tamponu eklendi ve tüpler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
17. Filtreli tüplerin altındaki ependorf tüplerine süzülen DNA örnekleri PCR ve Real-Time PCR çalışmak için -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

### 3.4. Konvansiyonel PCR Amplifikasyonu

**3.4.1. Primerler:** *E.histolytica* türünü tanımlamak için 875 baz çifti uzunluğunda olan PSP5-PSP3 primer çifti, *E.dispar* türünü tanımlamak için ise 875 baz çifti uzunluğunda olan NPSP5-NPSP3 primer çifti kullanıldı (Çizelge 1).

Çizelge 1: PCR amplifikasyonu için kullanılan primer-nükleotid dizilimleri

Tür İsmi	Primer İsmi/Nükleotid Dizilimi	Baz Uzunluğu
<i>E.histolytica</i>	PSP5/5' GGC CAA TTC ATT CAA TGA ATT GAC 3' PSP3/5' CTC AGA TCT AGA AAC AAT GCT TCTC 3'	875 bp
<i>E.dispar</i>	NPSP5/5' GGC CAA TTT ATG TAA GTA AAT TGAG 3' NPSP3/5' CTT GGA TTT AGA AAC AAT GTT TCT TC 3'	875 bp

**3.4.2. PCR Karışımı:** *E.histolytica* ve *E.dispar* türlerini ayırt etmek için türlere özgü primerlerin kullanıldığı PCR karışımları hazırlandı.

10X KCl <sub>2</sub> tamponu	2.5 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
12,5 mM dNTP karışımı	1 µL
10 mM Forward primer	1 µL
10 mM Reverse primer	1 µL
DNA örneği	5 µL
Steril distile su	13 µL

**3.4.3. Termal Cycler Protokolü:** DNA örneklerini amplifiye edebilmek için yaklaşık üç saat süren termal cycler (Senquest, Germany) protokolü kullanıldı.

Çizelge 2: PCR amplifikasyonu için kullanılan Termal Cycler Protokolü

94°C	5 dakika	Ön Denatürasyon	→1 döngü
94°C	1 dakika	Denatürasyon	
59°C	45 saniye	Primer bağlanması	→35 döngü
72°C	1 dakika	Zincir uzaması	
72°C	10 dakika	Son döngüde zincir uzaması	→1 döngü

**3.4.4. Agaroz Jelde Yürütme:** Amplifiye edilmiş DNA örnekleri, 100-1200 bp'lik DNA ladder (Promega) ile birlikte %1'lik agaroz jelde 120 V'da 45 dakika yürütüldü. Agaroz jel etidyum bromür (5µg/ µL) de boyandıktan sonra ultraviyole ışık (UV) altında DNA fragmanları görüntülendi.

### 3.5. Real Time PCR Amplifikasyonu

**3.5.1. Primer ve Problar:** Çalışmada *E.histolytica* ve *E.dispar* türlerini ayırt etmek için multipleks real-time PCR yöntemi çalışıldı. *Entamoeba* cinsine özgü olan 231 baz çifti uzunluğunda olan Ehd-239F ve Ehd-88R primerleri, *E.histolytica* türünü tanımlamak için *E.histolytica* 96T TaqMan 1 probu, *E.dispar* türünü tanımlamak için *E.dispar* 96T TaqMan 1 probu kullanıldı (Çizelge 3).

Çizelge 3: Real-Time PCR amplifikasyonu için kullanılan primer-prob dizilimleri

Tür İsmi	Nükleotid Dizilimi-Prob Dizilimi
<i>Entamoeba spp.</i>	Ehd-239F-5' ATT GTC GTG GCA TCC TAA CTCA 3' Ehd-88R-5' GCG GAC CGC TCA TTA TAA CA 3'
<i>E.histolytica</i>	<i>E.histolytica</i> -96T prob-FAM-5' TCA TTG AAT GAA TTG GCC ATTT 3'
<i>E.dispar</i>	<i>E.dispar</i> -96T prob-HEX-5' TTA CTT ACA TAA ATT GGC CAC TTTG 3'

**3.5.2. Real-Time PCR Karışımı:** Çalışmada real-time PCR amplifikasyonu için toplam 25 µL den oluşan PCR karışımı hazırlandı.

2XMaster Mix (Roche Diagnostic)	12.5 µL
10 mM Forward Primer	1.5 µL
10 mM Reverse Primer	1.5 µL
10 mM Prob-1	1 µL
10 mM Prob-2	1 µL
DNA örneği	5 µL
Steril Su	2.5 µL

**3.5.3.Real-Time Termal Cycler Protokolü:** Real-time PCR amplifikasyonu için LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic Indianapolis, Ind) real-time PCR cihazında yaklaşık iki saat süren PCR protokolü kullanıldı (Çizelge 4 ).

Çizelge 4: Real-Time PCR amplifikasyonu için kullanılan termal cycler protokolü

95°C	5 dakika	Ön Denatürasyon	→1 döngü
95°C	10 saniye	Denatürasyon	
60°C	30 saniye	Primer bağlanması	
72°C	10 saniye	Zincir uzaması	→40 döngü

## 4. BULGULAR

Yapılan çalışmalar sonunda 74 dışkı örneğinde mikroskopi (direkt ve nativ lugol), antijen tanısı için ELISA, konvansiyonel PCR ve Real time- PCR yöntemleri çalışıldı. Çalışılan örneklerin toplu sonuçları Çizelge 5 de gösterilmektedir.

Çizelge 5: Çalışılan 74 örneğin sonuçları

Örnek No	Mikroskop	ELISA	PCR		RT-PCR	
			PSP (E. h)	NPSP (E. d)	E.h	E.d
1	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	P	N	P
3	N	N	N	N	P	P
4	P	N	N	N	N	N
5	N	P	P	N	P	N
6	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N
9	N	N	P	N	P	P
10	P	P	P	N	P	N
11	P	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N
16	P	N	N	N	N	N
17	P	P	P	N	P	N
18	N	N	N	P	P	P
19	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N	P	P	P
21	P	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N
25	N	P	P	N	P	N
26	P	N	N	N	N	N
27	P	P	P	P	P	P
28	N	N	N	N	N	N
29	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N
31	P	P	P	N	P	N
32	P	P	P	N	P	N
33	N	P	P	N	P	N
34	N	N	N	N	N	N
35	P	N	N	N	N	P

