

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

***ENTAMOEBİA HİSTOLYTİCA*'NİN TANISINDA
DİREKT MİKROSKOBİ, KÜLTÜR, ELİSA VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Nazmiye Ülkü KOÇMAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ESKİŞEHİR

2012

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

***ENTAMOEBİA HİSTOLYTİCA*'NİN TANISINDA
DİREKT MİKROSKOBİ, KÜLTÜR, ELİSA VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Nazmiye Ülkü KOÇMAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Nihal DOĞAN**

**ESKİŞEHİR
2012**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Nazmiye Ülkü KOÇMAN'a ait '*Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması' adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı	Doç. Dr. Nihal DOĞAN Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Gül DURMAZ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Filiz AKŞİT Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nunTarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR
Dekan

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım değerli hocam Doç. Dr. Nihal DOĞAN'a; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Filiz AKŞİT'e, Prof. Dr. Gül DURMAZ'a, Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN'e, Prof. Dr. Tercan US'a, Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ'ye, Yrd. Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÖZ'e; çalışma bulgularının istatistiksel değerlendirme ve kırsal alandan gelen örneklerin temini ve yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Burhanettin IŞIKLI'ya ve Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul ÇOLAK'a; Eskişehir Devlet Hastanesinden dışkı örneklerinin temininde yardımcı olan Dr. Ayşe Feyda NURSAL'a; bölümümüzde birlikte çalıştığım arkadaşlarım Dr. Müge ASLAN'a, Dr. Ferhat Gürkan ASLAN'a, Dr. Emrah AYDIN'a, Dr. Semra ÖZ'e, Dr. Egemen GÖKBOLAT'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim. Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Koçman, NÜ. *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012. Amöbiyozis, *Entamoeba histolytica*'nın (*E. histolytica*) neden olduğu tüm dünyada yaygın olarak görülen bir parazit enfeksiyonudur. Gelişmekte olan ülkeler için halen önemli bir halk sağlığı sorunu olup, hastalıklı kişilerin kısa zamanda ayırıcı tanısının yapılması gerekir. Çalışmamızda *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve PCR yöntemlerinin sonuçlarının birbiriyle uyumları ve yöntemlerin performansları değerlendirildi. Bu amaçla; gastrointestinal yakınmalarla 2 farklı hastaneye başvuran hastalardan ve rastgele seçilen yedi farklı ilköğretim okulundan toplanan 977 dışkı örneği direkt mikroskopi, kültür ve trikrom boyama yöntemleri ile incelenmiştir. Bunlar arasından seçilen 351 dışkı örneğine, dışkıda antijen arayan ELISA testi ve real time multiplex PCR yöntemleri ile *E. histolytica* varlığı araştırılmıştır. Direkt mikroskopi yöntemi ile şüpheli amip kisti görülme oranı 83 (%23.6) olup, bunların 45 (%12.8) tanesi trikrom boyama yöntemi ile, 32 (%9.1) tanesi kültür yöntemi ile, 13 (%3.7) tanesi ELISA yöntemiyle, 4 (%1.1) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır. Moleküler yöntem ile 7 (%2.0) örnekte *E. histolytica* pozitif olarak saptanmış olup, bunlardan 4 (%1.1) tanesi direkt mikroskopi ile, 2 (%0.6) tanesi trikrom boyama yöntemi ile, 2 (%0.6) tanesi kültür yöntemi ile ve 1 (%0.3) tanesi ELISA yöntemi ile pozitif olarak saptanmıştır. Tüm yöntemlerle sadece 1 örnekte ortak pozitiflik saptanmıştır. Dışkıdaki inhibitör maddelerin varlığı, ekstraksiyondaki zorluklar ve ekstrakte edilen dışkı miktarında parazitin olmaması gibi nedenler moleküler yöntemler ile daha az sayıda amip kisti saptanmasına neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Entamoeba histolytica* tanısı, direkt mikroskopi, TYI-S 33 besiyeri, ELISA, Multipleks Tandem Real-Time PCR

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Proje No: 201111021

ABSTRACT

Koçman, NÜ. *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012. Amebiasis, is a common parasitic infection in all over the world, which is caused by *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). In developing countries it is still an important public health problem, and the differential diagnosis of infected persons should be done as soon as possible. In our study, detection of *E. histolytica* with direct microscopy, culture, ELISA and PCR methods and we evaluate results and methods of corelation to each other. For this reason, we study 977 stool samples which selected patients with gastrointestinal complients admitted to two different hospital and collected from randomly selected seven different primary schools. 977 stool specimens were investigated direct microscopy, culture and trichrome staining methods. 351 stool samples selected from all samples and study ELISA method and multiplex real-time PCR method. By the method of direct microscopic examination of *E. histolytica / dispar* prevalence of 83 (23.6%), and 45 of them (12.8%) found positive with trichrome stain, 32 (9.1%) of them found positive with the culture method, 13 (3.7%) of them found positive with ELISA method, 4 (1.1%) of them found positive with molecular method. By molecular method 7 (2.0%) stool sample is found to be positive of *E. histolytica*, 4 (1.1%) of them found positive with direct microscopy, 2 (0.6%) of them found positive with trichrome stain, 2 (0.6%) of them found positive with the culture method, and 1 (0.3%) of them found positive with ELISA method. In only one sample is positive with all diagnostic methods which were we used. The presence of inhibitory substances in feces, the difficulties of stool extraction and absence of the parasite in the stool extract are the reasons of false negative results of molecular methods.

Key Words: Diagnostic methods of *Entamoeba histolytica*, direct microscopy, TYI-S 33 medium, ELISA, Multiplex Tandem Real-Time PCR

Supported by: Eskişehir Osmangazi University, Project No: 201111021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL GİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	8
2.3. Mikrobiyoloji	11
2.3.1. Taksonomi	11
2.3.2. Morfoloji	12
2.3.3. Yaşam Döngüsü	16
2.3.4. Elektron Mikroskopik Yapısı	20
2.3.5. Biyokimyası ve Genomik Yapısı	21
2.3.6. Morfolojik Ayrımı	22
2.3.7. Virulans Faktörleri	25
2.3.8. Patogenez	27
2.3.9. Klinik	28
2.3.10. İmmünoloji	31
2.4. Tanı Yöntemleri	31
2.4.1. Direkt Tanı Yöntemleri	33
2.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri	36
2.4.3. Diğer Tanı Yöntemleri	42
2.5. Ayırıcı Tanı	42
2.6. Tedavi	43
2.6.1. Lümende ve Dokuda Yerleşen Trofozoitlere Etkili Olanlar	44

	Sayfa
2.6.2. Sadece Dokuda Yerleşen Trofozoitlere Etkili Olanlar	44
2.6.3. Sadece Lümende Yerleşen Trofozoitlere Etkili Olanlar	45
2.7. Korunma	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Direkt Mikroskopik İnceleme	49
3.1.1. Nativ-lugol Yöntemi	49
3.1.2. Modifiye Formol-Etil Asetat Sedimentasyon Yöntemi	50
3.2. Boyalı Mikroskopik İnceleme	51
3.2.1. Trikrom Boyası	51
3.2.2. D'antoni Solüsyonu	51
3.2.3. Schaudinn Fiksatif	51
3.2.4. Trikrom Boyama Yönteminin Uygulanması	51
3.3. Kültür Yöntemi	52
3.3.1. TYI-S 33 Besiyerinin Hazırlanışı	53
3.3.2. TYI-S 33 Besiyerine Ekim ve Değerlendirme	55
3.4. ELISA	56
3.5. PCR	58
3.5.1. Ekstraksiyon	58
3.5.2. Multipleks Tandem Real-Time PCR	61
4. BULGULAR	66
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	96
KAYNAKLAR	98
EK-1	
EK-2	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKA	Amibik Karaciğer Apsesi
BAP	Bilimsel Araştırma Projesi
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CF	Compleman Fiksasyon testi
CIE	Counter Immuno Elektroforez
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
GIAP	Galaktoz inhibe edilebilir yapışma proteini
Gal/GalNAc	Galactose/N-acetyl-D-galactosamine
HIV	Human İmmündeficiency Virüs
ID	İmmünodiffüzyon
IF	İmmünoelektroforez
Ig	İmmünoglobulin
IHA	İndirekt Hemaglutinasyon
KC	Karaciğer
LA	Lateks Aglutinasyon
MIF	Mertiyolat-İyodin-Formalin
MÖ	Milattan Önce
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PMNL	Polimorfonuklear Lökosit
rDNA	Ribozomal deoksiribonükleik asit
SF	Serum Fizyolojik
USG	Ultrasonografi
WB	Western Blot

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. <i>E. histolytica</i> morfolojik çeşitleri; A: Trofozoit, B: Prekist, C: Bir nükleuslu kist, D: İki nükleuslu kist, E: Dört nükleuslu kist	13
2.2. <i>E. histolytica</i> 'nın yaşam döngüsü	18
2.3. Entamoeba türleri kist ve trofozoitlerinin şematik görünümü	20
3.1. Parazitlerde kültür yöntemi ile ilgili algoritma	52
3.2. ELISA testi çalışılmasının şematik anlatımı	57
3.3. Ekstraksiyon işlemlerinin şematik görünümü	61
3.4. Easyleks real-time PCR cihazı	63
4.1. Şüpheli amip kisti ve eritrositler (lugol boyama 40X)	70
4.2. <i>Entamoeba coli</i> kistleri (lugol boyama 40X)	70
4.3. Şüpheli amip kisti (Trikrom boyama 100X)	72
4.4. Eritrositlerin yapmış olduğu rulo formasyonu (Trikrom boyama 100X)	72
4.5. <i>Giardia lamblia</i> kisti (solda) ve trofozoiti (sağda) (Trikrom boyama 100X)	72
4.6. Dışkı örneklerinin ELISA testi sonuçları (A1 pozitif kontrol, F4 ve E8 makroskopik olarak görülebilen pozitif örnek)	74
4.7. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile <i>E. histolytica</i> (mavi) pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)	77
4.8. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile <i>D. fragilis</i> (turuncu) ve <i>G. intestinalis</i> (sarı) pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)	77
4.9. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile <i>Cryptosporidium spp.</i> (kırmızı) pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)	78
4.10. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile <i>E. histolytica</i> (mavi) ve <i>D. fragilis</i> 'in (turuncu) beraber pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)	78