Örek No	Mikroskop	ELISA	PCR		RT-PCR	
			PSP (E. h)	NPSP (E. d)	E. h	E. d
36	N	P	P	N	P	N
37	N	P	P	N	P	N
38	N	P	P	N	P	N
39	P	N	N	N	N	P
40	P	P	P	N	P	N
41	N	N	N	N	N	N
42	N	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N	N
45	N	N	P	N	P	N
46	N	N	N	N	N	N
47	P	N	N	N	N	P
48	N	N	N	N	N	N
49	N	N	P	N	P	N
50	P	P	P	N	P	N
51	N	N	N	N	N	N
52	N	N	N	N	N	N
53	N	N	N	N	N	N
54	P	N	N	N	N	N
55	N	N	N	N	N	N
56	N	N	N	N	N	N
57	P	N	N	N	N	N
58	N	N	N	N	N	N
59	N	N	N	N	N	N
60	P	N	N	N	N	N
61	N	N	N	N	N	N
62	N	N	N	N	N	N
63	N	N	N	N	N	N
64	N	N	N	N	N	N
65	P	N	N	N	N	N
66	N	N	N	N	N	N
67	P	N	N	N	N	N
68	N	N	N	N	N	N
69	P	N	N	N	N	N
70	P	N	N	N	N	N
71	N	N	N	N	N	N
72	N	N	N	N	N	N
73	P	N	N	N	N	N
74	P	N	N	N	N	N

N: Negatif

P:Pozitif

E. h: *Entamoeba histolytica*

E.d: *Entamoeba dispar*

Çalışılan 74 örneğin 24 tanesi mikroskobide pozitif, 13 tanesi ELISA' da pozitif, 16 tanesi *Entamoeba histolytica* için kullanılan PSP primerleri ile 4 tanesi *Entamoeba dispar* için kullanılan NPSP primerleri ile konvansiyonel PCR' da pozitif bulunurken RT-PCR ile 19 tanesi *E. histolytica*, 9 tanesi *E. dispar* pozitif bulundu. Her dört yöntemde de *E. histolytica* pozitif bulunan örnek sayısı yalnızca 7 iken, ELISA, PCR ve RT-PCR yöntemlerinin üçünde de 13 örnek pozitif bulundu. Yalnızca RT-PCR ile *E. histolytica* pozitif bulunan örnek sayısı 3 iken yalnızca mikroskobide pozitif bulunan örnek sayısı 14 idi. ELISA, PCR ve RT-PCR sonuçları pozitif, mikroskobi negatif olan 6 örnek bulundu. PCR ile RT-PCR pozitif olan örnek sayısı da 3 olarak bulundu. Geriye kalan 38 örnek her dört yöntemle de *E. histolytica* negatif bulundu.

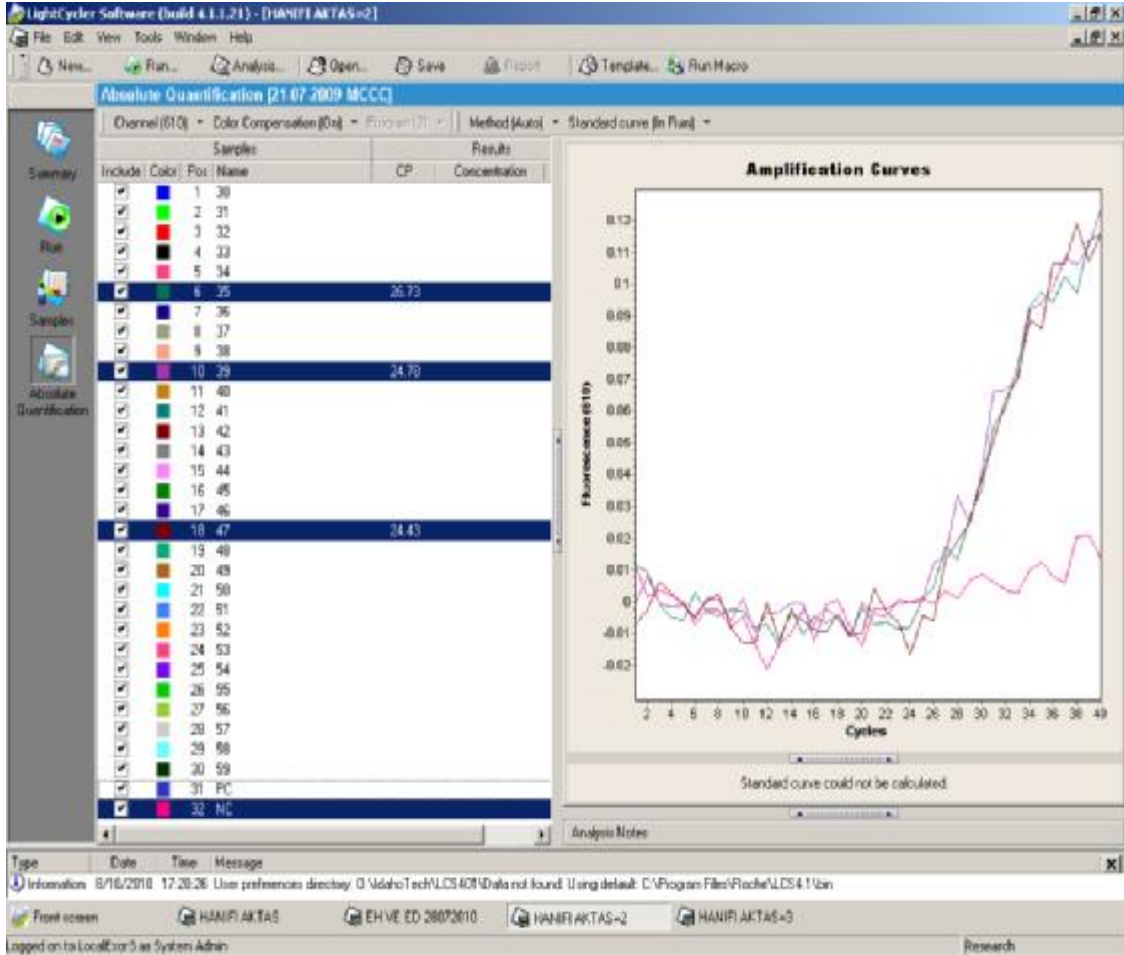
Konvansiyonel PCR ile 4 örnek *E. dispar* pozitif bulunurken RT-PCR ile 9 örnek pozitif bulundu. RT-PCR ile pozitif bulunan bu 9 örneğin 5 tanesi aynı zamanda *E. histolytica* açısından da pozitif bulundu. Bu 5 örnek her iki tür açısından da pozitif tespit edildi. Çizelge 6 da sonuçların karşılaştırılması görülmektedir.