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. <i>E. histolytica</i> besiyerleri sınıflandırması	35
2.2. Amöbiyozis için kullanılan tanı testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri	41
3.1. Multipleks tandem real-time PCR yönteminde kullanılan parazitlerin gen bölgeleri ve kısaltmaları	63
3.2. PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	65
4.1. Direkt mikroskopi sonucuna göre <i>E. histolytica/dispar</i> tespit edilen olguların cinsiyete göre dağılımı	66
4.2. Tüm dışkı örneklerinin ve direkt mikroskopi sonucuna göre <i>E. histolytica/dispar</i> tespit edilen dışkı örneklerinin topladığımız bölgelere göre dağılımı	67
4.3. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinden toplanan dışkı örneklerinin ve direkt mikroskobik inceleme sonuçlarında <i>E. histolytica/dispar</i> tespit edilen örneklerin kliniklere göre dağılımı	68
4.4. İlköğretim okulu öğrencilerinden toplanan dışkı örneklerinin ve direkt mikroskobik inceleme sonuçlarına <i>E. histolytica/dispar</i> tespit edilen örneklerin sınıflara göre dağılımı	68
4.5. Dışkı örneklerinin direkt mikroskobik inceleme sonuçlarının parazit türlerine göre dağılımı	69
4.6. Trikrom boyama yöntemi ile saptanan parazitlerin dağılımı	71
4.7. TYI-S 33 besiyerine ekilen örneklerin sonuçları	73
4.8. ELISA testi sonuçları	73
4.9. Multipleks tandem real-time PCR sonuçları	75
4.10. PCR yöntemiyle pozitif çıkan olguların diğer yöntemlerle saptanan sonuçları	76
4.11. Tanıda kullandığımız tüm yöntemlerle <i>E. histolytica</i> pozitiflik oranları	79
4.12. Direkt mikroskopi yöntemi ile <i>E. histolytica/dispar</i> tespit edilen örneklerin öğrencilerin sosyodemografik özelliklere göre dağılımı	80
4.13. Kullandığımız tüm tanı yöntemlerinin birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması	81

1. GİRİŞ

Amöbiyozis, *Entamoeba histolytica*'nın (*E. histolytica*) neden olduğu tüm dünyada yaygın olarak görülen bir parazit enfeksiyonu olup bağırsak ve bağırsak dışı olarak iki farklı patoloji ile seyreder. Gelişmekte olan ülkeler için halen önemli bir halk sağlığı sorunu olup, hastalıklı kişilerin kısa zamanda ayırıcı tanısının yapılması gerekir [1]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl 500 milyon kişi *E. histolytica* ile enfekte olmasına rağmen bunların yalnız %10'unda semptomatik hastalık görülmekte, 40.000-100.000 kişinin amöbiyozis nedeni ile öldüğü tahmin edilmektedir. Hastalık ciddi fulminan amibik kolit, ekstraintestinal amöbiyozis, karaciğer apsesi gibi çeşitli ölümcül klinik tablolarla seyredebilmektedir [2]. Ülkemizde yapılan araştırmalarda da bu enfeksiyonun insidansının %3-17 arasında değiştiği saptanmıştır [3].

Parazit, *E. histolytica* kistleri içeren dışkı ile kontamine olmuş su ve gıdaların alınması ile bulaşmaktadır [1]. *Entamoeba* cinsinde morfolojik olarak birbirine benzeyen (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovski*) fakat biyokimyasal ve genetik olarak farklı türler vardır [1, 4]. Dünya nüfusunun yaklaşık %10'unun *E. histolytica*/*E. dispar* ile kolonize olduğu, bunların %90'ının apatojenik *E. dispar* ve yalnız %10'unun patojenik *E. histolytica* olduğu bildirilmektedir. Sadece direkt mikroskopik inceleme ile bu mikroorganizmaların birbirlerinden ayırt edilebilmeleri neredeyse imkansızdır. Ancak dışkı kültüründen sonra yapılan izoenzim çalışmalarıyla tür ayrımları yapılabilmektedir [2]. Bu yöntemle protozoonun rutin laboratuvar tanısı birkaç hafta sürmektedir, ayrıca özel laboratuvar, fazladan iş gücü ve malzeme gerektirmektedir [5]. Amöbiyozis tanısında kullanılan Enzim Bağlı İmmuno Sorbent Testlerinin (ELISA) çoğunun problemi ise, sonuçları *E. histolytica*-*E. dispar*-*E. moshkovski* kompleksi olarak vermeleridir [6].

İntestinal amöbiyozisin tanısı dışkının mikroskopik incelemelerinde etkenin kist ve/veya trofozoit şekillerinin görülmesi ile konulabilmektedir. Ancak bir kez yapılan mikroskopik inceleme ile parazitin kist ve trofozoitlerine rastlama şansının %33-50 olduğu, farklı zamanlarda yapılan üç dışkı incelemesi sonucunda ise bu oranın %75'e yükseldiği ifade edilmektedir. *E. histolytica* ile enfekte kişilerin dışkılarında her zaman kist ve trofozoitlerin atılımının olmaması, parazitin kist ve trofozoitlerinin diğer amip türleri, makrofaj, epitel hücresi ve lökositlerle

karıştırılabilmesi gibi nedenler tanıyı zorlaştıran etkensel faktörlerdir. Ayrıca trofozoitlerin dışkı ile atılımından 30 dakika gibi kısa bir süre sonunda bozulmaya başlaması incelemelerde deneyimli kişilere ihtiyaç duyulmasını gerektirmektedir [7].

Bu güçlükler, araştırmacıları *E. histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopik tanıyı destekleyen daha güvenilir tanı yöntemlerinin aranmasına yönlendirmiştir. Bu amaçla trikrom boyama, kültür gibi yöntemlerin yanısıra ELISA ile dışkıda antijen aranması, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi yöntemlerin direkt bakı ile birlikte uygulanmasının tanıya önemli katkılar sağlayabileceği ileri sürülmüştür [7].

Araştırmamızda *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve PCR yöntemlerinin sonuçlarının birbiriyle uyumları ve yöntemlerin performanslarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada; 01.01.2011- 31.07.2012 tarihleri arasında hastanemiz Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen dışkı örnekleri, Eskişehir Devlet Hastanesi acil servisine ishal şikayetiyle başvuran hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen dışkı örnekleri ile Eskişehir Valiliği ve Eskişehir Milli Eğitim Müdürlüğünden izin alındıktan sonra rastgele seçilen ilköğretim okullarındaki öğrencilerden ailelerinin izni olanlardan toplanan dışkı örnekleri çalışıldı. Tüm örnekler rutinde bakıldığı şekilde santrifüj edildi, direkt mikroskopik olarak incelendi, trikrom boya ile boyandı ve TYI-S 33 besiyerine ekim yapıldı. Ayrıca moleküler yöntem ve ELISA yöntemiyle çalışılmak üzere fiksatif konmadan ayrılan örnekler -70° C'de çalışılincaya kadar saklandı. Direkt mikroskopi ve kültür sonucunda şüpheli kist ve trofozoiti bulunan örneklerle multipleks real time PCR yöntemi (*Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia intestinalis*) ve ELISA testleri uygulandı.

Bu tez çalışması 'Sularla Bulaşan İntestinal Protozoonların Epidemiyolojisi ve Tanıda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması' adlı, 201111021 nolu ve 27.05.2011 tarihinde kabul edilen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Amiplerle ilgili bilinen ilk belgeler milattan önce (M.Ö.) 1000 yılında Sanskrit belgelerinden Brigu-Samhita'da yazan kanlı mukuslu diyareye ait bölümlerdir. M.Ö. 6. yüzyılda Asur ve Babil'de Kral Ashurbanipal'in kütüphanesinde muhtemel amibin bulunduğu kanlı dışkıların varlığı ile ilgili yazıtlar mevcuttur. Hipokrat (M.Ö.460-377) ait "*Corpus Hippocratorum*" da *Epidemics* ve *Aphorisms* adlı bölümlerinde muhtemel hepatik ve perianal apsedden bahsetmektedir. İkinci yüzyılda Galen ve Celcus amibik karaciğer apsesinden bahsetmişlerdir. İlk milenyum sonlarında Aretaeus, Archigenes, Aurelanus ve İbni-Sina dizanteri ve karaciğer apsesi arasındaki ilişkiye değinen faydalı eserler ortaya koymuşlardır. Amöbiyoz ortaçağda tüm dünyaya hızla yayılmaya başlamıştır. Avrupa, Asya, Pers Devleti ve Yunanistan'dan çok sayıda olgu kayıtları yapılmıştır. Parazit Yeni Dünya'ya (Amerika ve Avustralya) 16. yüzyılda Avrupalılar tarafından getirilmiştir. Avrupa devletlerinin ekonomik açıdan gelişmesi ve ticarete paralel olarak artan insan hareketleri, hastalığın hemen hemen tüm dünyaya yayılmasına neden olmuştur [8].

Fransız generali ve doğa bilgini Georges Bory (1778-1846) bu canlı için 1822 de yunanca Amoibe- değişme kelimesinden gelen *Amiba diffluens* adını önermiştir. 1830'da Ehrenberg Amoeba terimini ve Amoebida takımını önermiştir. 1845'de Siebold Rhizopoda teriminine göre sınıflandırmadaki yerini belirtmiştir. 1849'da Gros insan dişleri arasında bulduğu amibe (*Amoeba gingivalis*) adını vererek amiplerin insan vücuduna da yerleşebildiğini göstermiştir [9].

1860'da Prag'da Franz Joseph Çocuk Hastanesinde çalışan Lambl enteritten ölen bir çocuğun bağırsağında amipler görüldüğünü bildirmiştir. Leukart "Diemenschlichen Parasiten" adlı 1863'de basılan kitabında bunların amip değil patolojik hücreler olduğunu ileri sürmüştür. Daha sonraları 1919'da Dobell bunların yozlaşmış *Trichomonas hominis* olabileceğini bildirmiştir [9].

1870'de Lewis ve 1871'de Cunningham Hindistan'da koleralı hastaların %20'sinde amiplere rastlamışlar, fakat aynı amipleri sağlam insanların dışkısında da gördüklerinden bunların bağırsak hastalığı ile ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir [9].

Günümüzde kabul gören amipli dizanteri hastalığı kavramı Lösch'ün 1875 de yazdığı 'Kalın bağırsakta yığın halde amiplerin çoğalışı' adlı yazıyla başlamıştır [9, 10]. Lösch yazısında 24 yaşındaki bir Rus köylüsünü aylarca incelemiş, hastalık tablosu ve bulguları hakkında geniş bilginin yanısıra bu hastanın dışkısında bol miktarda amip görmüştür. Bu yazı günümüzde bile *Entamoeba histolytica*'nın bugün bilinen tüm özelliklerinin hemen hepsini tarif ettiği ve vakanın tipik bir amipli dizanteri olduğu kabul edilmektedir. Daha sonra plörezi, ishal, şiddetli kansızlık ve bitkinlik içinde ölen hastanın, otopside akciğerlerin üst kısmında peynirimsi odaklar ve kavernler, plevra'da yangı tespit edilmiş ve kalın bağırsaktaki bulgularla amipli dizanterinin tipik patolojik anatomisine uyan tablo saptanmıştır [9].

Lösch bulunan amiplerin patojenitesini kontrol amaçlı 4 köpek üzerinde deneyler yapmış, 18. günde öldürülen köpeklerin otopsisinde rektumdaki yaralarda tanımladığı amibe *Amoeba coli* adını vermiştir [9].

1895 yılında Casagrandi ve Barbagallo insan bağırsağında bulunan hastalık yapan ve yapmayan amip cinslerinin varlığını ileri sürmüşlerdir. Uluslararası zooloji komisyonu tarafından 28 Aralık 1954 yılında insanda parazit ve kommensal olarak bulunan *E. coli*, *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. gingivalis*, *E. polecki* için Entamoeba terimi kullanılması kabul edilmiştir [9].

Grassi, İtalya'da Fransa'nın güneyinde ve Afrika'da sağlam insanlarda olduğu gibi tifolu, koleralı, pellegralı hastaların dışkısında amipleri görmüştür. Calandruccio ile birlikte *Amoeba coli*'nin çok çekirdekli kistler yaptığını ve bunların insanlar tarafından yutulmasıyla bağırsakta geliştiğini ve ikiye bölünerek çoğaldığını bildirmiştir. Onun tariflerinin bir kısmı bugünkü *Entamoeba coli* 'ye uymaktadır [9].

1883 yılında R. Koch kolera araştırması için Hindistan'a giderken uğradığı Mısır'da dizanterili hastaların dışkısını ve bu hastalıktan ölenlerin 5'inin otopsisinde iki tanesinde karaciğer apsesi tanımlamıştır. Vakalardan dördünün bağırsak yaralarının kesitinde ve karaciğer apseli bir hastanın apse duvarında amip olarak tanımladığı cisimler görmüştür. R. Koch kolera araştırmaları sırasında Hindistan'da da aynı şeyleri görmüştür. Tanımladığı bulguları İskenderiye'de çalışmakta olan Staphanos Kartulis'i endemik dizanteri üzerine çalışmaya teşvik etmiştir [9].

Councilman ve Lafleur 1890 da 15 amipli dizanteri olgusu üzerine yaptıkları çalışmada hastalığın etyoloji klinik ve patolojik anatomi bakımından bir birim olduğunu bildirmişler, amipli dizanteri ile karaciğer amipli apsesi terimini kullanmışlardır. Bunların insanda biri hastalık yapan ötekisi yapmayan iki amip şekli olabileceği düşüncesini ileri sürmüşlerdir. Hastalık yapana 1891 de *Amoeba dysenteriae* adını vermişlerdir [9, 10].

1903 de Schaudinn insanda hastalık yapan ve yapmayan iki türü *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba coli* terimlerini tariflemişlerdir [9, 10].

1903 de Dr. Huber Berlin’de dizanteri vakasında amibin kist şekillerini tarif ederek bunların *E. histolytica*’nın evriminde bir dönem olduğunu bildirmiş, bu kistleri, *E. coli*’nin kistlerinden farklı olduğunu ve farklı bir türe ait olduğunu bildirmiştir [9].

1903 yılında Rogers amiplerin bağırsaktan vena potra yoluyla karaciğere geldiğini 1909 da Vincent hastalığın sağlam taşıyıcıları olduğu fikri üzerinde durmuştur [9].

Aynı yıllarda Filippinler’de mahkumlara amipli dizanteri bulaştırmaları ile insan deneyleri yapılmış ve sonuçlar yayınlanmıştır. Böylece *E. histolytica* ve *E. coli*’nin insan için patojenitesinin farklı olduğunu *E. histolytica*’nın bağırsakta latent halde kalabileceğini ve vücudun direnci kırılınca hastalık yapabileceğini bildirmişlerdir. Manila’da Bilibid hapisanesinde sağlam taşıyıcıların kistlerini yutturdukları 20 kişinin 18’inde enfeksiyonun meydana geldiğini, bunların da 4’ünde dizanteri oluştuğunu yazmışlardır [9].

Prowazek 1912 de *E. hartmanni*’nin küçük ırk olduğunu bildirmiştir. 1918 de Uroguvay’da Larnier ilk kez olarak kalın bağırsakta amipli granülom ve ameboları tarif etmiştir [9].

1918’de Shimura ve 1925’de E. Brumpt kisti 4 çekirdekli olan iki ayrı amip türü kabul etmişler. Brumpt bu yeni amip türüne *E. dispar* adını vermiştir [9].

Amiplerin üretilmesi için eskiden beri çalışılmıştır. *E. histolytica*’yı ilk üretenin D.W Cutler olduğu kabul edilir. 1918 de tarif edilen bu yöntemle her zaman başarılı sonuç alınmamıştır. Bu nitelikte sonuç veren teknik 1925 de W. C. Boeck ve J. Drbovlav tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunlar Locke-yumurta-serum ve Locke-yumurta-albumin’li ve biri katı ötekisi sıvı iki kısımlı iki besiyeri

tanımlamıştır [9]. 1926 da Dobell ve Laidlaw bu besiyerlerinin sıvı kısmına nişasta konmasının üremeyi arttırdığını bildirmişlerdir [9, 10]. 1961 de Diamond *E. histolytica*'nın aksenik kültürünü yapmayı başarmış ve böylece bu amibi saf halde bol miktarda elde etme, bununla bu amibin birçok özelliklerini daha iyi inceleme yolunu açmıştır [9].

1951 de Fulton ve arkadaşları *E. coli* ve *E. histolytica*'nın presipitasyonla antijence farklı olduğunu göstermişlerdir. 1953 de Goldman ve arkadaşları fluoressensli antikorlarla amipler arasında ortak ve çapraz reaksiyonlar olduğunu ortaya çıkarmışlardır. 1962 de amipler arasında antijenik farklılıklar olduğu tanımlanmıştır [9].

Diamond'un başarısından sonra saf kültürden standart antijen elde etme yöntemini 1968'de Thompson ve arkadaşları tarif etmişler ve M. N. Lunde ve L.S. Diamond 1969'da *E. histolytica* ve benzerleri amiplerin antijenlerini karşılaştırmışlardır. Sargeant ve Williams 1979'da bunların izoenzimlerinin elektroforetik farklarını da yazmışlardır [9].

Saf kültürü yapılmadan önce amöbiyozis tanısı için saflaştırılmamış antijenlerle çalışılmıştır. 1914'de İzar amipten zengin dışkının sudaki özü ile 1916'da Tribondeau ve Ficket karaciğer apsesinin özü ile komplement bağlanması deneyini yapmışlardır. Craig kültürden elde edilen amiplerle yapılan deneylerden daha iyi sonuç alınabileceğini 1927 ve 1928'de yayınladıktan sonra kültürün alkolik özüsüyle antijen hazırlama tekniği geliştirerek 1929'da tarif etmiştir. 1934'de Stone kültürde elde edilen kistleri yıkayıp saflaştırarak elde ettiği antijenle yeni bir yöntem tanımlamıştır [9].

1957'de Moan presipitasyonu, 1961'de Kessel ve arkadaşları indirekt hemaglutinasyon deneyini amöbiyoz tanımına sokmuşlardır [9]. 1964'de Jeanse ve ayrıca özellikle Goldman ve arkadaşları fluoressensli antikorlar deneyini amöbiyozda kullanmaya başlamışlardır [9].