Çizelge 6: Sonuçların karşılaştırılması

Mikroskobi	ELISA	PCR		RT-PCR		Pozitif Örnek Sayısı
		PSP	NPSP	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	
Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	6
Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif	1
Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	2
Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	1
Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	1
Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	14
Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	6
Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	3
Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	2
Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	1
Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	37

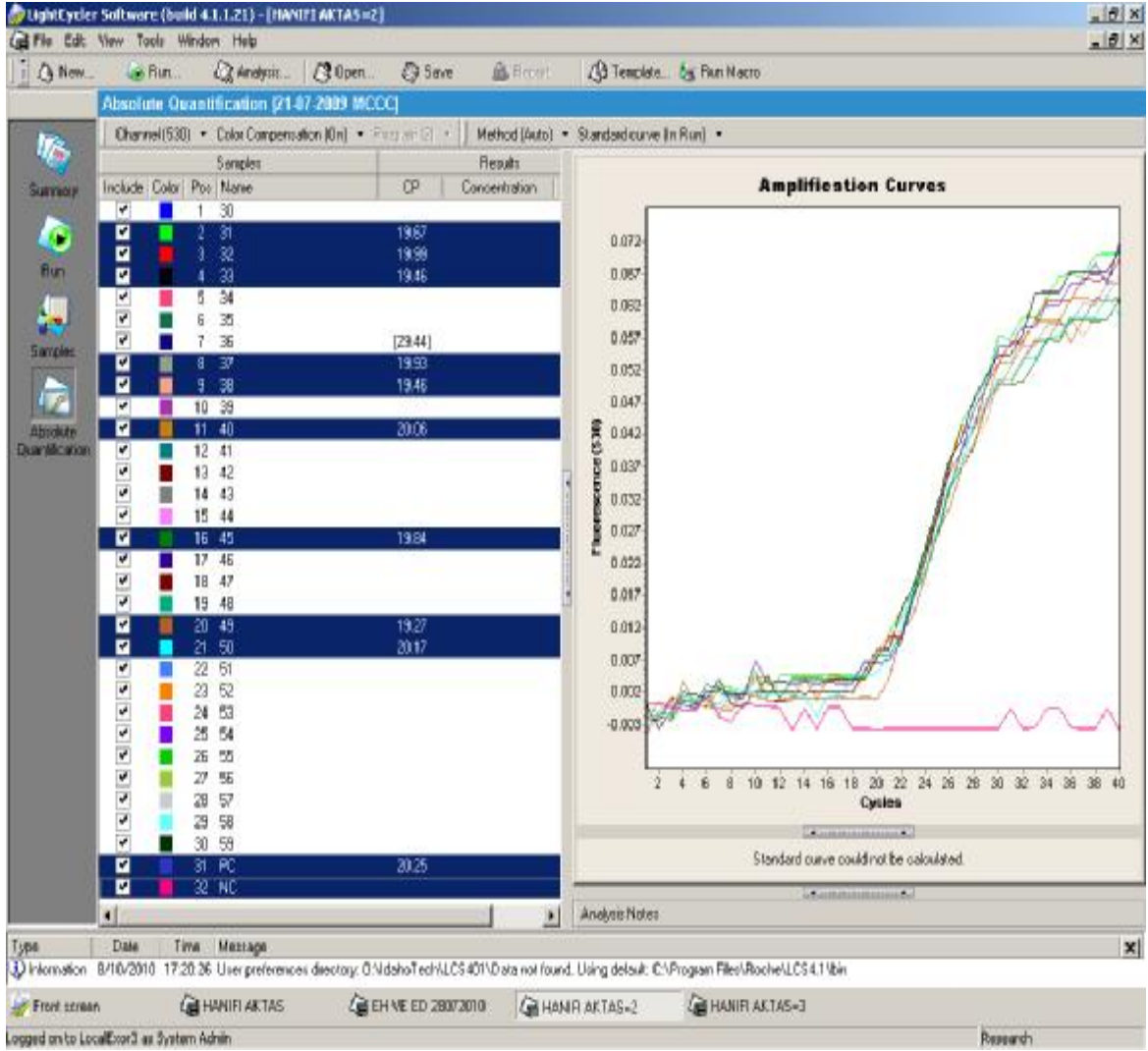


Real Time PCR’ da çalışılan testlerin *E.dispar* sonucu pozitif olan örneklerden bir grubu şekil 6’ da görülmektedir.



Şekil 6. *Entamoeba dispar* pozitif RT-PCR sonuçlarından bazıları.

Real Time PCR’ da çalışılan testlerin *E.histolytica* pozitif örneklerden bir kısmı şekil 7’ de görülmektedir.



Şekil 7. *Entamoeba histolytica* pozitif RT-PCR sonuçlarından bazıları.

Parazit türlerinin frekansları ve yüzdelerini hesaplamak için tanımlayıcı istatistiki metot kullanıldı. Kohen kappa indeksi ise mikroskopi, ELISA, PCR ve RT-PCR arasındaki kabul edilebilirliği ölçmek için kullanıldı. Testlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) Win Episkop 2.0 programı kullanılarak youden indeksi ile saptanmıştır. Çizelge 7' de örneklerin yüzde dağılımı görülmektedir.

Çizelge 7. Örneklerin yüzde dağılımı

	Mikroskopi		ELISA		Konvansiyonel PCR				RT-PCR			
					PSP		NPSP		<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Negatif	50	67,6	61	82,4	58	78,4	70	94,6	55	74,3	65	87,8
Pozitif	24	32,4	13	17,6	16	21,6	4	5,4	19	25,7	9	12,2

Çizelge 8’ de Test metotlarının duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri görülmektedir.

Çizelge 8. *E. histolytica* için test metotları duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer çizelgesi

Test		Altın Standart		Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer
		n					
				Mikroskopi			
		Pozitif	Negatif				
RT-PCR	Pozitif	7	12	29,2	76,0	36,8	69,1
	Negatif	17	38				
ELISA	Pozitif	7	6	29,2	88,0	53,8	72,1
	Negatif	17	44				
PCR	Pozitif	7	9	29,2	82,0	43,8	70,7
	Negatif	17	41				
		ELISA					
		Pozitif	Negatif				
RT-PCR	Pozitif	13	6	100,0	90,2	68,4	100,0
	Negatif	0	55				
Mikroskopi	Pozitif	7	17	53,8	72,1	29,2	88,0
	Negatif	6	44				
PCR	Pozitif	13	3	100,0	95,1	81,3	100,0
	Negatif	0	58				

TEST		Atın Standart		Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer		
		n						%	%
				RT-PCR					
				Pozitif	Negatif				
Mikroskobi	Pozitif	7	17	36,8	69,1	29,2	76,0		
	Negatif	12	38						
ELISA	Pozitif	13	0	68,4	100,0	100,0	90,2		
	Negatif	6	55						
PCR	Pozitif	16	0	84,2	100,0	100,0	94,8		
	Negatif	3	55						
		PCR							
		Pozitif	Negatif						
Mikroskobi	Pozitif	7	17	43,8	70,7	29,2	82,0		
	Negatif	9	41						
ELISA	Pozitif	13	3	100,0	95,1	81,3	100,0		
	Negatif	0	58						
RT-PCR	Pozitif	16	0	84,2	100,0	100,0	94,8		
	Negatif	3	55						

Mikroskobi altın standart olarak alındığında; ELISA, PCR ve RT-PCR' in duyarlılığı % 29,2, RT-PCR' in özgüllüğü %76, ELISA' nın özgüllüğü %88 ve PCR' in özgüllüğü ise %82 bulundu.

ELISA altın standart olarak alındığında; konvansiyonel PCR ve RT-PCR' in duyarlılığı %100 olarak bulunurken konvansiyonel PCR' in özgüllüğü %95,1 RT-PCR' in %90,2 bulundu. Burada RT-PCR' in pozitif olup ELISA nın negatif olduğu 3'ü aynı zamanda konvansiyonel PCR ile de negatif bulundu.

RT-PCR altın standart olarak alındığında mikroskobinin %36,8 duyarlılığa %69,1 özgüllüğe sahip olduğu görüldü. ELISA' nın duyarlılığı %68,4 ve özgüllüğü %100 bulunurken konvansiyonel PCR' in duyarlılığı %84,2 ve özgüllüğü de %100 bulundu.

## 5. TARTIŞMA

İnvaziv amebiyazın tanısında yaygın olarak mikroskopik inceleme, serolojik testler ve intestinal amip lezyonlarından veya karaciğer apsesinden biyopsi ile beraber kolonoskopi kullanılmaktadır. DSÖ, Pan Amerikan sağlık organizasyonu (PAHO) ve UNESCO 1997' de yapmış oldukları bildiri de *E. histolytica*'nın tedavi edilmesi gerektiği ve mikroskopik olarak *E. histolytica* ile *E. dispar*'ın ayırımının mümkün olmadığı açıklanmıştır. Günümüzde birçok hekim dışkıının mikroskopik incelemesi sonucunda önceden tanımlanmış tedaviyi uygulamaktadır. Oysa dışkı örneklerinin mikroskopi muayenesi ile konulan tanının yalancı pozitif ve negatif sonuçlarının yanı sıra patojen *E. histolytica* ve patojen olmayan *E. dispar* kistlerinin ayırımının mümkün olmaması gibi dezavantajları vardır<sup>13, 36, 37, 38</sup>.

Serolojik testler amebiyazın tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar antiamebik antikorların serumda yıllarca pozitif kalmasından dolayı endemik bölgelerde serolojik testlerle doğru tanıyı koymanın oldukça zayıf olduğunu ortaya çıkarmıştır. Antijen tanı testleri ise ishaller hastalıkların yaygın olduğu endemik bölgelerde kullanılmakta olan bir tanı yöntemidir. Gelişmekte olan ülkelerde moleküler tanı testlerinin pahalı olmasından dolayı çok kullanılamamaktadır. Diğer bir taraftan dışkı antijen testlerinin PCR' dan yüz kez daha az duyarlı olması ve bazı çalışmalarda düşük duyarlılığının diğer *Entamoeba* türleri ile çapraz reaksiyona girmesinden dolayı kaynaklandığı bildirilmektedir<sup>36</sup>.

Son yıllarda PCR ve RT-PCR gibi moleküler tetkiklerin gelişimi *E. histolytica*'ya doğru tanı konulmasında önemli mesafeler kat etmiştir. Böylece klinik tanı ve tedavinin doğru uygulanması daha da mümkün hale gelmiştir<sup>36</sup>.

Endemik bölgelerde dışkıda kistlerin görülmesi neticesinde standart yaklaşım olarak antiprotozoal ajanlar verilmektedir. Bu yaklaşım antiamebik ajanların minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerlerini yükseltmektedir ve tedavi başarısızlığı önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun sonucunda *E. histolytica*'nın potansiyel dirençli suşlarının gelişimine sebep olmaktadır. Pozitif dışkı örneklerinin tedavi öncesinde mutlaka konfirme edilmesini zorunlu kılmaktadır<sup>36</sup>.

Amebiyaza sebep olan *E. histolytica* gelişmekte olan ÷lkelerde b÷y÷k bir halk sağlığı problemidir. Morfolojik olarak benzer olan *E. dispar* ise patojen olmayan bir t÷r÷d÷r. Antiamebik ilaçların sınırlı sayıda olmasından dolayı tedavide yeni yaklaşıım gerekmektedir ve *E. histolytica* ve *E. dispar*' ın ayırımının kesin tanımlanması gerekmektedir. Asemptomatik bireylerin tedavisi oldukça yüksek bedelli ve gereksizdir. Yeni antiamebik ilaçların geliştirilmesi halen çok erken evrededir ve aşı çalışmaları uzak bir hayal gibidir. Gelecekte ilaç direncinin gelişimi hastalığın kontrolünü ciddi anlamda etkileyebilir <sup>39</sup>.

Gonin ve arkadaşları 2002 yılında klinik örneklerde ELISA ve PCR ile *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırıcı tanısını koymak için yapmış oldukları çalışmalarında 95 dışkı örneğinin 68' inde (66 *E. dispar*, 2 *E. histolytica*) *Entamoeba* pozitif bulmuşlar. ELISA' yı mikroskopi ve PCR' a göre daha az duyarlı bulmuşlar. *E. dispar* için PCR ile ELISA arasında anlamlı bir fark olduğunu saptamışlardır <sup>36</sup>.

Benzer şekilde çalışmada da 74 örneğin 13 tanesi ELISA' da pozitif 16 tanesi konvansiyonel PCR' da pozitif bulundu. Gonin ve arkadaşlarının belirttiği gibi ELISA PCR' a göre daha az duyarlı bulunmuştur.

Roy ve arkadaşları *E. histolytica*' nın tanısı için RT-PCR ile konvansiyonel PCR' ı ve antijen tarama testini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmalarında; 205 dışkı ve karaciğer apse sıvısının 101' ini ELISA ile, 90' ını konvansiyonel PCR ile 124' ünü ise RT-PCR ile pozitif bulmuşlar. RT-PCR ile karşılaştırdıklarında ELISA' yı %79 duyarlı ve %96 özgül, PCR' ı %72 duyarlı ve %99 özgül olarak değerlendirmişler. Her üç testin yüksek özgülüğe sahip olduğunu belirtmenin yanı sıra RT-PCR' ı en duyarlı test olarak değerlendirmişler <sup>11</sup>.