1965'de Kessel ve arkadaşları daha geliştirilmiş komplement bağlanmasını, 1970'de Tupasi ve Healy bentonit flokülasyon deneyini kullanmışlardır. Hoffman ve Miller 1975'de dokudaki amipleri, Satman ve arkadaşları 1976'da dışkıdaki amip antijenlerini fluoressensli antikorla ortaya çıkarmanın mümkün olduğunu göstermişlerdir. 1982'de Grundy ELISA'yı, Pillai ve Mohimen Radioİmmün-

Assay'i (RAİ), dışkıda ve kandaki *E. histolytica* antijenlerini aramak için kullanmışlardır [9].

1978'de Sargeant, zymodem analizi ile kültürde *E. dispar* ve *E. histolytica* ayırımını yapmıştır. Dışkıda PCR ve antijen saptama tetkikleri ile morfolojik olarak aynı, genetik olarak farklı tipler tanımlanmıştır [10].

Amöbiyoz tedavisinin tarihçesini oldukça eskilere götürmek mümkündür. İpeka (*Cephaelis ipecacuanha* ve yakınları)'nın kökenleri Brezilya'da eskiden beri kanlı ishale karşı kullanılmış. 1587 de Brezilya'da Soares de Sousa kanlı ishallerin ipecacuanha ile iyileştiğini yazmışlardır. Bu bitkinin köklerinden elde edilen tozların 1658'de Avrupa'ya Piso adlı Portekizli bir hekim tarafından getirilerek, Fransa kralı 14. Louis'in veliahdını iyi edilerek ilaç Avrupa'ya tanıtılmıştır [9].

Pelletier ve Magendie bu bitkinin içerisinden emetini ayırıştırarak amipli dizanteri ve amipli karaciğer apsesi tedavisinde kullanılmıştır [9].

1908'de Deeks Panama Kaanalı bölesinde amipli dizanteriye karşı süt diyeti ve bizmutla başarılı sonuçlar almışlar, diğer taraftan İngiltere'de Mez 1915'de iki iyotlu emetin ve bizmutu tedavide kullanmışlardır [9].

1915'de Milian Arsenobenzol'un amöbiyozu iyi geldiğini bulmuşlardır. 1921'de Mühlens ve Menk İod-oxy-chinoilen sulfon'u yani yetreni tedaviye sokmuşlardır. Stovarsol 1923'de Marchoux, Nogue ve Leger taraflarından amöbiyoz tedavisinde kullanılmıştır. 1948 de Conan karaciğer amöbiyozuna chloroquine'in iyi geldiğini bildirmiştir [9].

1949'da McVay ve Laird ve ayrıca Most insanda amöbiyoz tedavisinde auremycin'in yararlı olduğunu bulmuşlardır. İnsan amöbiyozunda 1954 yılında Barrios, ayrıca HoeKenga ve Batteton taraflarından Camoform'un tedavide başarılı olduğu yayımlanmıştır. 1962'de Powell ve arkadaşları emetinin yerine daha az zehirli dehidroemetini ileri sürmüşlerdir. 1966'da Powell ve arkadaşları bir tek ilaçla bağırsak ve karaciğer şekillerini iyi etmek için niridazole'un uygun olduğunu bulmuşlardır. 1966'da metranidazole tedavide sokulmuştur [9].

Ülkemizde amöbiyozun eskiden beri bulunduğu tahmin edilmektedir. 1858'de Mühlig dizanteriyle karaciğer arasındaki ilişkiyi 'karaciğerin latent apsesi' başlığıyla yayınladığı bir olguda otopside rektumda nedbeler ve çekumda dizanteri ülserleri bulunduğunu bildirmiştir [9].

Macarlı Dr. Abdullah, Miralay Dr. Raşit Bey yayınladıkları kitaplarda amip olgularına değinmişler ve derslerinde bu konuyu okutmuşlardır. Bundan başka Dr. Nafiz Paşa ile Dr. Faik Beyin dilimize çevirerek 1892’de bastırdıkları Emraz-ı Umumiye adlı kitaplarında da zamana uygun bilgiler yer almıştır [9].

Gülhane Tababet-i askeriye tatbikat mektebinde Deycke ve Reşat Rıza (Kor) nın amipli dizanteri üzerine araştırmalar yaptığını 32 sayfalık yayınlarından öğreniyoruz. Daha sonraki ilerlemelerde yakından takip edilmiş ve yenilikler uygulanmıştır [9].

2.2. Epidemiyoloji

Amöbiyozis dünyada en yaygın görülen paraziter hastalıklardan birisidir. Tropik ve subtropik bölgelerde oranı %50-80'lere ulaşabilen hastalığın dünya nüfusuna oranı %10 civarındadır. Kozmopolit bir dağılım gösterir. Enfeksiyonun prevalansı, ülkelerin kültürel alışkanlıklarına, sanitasyon, alt yapı ve sosyo-ekonomik koşullarına göre değişmektedir. İklim şartları, yaş ve cinsiyetinde dağılımda önemi vardır. Bulaşmanın en üst düzeyde olduğu kalabalık ve yetersiz sanitasyonun olduğu bölgelerde hastalığın şiddeti ve komplikasyonları da daha fazla olmaktadır. Son yıllarda parazite morfolojik olarak benzeyen *E. dispar* ve *E. moshkowskii* ile karıştırılabildiği, patojen *E. histolytica*’nın daha az olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle mikroskopik tanıda sorunlar yaşanmakta, parazitlerin sınıflandırılmasında çekirdek yapıları, yalancı ayak çıkıntılarının şekli, sitoplazma içindeki oluşumların görünümünden ziyade nükleik asit dizilimleri önem kazanmaktadır [3].

Olguların %90’ı belirtisiz olarak seyreder. Okul, kreş, hastane, ceza evleri gibi toplu halde yaşanan yerlerde daha sıklıkla ve salgınlar halinde seyreder. Ülkemizdeki insidansı %3-17 arasında değişmektedir. Dünyada her yıl 500 milyon kişinin *E. histolytica* veya ona mikroskopik olarak oldukça benzeyen *E. dispar* ile enfekte olduğu, bu olguların önemli bir miktarının kolit ya da karaciğer apsesine yakalandığı ve 40-100 bin kadarının öldüğü tahmin edilmektedir. Amipler insan vücuduna giriş yolları, bulaşmayı sağlayan evrim dönemleri, vücutta yerleşmeyi yeğledikleri doku, organ ve/veya sistem ile parazitlik tiplerine göre iki ana gruba ayrılırlar [11].

Birinci grup, patojen ve apatojen türlerden oluşur. Bunların vücuda giriş yolları temelde ağızdır ve bulaşma olgun kist dönemi ile olur. Yerleşim yerleri esas olarak kalın bağırsaktır. Bu grupta yer alan patojen olan *Entamoeba histolytica*, apatojen olanlar *E. dispar*, *E. moshkowskii*, *E. coli*, *E. polecki*, *İadamoeba bütschlii*, *Endolimax nana* yer alır [11].

İkinci grupta bulunan amipler, temelde, doğada toprak ve tatlı su gibi ortamlarda özgür yaşarlar. İstemli parazitler diye tanımlayabileceğimiz bu amipler, insan vücuduna çoğunlukla burundan bazen de deriden girerler. Bulaşma trofozoit ve kist dönemleri ile gerçekleşir; vücutta esas olarak beyinde, korneada ve deride yerleşirler. Neden oldukları parazitozlardan primer amibik meningoensefalit hemen daima ölümle sonuçlanır. Bir kısmı merkezi sinir sistemine yerleşip granülamatöz ensefalite, korneada yerleşenleri keratite yol açar ve gözün kaybına neden olabilir. *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* türleri, *Balamuthia mandrillaris* ile leptomyxid amip türleri bu grupta yer alır [11].

Tüm amipler yaygın şekilde görülmekte ve nispeten basit bir yaşam döngüleri bulunmaktadır. Enfeksiyöz formu kistlerdir ve bunların direkt fekal-oral yolla kontamine olmuş su ve yiyeceklerin alınması ile enfeksiyon meydana gelmektedir. Kistler intestinal sisteme vardığında ekskistasyona uğrar, trofozoitler açığa çıkar. Trofozoitler için elverişsiz şartlar olduğu zaman enkistasyon kolon içerisinde oluşmaktadır. Kistler dışkı ile dış ortama atıldıktan sonra su ve nemli toprak içerisinde günler ile haftalar boyunca canlı kalabilmektedirler. Organizmanın endemik olduğu bölgelerde sanitasyon şartlarının sağlanması enfeksiyondan korunmak için şarttır [12].

E. histolytica insanın kalın bağırsağında, mukoza kriptlerinde zaman zaman apatojen olarak bulunmakta, bakteri ve gıda artıkları ile beslenmekte, bazen ise patojen olarak dokulara invazyon yaparak enfeksiyon oluşturabilmektedir. Katı besinler yalancı ayaklar (pseudopod) ile stoplazmaya alınmakta, sıvı besinler ise yüzeyden absorbe edilmektedir. İnsan bağırsağında bulunan bakteriler, *E. histolytica*'nın bağırsakta yayılış ve üremesine yardım etmektedirler [13].

Amöbiyozis dünyada ikinci sıklıkta görülen paraziter hastalık olup DSÖ verilerine göre malarya ve şistozomiazis sonrası üçüncü en sık ölüm nedenidir [2, 10]. Gelişmekte olan ülkelerdeki asemptomatik bireylerde amip prevalansı %1-

21'dir. Almanya'dan tropikal bölgelere seyahat sonrası geri dönüşlerde *E. histolytica* prevalansı %0.3 olup, gelişmiş ülkelerdeki yüksek risk grubunda prevalans %4'tür. Esas olarak Orta-Güney Amerika, Afrika ve Hindistan'da yaygındır. Tropik ve ılıman tüm bölgelerde endemiktir. Bazı tropik bölgelerde ve kötü sanitasyon olan ülkelerde antikör prevalansı %50'nin üzerindedir. Gelişmiş ülkelerde nadir görülmektedir. 1993'te CDC'in (Center for Disease Control and Prevention) raporladığı 2970 amöbiyozis olgusunun yarısını göçmenler oluşturmaktadır [10].

1980'li yıllarda dünyada 480 milyon kişinin bu parazitle enfekte olduğu, bunların 50 milyonunda hastalık belirtilerinin saptandığı, yılda yaklaşık 110 bin kişinin de bu parazitozdan yaşamını yitirdiği bildirilmiştir. Homoseksüel kişiler arasında, amöbiyozun nadir de olsa anal-oral seks esnasında bulaşabileceği, normal eşler arasında da servikal amöbiyoz ve penis amöbiyozunun görüldüğü bildirilmiştir [11].

Amöbiyozun epidemiyolojisinde insan dışında diğer canlıların bir rolü yoktur. *E. histolytica*'nın keme, köpek ve maymunlarda da görüldüğü bildirilmiş ise de bu canlılar insan amöbiyozis üzerinde etkili değildir. Kistleri içeren dışkıları kontaktan sonra yiyecek içeceklere konan sinekler ve hamam böcekleri de epidemiyolojik yönden önemlidir. HIV (human immündeficiency virüs) pozitifler ve laboratuvar çalışanları da risk altındadır. Prevalans üzerinde yaşın ve cinsiyetin (karaciğer amöbiyozisi hariç) etkisi yoktur fakat çocuk ve yaşlılara genç erişkinlerde daha sık görülür. Karaciğer amöbiyozisinin erişkin erkeklerde daha sık görülmesinin nedeni açıklanamamıştır. Amerika ve Japonya gibi ülkelerde kistlerle kontamine su kullanımına bağlı epidemiler görülmüştür [11]. Meksika'da görülme oranı 5-9 yaş arası çocuklarda %11 iken, bazı endemik bölgelerinde prevalans %80'leri bulmaktadır [10].

Amöbiyozda kaynak, bağırsağında *E. histolytica* bulunan ve parazitin kistlerini dışkılarıyla dışarı atan kişilerdir. Bu nedenle diyareli kişiler dışkıları ile dış ortama trofozoit attıkları için enfeksiyon kaynağı olamazlar. Kist, dış ortamda uygun koşullarda (en önemli faktör çevre ısısıdır) iki ay kadar canlı kalabilir; fakat kurumaya, 55°C'nin üstündeki sıcaklığa, normalden yüksek orandaki klor ve/veya iyota, %5-10'luk asetik asite ya da kaynatmaya dayanıksızdır [11].

E. histolytica'ya karşı aşı geliştirmek için araştırmalar devam etmesine rağmen hala hazırda bir aşı bulunmamaktadır [12].

2.3. Mikrobiyoloji

2.3.1. Taksonomi

Amiplerin birçoğu sularda, nemli toprakta özgür olarak yaşarken, bir kısmı da insan ve hayvanların sindirim sisteminde parazit veya sığıntı şeklinde bir yaşam sürdürmektedirler [13].

Buna göre amipler aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır:

Phylum	: Protozoa
Subphylum	: Sarcomastigophora
Superclass	: Sarcodina
Class	: Rhizopoda
Ordo I	: Amoebida
Familya	: Endamoebidae
Genus I	: <i>Entamoeba</i>
	<i>E. histolytica</i>
	<i>E. dispar</i>
	<i>E. moshkowskii</i>
	<i>E. coli</i>
	<i>E. hartmanni</i>
	<i>E. polecki</i>
	<i>E. gingivalis</i>
Genus II	: <i>Endolimax</i>
	<i>E. nana</i>
Genus III	: <i>Iodamoeba</i>
	<i>Iodamoeba bütschlii</i>
Ordo II	: Schizopyrenida
Familya I	: Wahlkampfiidae
Genus I	: <i>Naegleria</i>
	<i>N. fowleri</i>

N. gruberi

N. jadini

Familya II : Acanthamoebidae

Genus I : *Acanthamoeba*

A. castellani

A. culbertsoni

A. polyhaga

A. astronyxis

Bu amipler nükleus yapılarına, yalancı ayaklarının şekil ve hareketlerine, sitoplazma içindeki oluşumlarına göre birbirlerinden morfolojik olarak ayrılmaktadırlar [13, 14].

Entamoeba cinsi: Nükleusu küçük, karyozom ortada veya ortaya yakındır. Nükleusun iç yüzünde periferik kromatin tanecikleri vardır. Bu kromatin tanecikleri düzenli veya düzensiz şekilde bulunabilmektedir. İnsanda *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkowskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *E. gingivalis* türlerinin yaşadığı bilinmektedir [14, 15].

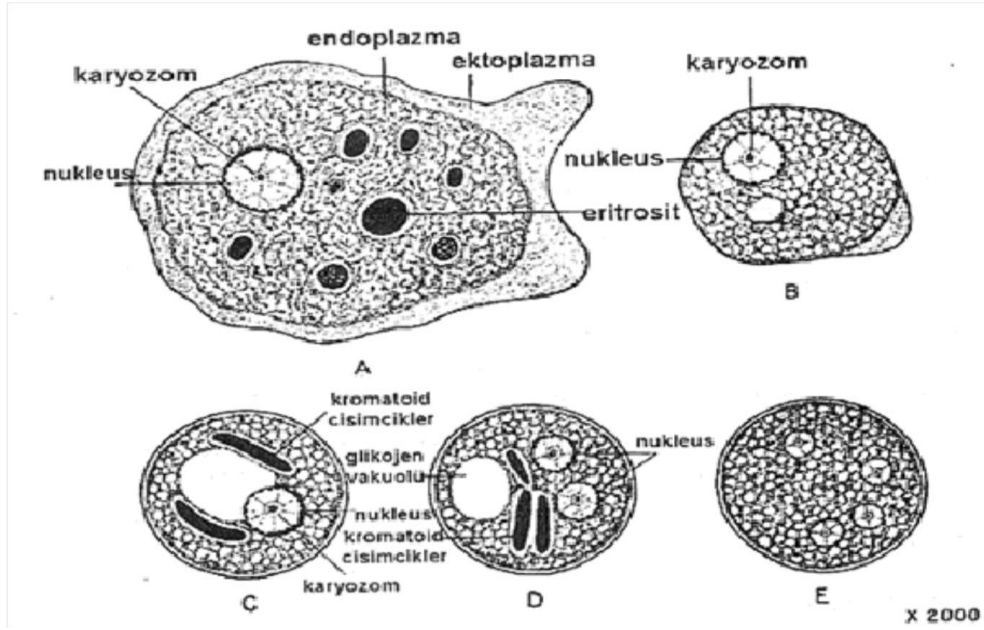
Endolimax cinsi: Nükleus içindeki karyozom büyük ve düzensizdir. Periferik kromatin tanecikleri bulunmamaktadır. Nükleus zarı ile karyozom arasında akromatik iplikler vardır. İnsanda bulunan türün *Endolimax nana* olduğu bildirilmektedir [14, 15].

Iodamoeba cinsi: Nükleuslarının karyozomu büyük, yuvarlak ve merkezidir. Karyozomun etrafı akromatik ve koyu boyanmayan taneli bir tabaka ile çevrilidir. Nükleus zarı içinde periferik kromatin tabakası yoktur. İnsanda bulunan türün *Iodamoeba bütschlii* türü olduğu bildirilmektedir [14, 15].

Dientamoeba cinsi: İki adet nükleusları bulunmaktadır. Karyozomları 4-6 parçalı kromatinden oluşmuştur. Nükleus zarı içinde periferik kromatin tanecikleri bulunmamaktadır. İnsanda bulunan türün *Dientamoeba fragilis* olduğu bildirilmektedir [14, 15].

2.3.2. Morfoloji

Amöbiyozis etkeni *E. histolytica* kamçısız bir protozoon olup insanda kist, prekist, trofozoit, metakist ve metakistik trofozoit şekilleri görülmektedir [13] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *E. histolytica* morfolojik çeşitleri; A: Trofozoit, B: Prekist, C: Bir nükleuslu kist, D: İki nükleuslu kist, E: Dört nükleuslu kist [13]

Trofozoit Şekli: Büyüklükleri 12-60 μm boyutları arasında değişmektedir. Taze dışkıdan hazırlanan mikroskopik preparatlarda trofozoitler genellikle hareketli görülmektedir. Konak dışındaki koşullara dayanıksızdır ve dakikalar içinde parçalanır. Genellikle kanlı-mukuslu taze dışkılarda görülür ve kistten daha büyüktür. Trofozoitten birdenbire çıkan, başlangıçta ektoplazmadan oluşan, parmak şeklinde yapılar vardır. Bunlar amibin yer değiştirmesini sağlar. Bu yapılar pseudopod (yalancı ayak) denir. Taze dışkılarda hızlı hareket ederken, beklemiş dışkılarda yavaş ve yalancı ayak kısa ve geniş şekilde görülmektedir. Trofozoitte pseudopodların olduğu bölgelerde ektoplazma ve endoplazma olarak iki bölge ayırt edilebilir. Ektoplazma, homojen ve saydam görünümünde, endoplazma ise granüllüdür. Bekleyen dışkıda; amip önce küt pseudopodlar çıkarır, daha sonra hiç çıkarmaz, endoplazmada vakuoller belirir, anormal şekiller görülür. Düşük ısı ve pH değişikliklerinde trofozoit hareketi yavaşlar ve durur. Normal mide asiditesine dayanıksızdır. Çekirdek 3-7 mikron büyüklüğünde, canlı iken fark edilmezler, fakat tespit edilip boyanınca (özellikle Heidenhain'ın demirli hematoxilen boyası ile)

içyapısı görülür. Nativ-lugol incelemede çekirdek ve vakuoller gözlenemez. Çekirdeğin karyozomu ortadadır, büyüklüğü ise 0,5 mikrondur, etrafında şeffaf bir bölge vardır. Karyozomla çekirdek zarı arasında lignin iplikleri üzerinde kromatin tanecikleri bulunmaktadır. Çekirdek zarının iç yüzünü örten kromatin tanecikleri hemen hemen her yerinde aynı kalınlıkta olan bir tabaka halinde çevre kromatinini oluştururlar veya ancak dar bir ay şeklinde çeperin bir yerinde yerleşir. Nükleus zarı dış şartlara dayanıksız olup, kuru ortamda birkaç dakika 37°C'de 2-5 saatte ölür. Serum fizyolojik içerisinde 4°C'de 11 gün boyunca canlı kalabilir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde belirgin bir plazma zarı, az gelişmiş endoplazma ağı 0,2-2 mikron çapında birçok vakuol, glikojen demetleri ve bazen kristalimsi yapılar görülür. Fakat golgi aygıtı ve pürüklü endoplazma ağı bulunmamaktadır [11, 13, 16].