Çalışmamızda diğer çalışmalara benzer olarak ELISA, RT-PCR ile karşılaştırıldığında göre %68,4 duyarlı ve %100 özgül bulundu. Diğer taraftan konvansiyonel PCR ise RT-PCR' a göre %84,2 duyarlı ve %100 özgül bulundu.

Nunez ve arkadaşları 49 dışkı örneğinde multipleks PCR protokolü uygulamışlar ve 36 örneği *E. dispar* açısından pozitif, 13 tanesini hem *E. histolytica* hem de *E. dispar* yönünden pozitif bulmuşlar. Multipleks PCR protokolünün duyarlılığını %94 özgülüğünü %100 olarak değerlendirmişler. Yöntemin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir <sup>40</sup>.

Benzer şekilde RT-PCR' da *Entamoeba dispar* pozitif 9 örnek bulunurken 5 örnekte hem *E.histolytica* hem de *E. dispar* açısından pozitif bulundu. Aynı örnekte her iki türünde aynı zamanda görülebileceği unutulmamalı.

Fotadar ve arkadaşları *E.histolytica*, *E. dispar* ve *E. moshkowski*' nin PCR ile tanısı üzerine bir çalışma yapmışlar ve dışkı örneklerinde mikroskopi ve PCR test yöntemlerini uygulamışlar. 2003-2006 yılları arasında *Entamoeba* kompleksi açısından mikroskopide pozitif buldukları 110 örneği bu amaçla kullanmışlar. PCR ile 89 örnek pozitif bulunurken 21 örnek negatif bulunmuş. Pozitif örneklerin üçü yalnızca *E.histolytica*, 30' u *E.dispar* ve 22 si *E. moshkowski* için pozitif olarak değerlendirilirken 32 örnek *E. moshkowski* ve *E. dispar* için pozitif bir örnek *E.histolytica* ve *E.dispar* ve bir örnek te *E. histolytica* ve *E. moshkowski* beraber bulunmuştur<sup>41</sup>.

Blessmann ve arkadaşları dışkı örneklerinde *E. histolytica* ve *E. dispar*' ın ayırımı için RT-PCR yapmışlar. 491 örneğin 45 inde mikroskopi pozitif saptanmıştır. RT-PCR ile 29 *E. histolytica* ve 24' ünde *E. dispar* pozitif bulmuşlardır. ELISA pozitif 38 örneğin 29' unda RT-PCR pozitif bulunmuştur. Serolojik olarak pozitif bulunan 77 örnek RT-PCR' da *E. histolytica* ve *E. dispar* açısından negatif bulunmuştur. RT-PCR' ı mikroskopi ve seroloji ye göre daha anlamlı bulmuşlardır<sup>42</sup>.

Haque ve arkadaşları *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *C. parvum*' un tanısı için hem her üç parazitin amplifikasyonunda kullanılan primer ve problemleri tek reaksiyonda birleştiren çoklu RT-PCR yapmışlar hem de her bir parazit için ayrı amplifikasyon olan tekli RT-PCR yapmışlar. Elde ettikleri sonuçları hem antijen tanı testinde hem de konvansiyonel PCR' ın her ikisinde pozitif olanları altın standart olarak kabul edip karşılaştırma yapmışlardır. *E. histolytica* için çoklu RT-PCR' ı %86, tekli RT-PCR' ı %95 duyarlı, çoklu RT-PCR için %98, tekli RT-PCR için %99 özgül bulduklarını bildirmişlerdir. Mikroskobinin ise hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir<sup>43</sup>.

Kebede ve arkadaşları Etiyopya' da mikroskopi ile konulan amebiyaz tanısının yüksek prevalans ta rapor edildiğini belirterek gerçek *E. histolytica* enfeksiyonu prevalansını göstermek için mikroskopi ile tanı konmuş 108 dışkı örneğini değerlendirmeye almışlardır. RT-PCR sonucunda 30 örneği her iki tür içinde negatif

bulurken 77 örnekte *E. dispar* ve yalnızca 1 örnekte *E. histolytica* pozitif bulunmuştur. Rutin tanıda kullanılan geleneksel mikroskopinin non invaziv ve invaziv amiplerin ayırımı için yeterli olmadığını belirtmişlerdir <sup>44</sup>.

Çalışmamızda araştırmacılarla benzer olarak 74 örneğin 24 tanesi mikroskopide pozitif iken pozitif olan bu örneklerin yalnızca 7 tanesi PCR' da ve RT-PCR da pozitif bulundu. Aynı zamanda RT-PCR da pozitif bulunan 19 örneğin 12 sinde ise mikroskopi negatif bulundu. Bu mikroskopinin yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç oranının yüksek olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde RT-PCR' da pozitif bulunan 19 örneğin yalnızca 13 tanesinde ELISA ile pozitif tespit edilmiştir. Bu da RT-PCR' a göre ELISA' nın duyarlılığının oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

Qvarnstrom ve arkadaşları üç farklı *E. histolytica* RT-PCR tekniğini karşılaştırmak için SYBR Green RT-PCR' da PSP5 ve PSP3 ile NPSP5 ve NPSP3 primerlerini, Light Cycler' da E. h S26C, Ed-27C, Ehd-230F, Ehd88R, Eh-Ed A525, Eh-Ed-24R, Egh-Ed 25D primerlerini, TaqMan 1 de Ehd-230F, Ehd88R, histolytica96T, dispar96T primerlerini, TaqMan 2 de histolytica50F, histolytica132R, histolytica78T, dispar1F, dispar137R, dispar33 primerlerini kullanmışlar. Kültürden elde ettikleri trofozoitleri sayarak dilüsyonlu çalışma sonucunda konvansiyonel PCR' ın tanımlama limitini mililitrede 119 hücre olarak, SYBR Green' in tanımlama limitini 17 hücre, Light Cycler' ın tanımlama limitini 4 hücre, TaqMan1' in tanımlama limitini 1 hücre ve TaqMan2' nin tanımlama limitini 0,5 hücre olarak belirtmişlerdir. Amebiyazın spesifik ve kantitatif tanımı için 18SrRNA gen bölgesini hedefleyen TaqMan problu RT-PCR' ın en uygun yöntem olduğunu belirtmişlerdir <sup>45</sup>.