Trofozoitin iki tipi bulunmaktadır:

a. Doku şekli: Hastalandırıcı veya doku eritici formu da denilmektedir. Patojen olan bu form 20-60 µm çapında görülmektedir. Hastalık oluşturması esnasında sitoplazması içinde 1-10 arasında eritrosit bulunabilir (Şekil 2.1). Endoplazma ince ganüllü olup, nükleus fizyolojik tuzlu su ile hazırlanan taze preparatlarda seçilememektedir. Boyanmış amiplerde nükleus kese biçiminde ve amibin büyüklüğü ile orantılı görülmektedir. Nükleus zarı ince olup, aynı büyüklükteki periferik kromatin tanecikleri, bu zarın iç yüzünde düzgün olarak sıralanmış olup, nokta gibi küçük ve merkezi karyozom, karyozom ile çekirdek zarı arasında uzanan linin iplikleri bulunmakta, bu iplikçikler üzerinde kromatin tanecikleri bulunmamaktadır [11, 13].

b. Bağırsak boşluğu tipi: Sığıntı, apatojen, minuta veya tetragena adı da verilmektedir. Doku şeklinden daha küçüktür. 12-20 µm çapında, sitoplazma içinde eritrositlerin görülmediği trofozoit şekilleri, akut amipli dizanteri dönemini geçirmiş kişilerin ve portör olanların dışkılarında bulunmaktadır [11, 13].

Taze dışkılarda *E. histolytica*'nın trofozoit şekillerinde görülen yalancı ayakların parmak şeklinde oluşu ve hızlı hareket edişi, trikrom ile boyalı preparatlarda ise nükleus zarı içinde düzenli periferik kromatin tanecikleri, küçük merkezi karyozomun olması ve sitoplazmada eritrositlerin görülmesi hastalık oluşturan patojen *E. histolytica* için tanıtıcı özellikler olarak bilinmektedir [11, 13].

Prekist şekli: Hastalığın kronikleştiği durumlarda ve tedavi olan kişilerin dışkılarında görülmektedir. Trofozoitlerin bölünmesinden sonra oluşmakta ve kist dönemi öncesi besin vakuollerinin kaybolmasından sonra, nükleus yapısı trofozoitin nükleus yapısına benzemektedir. Ektoplazma ve endoplazmanın ayrılmadığı, sitoplazmasında çomak şeklinde ve tanecikler halinde kromatoid cisimciklerin görülebildiği geçici bir şekil olarak bilinmektedir (Şekil 2.1) [11, 13].

Kist şekli: Kistler çevre koşullarına dayanıklı formlar olarak bifazik protozoonların yaşam döngüsünde yer alırlar. Etrafi plazma zarına ek olarak, bir kist duvarı ile çevrilmiştir. Prekistlerden oluşan evrim şekilleri olup, büyüklükleri ortalama 12-15µm arasında bulunmaktadır. Kistler özellikle nemli koşullarda haftalarca, aylarca canlı kalabilirler. Bir konaktan diğerine geçiş olduğu için makroçevre koşullarına ve mide asiditesine dirençlidir. Kistler oda ısısındaki dışkıda 10 gün, kuru ortamda 1-2 gün canlı kalabilirler. -50°C’de donmaya ve normal klorlanmaya dayanıklıdır. İçme sularında 1 ay canlı kalmalarının epidemiyolojik önemi vardır. Prekist, olgun kist formuna dönüşürken büzülür ve besin vakuolleride sıkışarak daha belirgin hale gelir. Kistler hareketsiz, yuvarlak, 1-2-4 nükleuslu, 0,5µm kalınlığında bir kist zarı ile çevrili olup, boyanmamış preparatlarda dört nükleuslu olgun kistlerinde nükleuslar ve vakuol görülememektedir. Bir iki nükleuslu kistler içinde görülebilen kromatoid cisimcikler ise kist oluştuktan bir süre sonra yani dört nükleuslu olgun kistlerde kaybolmaktadırlar. Kistler içinde görülebilen kromatoid cisimcikler bir veya iki adet olup, ışık kırıcı, sosis şeklinde görülmektedir. Bir veya iki nükleuslu kistlerde görülen vakuol, iyotla boyalı preparatlarda esmer-kırmızı renkte görülmekte olup, demir hematoksilen, MIF veya trikrom ile boyanmış preparatlarda kistler içindeki nükleuslar daha güzel fark edilmektedir. *E. histolytica* kistleri şekilli dışkılarda görülmektedir. Dış koşullara dayanıklı olan dört nükleuslu olgun kistler hastalığın yayılışında birinci derecede rol oynamaktadırlar. *E. coli*’nin dört nükleuslu kistleri glikojen vakuollerinin ve kromatoid cisimciklerin bulunması ile *E. histolytica*’nın dört nükleuslu kistlerinden ayrılabilir. Genellikle *E. coli*’nin sekiz nükleuslu kistlerine dışkılarda rastlanabilmektedir [11, 13] (Şekil 2.1).

Metakist şekli: Olgunlaşmış dört nükleuslu kistlerin su ve yiyecekler aracılığı ile sindirim yolundan alınmasından sonra, bağırsaklarda dört nükleuslu metakistik amip şekline dönüşmektedir [11, 13] (Şekil 2.1).

Metakistik trofozoit şekli: Metakistte bulunan nükleusların bölünmesiyle sekiz adet nükleus etrafına sitoplazma toplanarak küçük amipler (amoebula) oluşmaktadır. Bu amipler kalın bağırsağa yerleşirler ve burada büyüyerek, çeşitli etkenler sonucu patojen trofozoitler veya sığıntı trofozoitler şekline dönüşmektedirler. Pseudopodlarını salan bu formlar litik etkili salgıları ile dokuları eriterek kalın bağırsak çeperine girer. Burada yerleşir, beslenir, büyür ve ikiye bölünerek çoğalır. Basit ikiye bölünme şeklindeki çoğalmanın ne kadar sürdüğü ve ne gibi koşullarda trofozoitin kist haline geçtiği tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. İkiye bölünerek çoğalan bu formlar daha sonra mukozanın salgı bezlerini parçalayarak yayılır ve amip apselerini oluşturur [11, 13].

Entamoeba histolytica trofozoitleri kolon boşluğunda veya duvarında bulunur. Özellikle çekum ve rekto-sigmoidal bölgede yerleşir ve bölünerek çoğalır. Ülserlerde gelişimini ve üremesini sürdüren bu formlar magna formlarıdır. Kapiller cidarında erimeler ve kanamalar oluştururlar. Açılan deliklerden damarlara giren amipler kan yoluyla başta karaciğer olmak üzere akciğere, beyine, perikarda, böbreklere ve genital organlara taşınarak bağırsak dışı amöbiyoz olgularına yol açar. Sağaltımla, organizma direnci ya da beslenmesini sekteye uğratacak şartların gelişmesi ile bağırsak kanalında bulunan trofozoitlerin bu formları varlıklarını sürdürebilmek amacıyla daha dirençli prekist ve kist formlara dönüşür [17].

2.3.3. Yaşam Döngüsü

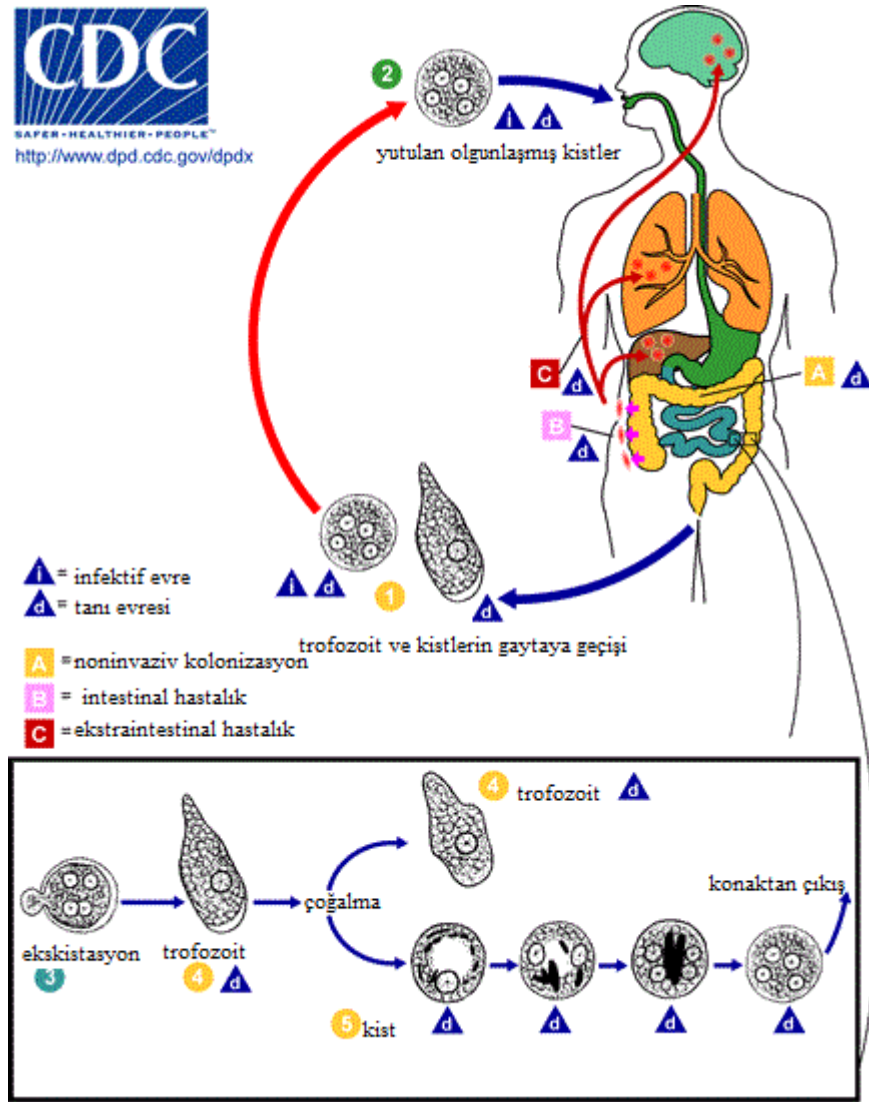
Evrin dönemleri konak zinciri, insan-insan-insan olarak uzanır. Parazitin bir konaktan diğerine geçişi ancak dört çekirdekli olgun kistlerle olur. Nadiren gerçekleşen doku nakli ile bulaşmalar trofozoit evresiyle olur [11].

Bu parazitin yaşam döngüsünde temelde üç farklı dönem ayırt edilebilir. Fakat vücuttaki her yerleşmede bu üç dönemin birbirini izleyerek görüleceği sanılmamalıdır. Bu dönemler;

- Parazitin kalın bağırsakta kolonizasyonu,

- Parazitin kolonize olduğu odaktan ve/veya başka bir noktadan bağırsak çeperini istila etmesi, yayılması,
- Bağırsak çeperini istila eden parazitin buradan hareketle diğerk organlara kan (hematojen) veya komşuluk yoluyla yayılması [11].

Kalın bağırsakta kolonizasyon: İnsan vücuduna giren kistlerden bağırsakta amipler oluşur (Şekil 2.2). Bunlar, büyürler ve bağırsak boşluğu şekline (minuta) geçerler. İkiye bölünerek çoğalırlar. Bu sırada önce çekirdek ve sonra sitoplazma bölünür. Sitoplazma sindirilmiş eritrosit içerir. *E.histolytica* trofozoiti her zaman tek nukleusludur. Çevre şartlarına dayanıksızdır ve dakikalar içinde parçalanır. Yeni bölünmüş amiplerde karyozom az çok eksantrik olabilir. Sonunda prekist ve kist oluşur (Şekil 2.2). Kistlerin içinde de çekirdekler bölünerek 2 ve daha sonra 4 çekirdekli kistler oluşur. Kalın bağırsakta yerleşmede, ağızdan alınan dört çekirdekli olgun kist, mideden geçerek, konağın ince bağırsağının son kısımlarında, ortamın nötral veya hafif alkali olduğu ilioçekal bölgede açılır (Şekil 2.2). Evrim dönemlerinden geçerek trofozoite dönüşür ve kalın bağırsakta yerleşir. Ağızdan alınan bir kistten ilk planda dört trofozoit gelişir (Şekil 2.2). Çekumun hareketi normal, ortamın oksijen seviyesi düşük, bakteri florası da yeterli ise trofozoitler, glandular kriptlerde rahatlıkla yerleşir. Trofozoitlerin her biri ikiye bölünerek logaritmik olarak çoğalır ve kolonize olur. Fakat eğer çekal bölgede hareket hızlı ise kolonizasyon engellenir. Kolonizasyon gerçekleştikten bir süre sonra parazit, önce prekist sonra da kist dönemine dönüşerek yeniden konak dışkısıyla dışarı atılır (Şekil 2.2); dış ortamda olgunlaşır, dört çekirdekli kist şekline dönüşür. Kontamine besinler ve sularla vücuda tekrar girer. Böylece de normal yaşam döngüsü tamamlanır. Bazı araştırmacılar bu döngüyü normal dönemli evrim olarak tanımlamaktadırlar [11, 16].



Şekil 2.2. *E.histolytica*'nın yaşam döngüsü [18]





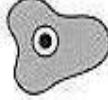







Bağırsak çeperinin istilası: İkinci durumda yani *E. histolytica*'nın klasik kaynaklarda patojen dönemli evrim denilen yaşam döngüsünde ise parazit konağının bağırsak çeperini istila eder. Patojen döngüde ilk asama bağırsak amöbiyozu oluşturmaktadır. Bağırsak amöbiyozunda *E. histolytica* trofozoitleri kalın bağırsak mukozasına girerek orada yüzeysel ülserlere neden olmakta, bu ülserler derinleşip submukozayı da içine alarak, mukozadaki ağzı dar, submukozadaki ağzı geniş, şişeye benzeyen tipik amip ülserlerine dönüşmektedir. Trofozoidin bağırsak çeperini hangi koşullarda istila ettiği bugün bile tam olarak açıklık kazanmamıştır. Fakat bu durumdan hem konağa hem de parazite ait etmenlerin sorumlu olduğu görüşü

hakimdir. Çeperin istila edilmesiyle birlikte enfeksiyonda doku dönemi başlar ve parazit, litik enzimlerinin yardımı ile dokuda yayılır [11, 16].

Diğer dokulara yayılma: Kalın bağırsak çeperinde yerleşen ve çoğalan *E. histolytica* trofozoitleri, buradan kan veya komşuluk yoluyla diğer organlara da geçer ve böylece üçüncü dönem gerçekleşir. Bağırsak dışı amöbiyozuna genelde karaciğerde rastlanır. Amip, karaciğere gidip orada çoğalır ve apse oluşumuna neden olur. Doku döneminde parazitin sadece trofozoit şekli görülür, kist evresi görülmez. Doku nakliyle bulaşma olmadıkça da parazitin ikinci bir konağa geçmesi söz konusu değildir. Yani dokunun istilası ile birlikte, eğer kalın bağırsak lümeninde kolonizasyon devam etmiyorsa, parazitin neslinin devam olasılığı ortadan kalkar. Elsdon-Dew, *E. histolytica* 'nın dokuyu istilasını bir tür intihar olarak ele almıştır [11, 16].

Entamoeba türlerinin tanımlamasında sıklıkla mikroskopik tanıya dayalı parazitlerin trofozoit ve kist büyüklükleri, matür kistlerdeki nukleus sayısı nukleer yapı gibi özelliklerine dayanır. *E. histolytica* 2 morfolojik formda bulunur: dört nukleuslu enfektif kist (10-15µm) ve daha hassas, hareketli, vejetatif ve potansiyel patojenik trofozoit (10-60µm) [1].

E. hartmanni'nin trofozoitinin yuvarlak şekli genellikle yoktur, 12 µm'den küçüktür ve en küçük Entamoeba trofozoitidir. Kistler yuvarlaktır, 10 µm'den küçüktür ve sıklıkla 2 nukleusludur. *E. hartmanni*'nin kist evresi klinik muayene maddeleri (smear) boyandığında tipik nukleer yapı ve yuvarlak veya köşeli uçlu kromatin iplikleri ile karakterizedir. Boyanmamış kistler diğer Entamoeba türlerinden net olarak ayrılamaz. Boyalı *E. hartmanni* trofozoitleri *E. histolytica* trofozoitlerine benzer ama daha küçük yapıdadır (Şekil 2.3). Bu parazitler eskiden *E. histolytica* sinonimi veya "küçük" *E. histolytica* olarak bilinirlerdi. Ancak artık ayrı bir kommensal veya nonpatojen parazitler oldukları bilinmekte ve tedavi önerilmemektedir. *E. coli*'nin trofozoitleri büyük, düzensiz ve eksentrik karyozomlu, irregüler uzantıları olan periferik nukleuslu yapılardır. *E. coli*'nin kistleri sferik ve sekiz nukleuslu, düzensiz karyozomlu ve periferik kromatinlidirler (Şekil 2.3). Hem *E. coli* hemde *E. hartmanni*'nin trofozoitleri sindirilmiş bakteri içerirler [1].

AMİPLER						
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Entamoeba hartmanni</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Entamoeba polecki*</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Iodamoeba bütschlii</i>
TROFOZOİT						
KİST						

Şekil 2.3. Entamoeba türleri kist ve trofozoitlerinin şematik görünümü [3]

2.3.4. Elektron Mikroskopik Yapısı

Plazma Membranı (plasmalemma): Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde plazmalemma'nın 12 nm kalınlığında tek bir membran ile bunu çevreleyen 28 nm kalınlığında mukopolisakkarit bir tabakadan oluştuğu görülmüştür [15].

Nukleus: Nukleusu saran zar üzerindeki porlar ile karakteristik bir görünüme sahiptir. Nukleolus ışık mikroskobunda tek bir yapı gibi görülmektedir. Elektron mikroskopik incelemelerde düzensiz elektron yoğunluğundaki kütlelerden meydana geldiği saptanmıştır. Kromatinler arasında 0.12-0.13 µm intranukleer veziküller bulunmaktadır. Bu veziküllerin görevi ve önemi hakkında henüz yeterli bilgi edinilememiştir [15].