Verweij ve arkadaşları *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *C. parvum*' un dışkı örneklerinde anında tanısı için multipleks RT-PCR yapmışlar ve %100 duyarlı ve spesifik bulmuşlar ve *E.histolytica*, *G.lambliia* ve *C. parvum* gibi bağırsak parazitlerinin tanısı için oldukça duyarlı ve spesifik bir tanı yöntemi olarak RT-PCR' ın rutinde uygulanabilir bir teknik olduğunu belirtmişlerdir <sup>46</sup>.

Verweij ve arkadaşları Kuzey Gana' da yapmış oldukları başka bir çalışmada mikroskopi ile 246 dışkı örneğinde *E. histolytica*/ *E. dispar* kompleksini %39.8 gibi yüksek bir oranda bulmuşlar. Ancak bizim çalışmada kullandığımız primer ve TaqMan



problarını kullanarak yapmış oldukları RT-PCR sonucunda yalnızca bir örnekte *E.histolytica* saptamışlardır <sup>47</sup>.

Çalışmamızda araştırmacılarla aynı primerler ve TaqMan probu kullanılmış olup amebiyaz tanısında bu primer ve TaqMan probu kullanılmasının oldukça uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca hızlı sonuç vermesinin yanı sıra yüksek olan duyarlılık ve özgüllüğü de doğru tanı açısından son derece önem arz etmektedir.

Hove ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında 2591 dışkı örneğinde mikroskopi ve ELISA çalışmaları sonucunda *E. histolytica* yı %0,3, *G. intestinalis*'i %4,7, *Cryptosporidium spp*' yi %0,5 ve *Strongiloides stercoralis*' i %0,1 bulmuşlardır. RT-PCR kullanarak bu oranların *E.histolytica*' da %0,5, *G.intestinalis*'te %6, *Cryptosporidium spp*' de %1,3 ve *S. stercoralis* için ise %0,8 oranına yükseldiğini bildirmişlerdir. Trofozoit ve kist görülen 99 örneği *E.histolytica/E.dispar* olarak değerlendirmişler ve toplamda 50 örneği *E.histolytica/E.dispar* olarak copro antijen ELISA ile pozitif bulmuşlardır. Türe özgül copro antijen ELISA da yalnızca 7 örnek *E.histolytica* olarak bulunmuştur. Bu 7 örneğin yalnızca birisinin preparatında eritrosit içeren trofozoit mikroskobide görülmüştür. *E.histolytica* spesifik amplifikasyon ile RT-PCR da 13 örnek pozitif bulunmuş. RT-PCR' ın *E.histolytica* için son derece duyarlı olduğunu belirtmişlerdir <sup>48</sup>.

Visser ve ark. *E.histolytica/E.dispar* trofozoit ve kistlerinin bulunduğu 416 hastanın dışkı ve serum örneklerini toplayarak dışkıda antijen ve serumda antikor düzeylerinin güvenilir yöntem olup olmadıklarını belirlemek amacıyla referans test olarak kabul ettikleri RT-PCR ile test karşılaştırması yapmışlar. 283 örnekte *E. histolytica / E. dispar* DNA sını amplifiye edilmiş. Bunlardan 25 örnek *E. histolytica* (%8,8) ve 258 örnekte *E. dispar* (%91,2) olarak RT-PCR da tespit edilmiştir. RT-PCR' ı referans test olarak aldıklarında *E. histolytica* tanısı için kullanılan antijen testinin duyarlılığını %71 ve özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlar. Serolojik antijen tanı testinin duyarlılığını %83,3 ve özgüllüğünü %95,2 olarak bulmuşlar. Endemik olmayan bölgeler için antijen tanı testlerinin duyarlılığının düşük olduğunu belirtmişlerdir <sup>49</sup>.

Leiva ve arkadaşları Nikaragua' da mikroskopi, TPP ve PCR' ı karşılaştırmak amacıyla 134 ishalleri hastadan aldıkları dışkı örneklerinde yapmış oldukları çalışmada; mikroskobide 8 örneği (%6) *E. histolytica/ E.dispar* kompleksi olarak pozitif bulurken,

TPP de 1 örneği (%0,7) *E. histolytica*/ *E. dispar* açısından pozitif bulmuşlar. Araştırmacılar çalışmamızda konvansiyonel PCR için kullandığımız 880 baz çiftlik PSP ve NPSP primerlerini kullanmışlar ve *E. histolytica*' yı 2 örnekte (%1,5) pozitif bulurken 10 örnekte (%7,5) *E. dispar* olarak tanımlamışlar. Sonuçta TPP' in ne *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* kompleksi için nede *Cryptosporidium* spp için çok kullanışlı olmadığını belirtmişlerdir<sup>50</sup>.

Çalışmamızda 74 örneğin yalnızca 13 tanesi ELISA ile pozitif bulunurken RT-PCR ile 19 tanesi, konvansiyonel PCR ile 16 tanesi *E.histolytica* pozitif bulundu. ELISA' nın %68,4 duyarlı olduğu değerlendirildiğinde hem konvansiyonel PCR' a hem de RT-PCR' a göre oldukça düşük duyarlılığa sahip olduğu gözlenmiştir.

Singh ve arkadaşları enfeksiyon hastalıklarının tanısı için yeni geliştirilen RT-PCR yönteminin konvansiyonel PCR' a göre daha duyarlı ve daha hızlı bir yöntem olduğunu, ayrıca laboratuvar ortamından amplikon kontaminasyon riskinin az olduğu ve daha ucuz bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan çalışma anında sonucu gösterdiği ve kantitatif sonuç verdiği için daha üst bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir<sup>51</sup>.

Çalışmamızda RT-PCR ile konvansiyonel PCR karşılaştırıldığında konvansiyonel PCR' ın duyarlılığının %84,2 olduğu ve bununda RT-PCR' a göre düşük olduğu görülmektedir. 74 örneğin 19' unda RT-PCR ile *E. histolytica* tespit edilirken bunlardan ancak 16 tanesi konvansiyonel PCR ile tespit edilebilmiştir. Araştırmacıların belirttiği gibi laboratuvar kontaminasyon riskinin düşük olması yanı sıra daha duyarlı olması ve çalışma sırasında da sonucun görülebilmesi ve kantitatif sonuç vermesi RT-PCR' ın üstünlüklerini ortaya koymuştur.

Koltaş ve arkadaşları 2006 yılında yapmış oldukları çalışmalarında monoklonal antikor temelli ELISA yöntemi ile dışkıda antijen tespiti ve boyalı mikroskopi incelemesi yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda 131 örneğin 16 sında *E. histolytica*/ *E. dispar* pozitif bulurken 22 örnekte antijen pozitif bulmuşlar. Mikroskobide pozitif buldukları örneklerin 2 si ELISA negatif iken, antijen pozitif bulunan 8 örnekte mikroskobide negatif bulunmuş. Araştırmacılar ELISA yı altın standart olarak aldıklarında mikroskobinin duyarlılığını %63,6 ve özgüllüğünü %98,2 olduğunu belirtmişlerdir<sup>38</sup>.

Yapmış olduğumuz çalışmanın sonunda araştırmacılarla benzer şekilde ELISA yı altın standart olarak aldığımızda mikroskobinin duyarlılığı %53,8 ve özgüllüğü %72,1 olarak değerlendirildi. Bizim çalışmamızda 7 örnek ELISA pozitif olup mikroskobi negatif iken ELISA negatif olup mikroskobi pozitif olan örnek sayısı 17 bulundu. Araştırmacılarla benzer şekilde düşük mikroskobi duyarlılığı bulunurken onlardan daha düşük özgüllük bulunmuştur.

Stark ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmalarında *E.histolytica*'nın tanısı için kullanılan Entamoeba CELISA PATH kiti ve TechLab *E.histolytica* II kiti ile dışkıda antijen tespitini PCR ile karşılaştırmışlar ve PCR' a göre her iki testin duyarlılığının oldukça düşük (Entamoeba CELISA PATH %28 ve TechLab *E.histolytica* II %0) olduğunu bildirmişlerdir <sup>52</sup>.

Bizim çalışmamızda PCR altın standart olarak kabul edildiğinde araştırmacılardan farklı olarak ELISA testi %100 duyarlı bulundu. Ancak RT-PCR altın standart olarak kabul edildiğinde benzer şekilde %68,4 gibi oldukça düşük duyarlılık tespit edilmiştir.

Diğer taraftan Adana İl Sağlık Müdürlüğü' nün verilerine göre 2005 yılında 1121, 2007 yılında 1754 ve 2008 yılında 2057 olarak bildirilen *E. histolytica* sayıları, 2009 yılında 1127, 2010 yılında 930 ve 2011 yılında 496 olarak bildirilmiştir. Özellikle son yıllarda yalnızca mikroskobi tanısı değil hem dışkıda antijen tanı yöntemleri hem de moleküler yöntemlerin daha sık kullanılması neticesinde bu oranların daha aşağı düştüğü değerlendirilmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Amebiyaz yaklaşık son otuz yıldır hem Ülkemizde hem de bölgemizde tanı koyma kriterleri açısından ciddi bir şekilde tartışmaya açık bir enfeksiyon hastalığıdır. Ne var ki mikroskobiye alternatif olan ELISA ve moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlamasıyla bu parazitin yaygınlığının çokta fazla olmadığı ortaya çıkmıştır. Buda günümüzde ve gelecekte moleküler yöntemlerin kullanılabilirliğini daha da artıracaktır.

DSÖ belirti vermeyen bireylerde tedavinin yapılmasını uygun bulmamaktadır. İlaç direnç gelişimi olmaması için kesin tanının mutlaka konulmasını istemektedir. Bu nedenle amebiyaz tedavisinin başlamasından önce mutlaka alternatif yöntemlere *E.histolytica*'nın tanısının konulması gerekmektedir.

Bu amaçla kullanılan yöntemler arasında mikroskopi yöntemi ile tanı koymak her iki türün morfolojik yapısının aynı olmasından dolayı mümkün görülmemektedir. Oysa günümüzde birçok hekim dışkıının mikroskobik muayenesi sonucunda önceden tanımlanmış tedavi uygulamaktadır.

Çalışmamızda kullanılan RT-PCR yönteminin hem antijen tanı testleri hem de konvansiyonel PCR' a göre daha duyarlı ve özgül olduğu görülmüştür. Ülkemizde de amebiyaz görülme sıklığının gelişmiş ülkelere göre daha yüksek olduğu değerlendirildiğinde tedavi öncesinde özellikle RT-PCR gibi kontaminasyon riski düşük, daha duyarlı, çalışma sırasında sonucun görülebilmesi ve kantitatif sonuç verme avantajları bulunan tanı yönteminin kullanılmasının doğru olacağı düşünülmektedir. *E. histolytica*'nın identifikasyonu klinik parazitoloji laboratuvarlarının önemli hedefleri içerisinde olmalıdır. Moleküler tanıları *E. histolytica* ile enfekte hastaların özellikli tedavisi için sunulmalıdır ve gereksiz tedavinin meydana getireceği zararları önlenmelidir.

Sonuç olarak; Ülkemizde ve bölgemizde önemli bir sağlık sorunu olan amebiyazın etkeni olan *Entamoeba histolytica*'nın kesin tanısının konması için RT-PCR yönteminin rutinde kullanılmasının doğru olacağı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J.** Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clin Microbiol Review*, **2007**: 20; 511-532
2. **Stanley SL Jr.** Amoebiasis. *Lancet*. **2003**;361(9362):1025-1034.
3. **Marshall M M, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling C R.** Waterborne Protozoan Pathogens. *Clin Microbiol Review*, **1997**: 10; 67-85
4. **Baxt L A, Singh U.** New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis*. **2008**: 21; 489-494
5. **Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M.** *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. 5. Baskı. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları Yayın No:162 İstanbul,**1995**:511-533
6. **Harthi S A A, Jamjoom M B.** Diagnosis and Differentiation of *Entamoeba* Infection in Makkah Al Mukarramah Using Microscopy and Stool Antigen Detection Kits. *W J Med Sciences*. **2007**: 2; 15-20.
7. **Dağcı H, Erdoğan D D, Toz S Ö, 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; 45-48.
8. **Ak M, Kıracağı D.** Amoebiasis. Gap ve Parazit Hastalıkları. Ed: Özcel M A. *T Parazitol Derneği Yayın No: 11* **1993**: 71-78
9. **Parija S C, Khairnar K.** Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiology*. **2007**: 7:41

10. **Verweij J J, Laeijendecker D, Brienen E A T, Lieshout L, Polderman A M.** Detection and Identification of Entamoeba Species in Stool Samples by a Reverse Line Hybridization Assay. *J Clin Microbiol.* **2003**: 41; 5041-5045
11. **Roy S, Kabir M, Mondal D, Ibne Karim M A, Petri W A, Haque R.** Real-Time PCR Assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. *J Clin Microbiol*, **2005**: 43; 2168-2172.
12. **World Health Organization.** Amoebiasis. *Wkly. Epidemiol. Rec*, **1997**. 72: 97-100.
13. **Who/Paho/Unesco report:** a consultation with experts on amoebiasis: Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull.* **1997**;18(1):13-14.
14. **Pritt B S, Clark C G.** Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* **2008**: 83; 1154- 1160
15. **Bruckner David A.** Amebiasis. *Clin Microbiol Rew*, **1992**:356-359
16. **Çetin E.T, Anğ Ö, Töreci K.** Tıbbi Paazitoloji 4. Baskı, Yayın NO:15 *Bayda Basın Yayın Dağıtım.* İstanbul, 1985;50-67
17. **Harries J.** Amoebiasis: a review. The Royal Society of Medicine. 1982: 75; 190-197
18. **Unat E. K.** Amöbiyozarın tarihçesi. Amöbiyozlar. E: Yaşarol Ş. *T.Parazitol Derg Yayını No: 4* Bursa, **1985**:1-16
19. **Orhan V, Yaşarol Ş.** Amiplerin Morfolojisi, fizyoloji ve evrimi. Amöbiyozlar, E: Yaşarol Ş. *T Parazitol Derg Yayınları Yayın No: 1985*: 17-48
20. **Petri W A, Singh U.** Diagnosis and Management of Amebiasis. *Clin Infect Dis.* **1999**: 29; 1117-1125
21. <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html> Erişim Tarihi: 25.01.2012

22. **Tanyüksel M, Petri W A.** Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Reviews*, **2003**: 16; 713-729.
23. **Özcel M A.** Amöbiyazlarda patogenezi. Amöbiyazlar. E: Yaşarol Ş. *T. Parazitol Derg Yayınları Yayın No:4*, **1985**: 47-88
24. **Petri W A.** Pathogenesis of amebiasis. *Current Opinion Microbiology*. 2002: 5; 443-447
25. **Tengku S A, Norhayati M.** Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: A review. *Trop Biomedicine*, **2011**: 28;194-222.
26. **Özcan K, Koltaş İ S, Aras D.** Çukurova Bölgesinde Amoebosis olgularından izole edilen *E. histolytica*'nın izoenzim elektroforeziyle patojenitesinin araştırılması. *TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu*, Adana, **2000**
27. **Ardıç M, Tanyüksel M, Doğançlı L, Gün H.** Evaluation of zymodemes of pathogen and non- pathogen *E. histolytica*. *Flora*, **1998**. 3:125-133
28. **Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T.** Comparison of use of enzyme linked immunosorbent assay- based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol*, **1997**: 35: 2405-2407
29. **Günel T.** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “ Real Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, **2007**: 27; 763-767
30. **Bustin S A.** Real-Time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, **2005**: 1118-1120
31. **Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N.** The Real Time Polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, **2006**: 27; 95-125
32. <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreen> Erişim Tarihi: 25.01.2012

33. <http://home.cc.umanitoba.ca/~umbouc00/PLNT7690/presentation/TaqMan.html>  
Erişim Tarihi 25.01.2012
34. **Giesendorf B A J, Vet J A M, Tyagi S, Mensink E J M, trijbels F J M, Blom H J.** Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin Chemistry*, **1998**: 44; 482-486
35. <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html> Erişim Tarihi 25.01.2012
36. **Gonin P, Trudel L.** Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Isolates in Clinical Samples by PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol*, **2003**: 41; 237-241.
37. **Stark D, Al-Qassab S E, Barratt J L N, Stanle K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J T.** Evaluation of Multiplex Tandem Real- Time PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in Clinical Stool Samples. *J Clin Microbiol*. **2011**: 49; 257-262
38. **Koltaş İ S, Demirhindi H, Hazar S, Özcan K.** Importance of the detection of amoebic antigens in stool samples for the diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection, among children in southern Turkey. *Annals of Trop. Med. Parasitology*. **2007**:101;1-8
39. **Bansal D, Malla N, Mahajan R C.** Drug resistance in amoebiasis. *Indian J Med Res*. **2006**: 123; 115-118
40. **Nunez Y O, Fernandez M A, Nunez D T, Silva J A, Montano I, Maestre J L, Fonte L.** Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplification and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA From Stool Samples. *Am J Trop Med Hyg*, **2001**: 64; 293-297.
41. **Fotadar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J.** PCR Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkowskii* in Stool Samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol*, **2007**: 45; 1035-1037.



42. **Blessmann J, Buss H, Phuong A T N, Dinh B T, Quynh T V N, Van A L, Abd Alla M D, Jackson T F H G, Ravdin J I, Tanich E.** Real Time PCR for Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fecal Samples. *J Clin Microbiol*, **2002**: 40; 4413-4417.
43. **Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman S M M, Mondal D, Houpt E, Petri W A.** Multiplex Real- Time PCR Assay for Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg*, **2007**: 76;713-717.
44. **Kebede A, Verweij J J, Petros B, Polderman A M.** Misleading microscopy in amoebiasis. *Trop Med Inter Health*. **2004**: 9; 651-652
45. **Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway B P, Visvesvara G S, Sriram R, Silva A J.** Comparison of Real Time PCR Protocols for Differential Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *J Clin Microbiol*, **2005**: 43; 5491-5497.
46. **Verweij J J, Blange R A, Templeton K, Schinkel J, Brienen E A T, Rooyen M A A, Lieshout L, Polderman A M.** Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real Time PCR. *J Clin Microbiol*, **2004**: 42; 1220-1223.
47. **Verweij J J, Oostvogel F, Brienen E A T, Beifubah A A, Ziem J, Polderman A M.** Prevalance of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. *Trop Med Int Health*. **2003**: 8; 1153-1156
48. **Hove R J, Esbroeck M, Vervoort T, Ende J, Lieshout L, Verweij J J.** Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2009**: 28; 1045-1053.
49. **Visser L G, Verweij J J, Esbroeck M, Edeling W M, Clerinx J, Plderman A M.** Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: Performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol*, **2006**: 296; 397- 403.

50. **Leiva B, Lebbad M, Krusnell J W, Altamirano I, Tellez A, Linder E.** Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A Microscopic, Triage Parasite Panel and PCR Study. *Arch Med Res.* **2006**; 37; 529-534
51. **Singh A, Houpt E, Petri W A.** Rapid Diagnosis of Intestinal Parasitic Protozoa, with a Focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, **2009**: 547090, 8 pages
52. **Stark D, van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriot D, Ellis J, Harkness J.** Comparison of Stool Antigen Detection Kits to PCR for Diagnosis of Amebiasis. *J. Clin Microbiol*, **2008**: 46; 1678-1681

## ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Erzurum’ da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Erzurum’ da tamamladı. Trakya Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu Sağlık Teknikerliği bölümünden 1995 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı ve 1999 yılında mezun oldu. 2000 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2003 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Bir yıl ara verdikten sonra 2005 yılında doktora eğitimine başladı. Halen Sağlık Müdürlüğünde çalışmaktadır. Evli ve iki çocuğu var.