Sitoplazma: Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde ektoplazma ile endoplazma arasında bir fark gözlenememistir. Sitoplazma içinde 0.2-0.3 µm

büyükliğünde vakuoller bulunmaktadır. Bu vakuollerin membranları incelendiğinde, plazma membranı ile aynı yoğunlukta ve kalınlıkta olduğu görülmüştür. Vakuollerde nişasta tanecikleri veya bakteriler bulunabilmekle beraber, her ikisinin de birlikte bulunduğu vakuoller gözlenmemektedir. Bu da besinlerin intrasellüler sindiriminin kendilerine özgü vakuoller içinde olduğunu göstermektedir. Ayrıca her vakuolde farklı fiziksel ve kimyasal koşulların yaratıldığı düşünülmektedir [1, 15].

2.3.5. Biyokimyası ve Genomik Yapısı

E. histolytica ökaryotik canlı olmasına karşın morfolojik olarak mitekondri, sitokrom, oksidatif fosforilasyon gibi organel ve metabolik fonksiyonların noksan olmasıyla diğer ökaryotik hücrelerden farklıdır. Piridin nükleotid transhidrogenaz ve hsp60 gibi nükleusa kodlanmış mitekondri genlerinin varlığı, parazitin bir dönem mitekondri içerdiğini göstermektedir. Hücre yüzeyi ve salgıladığı proteinler, belli dizilimde olmamasına rağmen, düzgün bir endoplazmik retikulum ve golgi aparatına sahip bulunmaktadır. Glikoz sitoplazmada aktif transport ile taşınmaktadır. Membran içi partiküller trofozoitin plazma membranında heterojen olarak dağılmışlardır. Trofozoit membranının dış yüzeyinde ise birçok küçük kabarcıklar görülmektedir. *E. histolytica* kistlerinde de membran içi partiküllerin yoğunlukları trofozoitlerde bulunanlara göre daha az yoğunlukta ve membranın iç-dış yüzeyinde heterojen olarak dağılmışlardır. Kistin duvarı üç veya dört katlı olup sitoplazması ise yapı olarak trofozoitin yapısına benzemektedir. Kist ve trofozoitlerdeki nükleus membranlarının üzerindeki deliklerin çaplarının ikisinde de birbirine eşit olduğu bildirilmektedir [9, 13].

E. histolytica anaerobik metabolizmaya sahip olmakla birlikte düşük oksijen konsantrasyonunu tolere edebilmektedir. Amiplerin ağırlıklarının %30'undan fazlasını oluşturan karbonhidratlar, glikojen olarak depolanmakta ve glikojenin başlıca enerji kaynağı olduğu açıklanmaktadır. *E. histolytica* anaerobik olarak etanol ve karbondioksitin eşit molar miktarlarının glukoza çevrilmesiyle alkolik fermentasyon ile enerji elde etmektedir. *E. histolytica*'da pürin bazları ve nükleotidler için birinde adenin, adenozin, diğerinde adenozin, guanozin mevcut olan iki taşıyıcı mediatör transport sistemi bulunmaktadır [9, 13].

E. histolytica'da bulunan nükleik asit metabolizması, bileşimi ve dağılımı incelenmiş ve radioizotoplarla işaretli moleküllerle yapılan araştırmalarda, bir de-nova pirimidin işlevi tespit edilirken, bir pürin işlevinin varlığı saptanamamıştır. Pirimidinlere uyan nükleozitler amip tarafından RNA ve DNA sentezi için kullanılmaktadırlar. Adenin, adenozin, guanozin, üridin ve sistidin amip hücresinin içine girişinin bir taşıyıcı aracılığı ile adenin-adenozin, adenin-guanozin, üridin-sistidin ve üridin-guanozin şeklinde olduğu saptanmıştır. Urasil, sitozin, timin ve timidinin ise hücreye pasif difüzyon aracılığı ile girdikleri görülmüştür. *E. histolytica*'nın çeşitli pürin ve pirimidinleri kendi nükleik asitlerine katması, doku istilası sırasında, konak hücresiyle arasındaki savaşım kapasitesini desteklemektedir. Genom boyutu ve DNA'sı üzerinde yapılan çalışmalarda *E. histolytica* ve benzer amipler için genom boyutunda anlamlı farklar bulunmuştur [9, 13].

E. histolytica gibi mitekondrisiz protozoonlar pirofosfata bağımlı enzimlere sahip olduklarından, bu enzimler parazit tarafından enerji üretimi için öncelikli önem taşımaktadırlar ve konakta bulunmadığından, doğrudan bu enzimler antiparazitik ilaçların en uygun hedefi olarak değerlendirilmektedir [9, 13].

Entamoeba histolytica'nın yüzeyinde bulunan galaktoz bağlayan lektin aracılığıyla konak hücreye bağlandığı yapılan in vitro çalışmalarla tespit edilmiştir. Konak hücre temasını takiben, *E. histolytica* **Amebapor** diye isimlendirilen muhtemelen fosfolipaz yapıda delik açıcı molekül (pore-forming molecule) aracılığıyla hedef hücreyi lizis etmektedir. Hücre lizisini takiben ölü hücrenin amibik fagositozu gerçekleşmektedir. Amöbiyozis araştırmaları da bu olaylar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Amibik kolit inflamasyonunda göze çarpan nokta, doku hasarındaki konak üzerindeki inflamasyonun rolüdür [19]. Zhang ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir araştırmada *E. histolytica*'nın amibik karaciğer apsesi üzerinde amebaporun virülans faktörü olarak gerekli olduğu fakat kolit ve doku hasarı yapmak için gerekli olmadığını bildirmişlerdir [20].

2.3.6. Morfolojik Ayrımı

1925'de Brumpt, *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayrı türler olduğunu ve patojenik ve nonpatojenik türler olarak tanımlanması gerektiğini söylemiştir. Daha sonra Sargeant ve arkadaşları bu amiplerin izoenzim tiplendirmesi yapılarak

ayrılabilirliğini ve patojenik ve nonpatojenik *E. histolytica* olarak tanımlanabileceğini göstermiştir. Strachan ve arkadaşları immunolojik olarak farklı olduklarını monoklonal antikorlar kullanarak immunofloresan yöntemle ortaya koymuştur.

E. histolytica kolit ve karaciğer absesine neden olur ama *E. dispar* böyle bir klinik oluşturmaz. Ayrıca *E. moshkovskii*'nin de insanlarda kolonize olabildiği ve görünüş olarak *E. histolytica* ve *E. dispar*'a benzediği unutulmamalıdır [1].

Morfolojik olarak *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın birbirlerinden ayırt edilmesinde aşağıdaki kriterler kullanılır:

- *E. histolytica* trofozoitleri taze dışkıda mukus ve kan içeren dışkılarda bulunurken; *E. dispar* trofozoitleri sulu dışkılarda, kistleri ise katı dışkılarda daha sık bulunur.
- *E. histolytica* bulunan dışkıda lökosit yoktur veya çok azdır. Sitoplazmada fagosite edilmiş eritrositler bulunur.
- Bazı durumlarda birbirine yapışan eritrositler parazitin hareket yönünün aksi tarafından trofozoite yapışarak bir kuyruk oluşturup yer yer para dizisi gibi dizilirler. Buna **Anderson olayı** denir.
- *E. histolytica* bulunan dışkıda, eozinofillerin yıkım ürünleri olan Charcot-Leyden kristalleri bulunur [21].

E. histolytica'yı *E. dispar*'dan ayıran biyolojik özellikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- İzoenzim paternleri özellikle hekzokinaz varlığı ,
- Spesifik epitoplara, birkaç monoklonal antikorla tanımlanmıştır,
- rDNA epizomlarının dizilim farklılıkları vardır,
- Homolog gen sekansları arasında (% 2-18) dizilim farklılıkları,
- Gen farklılıkları, örneğin ariel ve cp 5 genlerinin sadece *E. histolytica*'ya özgü olması,
- *E. histolytica*'nın aksenik kültüre daha kolay adapte olabilmesi, (*E. dispar*'ın aksenik besiyerlerinde üretilmesi daha zordur ve sadece bir suş için başarılı olmuştur)

- Ayrıca; iki tür elektron mikroskobu ile incelendiğinde özellikle yüzey görünümünde büyük farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılığın *E. dispar*'da yüzey lipofosfolikanının bulunmamasıyla ilişkili olduğu öngörülmektedir [22].

Dışkı incelemesinde *E. histolytica* kistleri ile en çok *E. coli*'nin kistleri karışır. Yıllarca yaygın olan bu görüşe artık *E. dispar* ve *E. moshkovski* kistleri de eklenmelidir. Ama bu bağlamda morfolojik bir ayırım yapmak olanaklı değildir. Bu konuda dikkat edilmesi gereken hususlar;

- *E. histolytica* kistleri 15 µm'den daha küçüktür, *E. coli*'ninkiler büyüktür
- *E. histolytica*'nın çekirdekçiği mekezde yer alırken, *E. coli*'ninki asantraldir (bazı durumlarda yanıtlan gözlemler olabilir)
- Serum fizyolojik (SF) içinde hazırlanan preparatlarda *E. histolytica* kistlerinin çekirdekleri görülmezken *E. coli*'ninkiler görülebilir
- SF preparatlarında *E. histolytica*'nın kromatoidal cisimciklerinin ucu yuvarlak sonlanırken, *E. coli* 'ninkinde çalı demeti şeklinde, düzensiz sonlanır
- *E. histolytica*'nın olgun kistleri 4 çekirdekli iken *E. coli* çoğunlukla 8, bazen de 16 çekirdekli [11].

E. hartmanni trofozoitleri genelde yuvarlak formda değildir ve çapları 12µm' den küçüktür. *Entamoeba* türleri arasında en küçük trofozoit *E. hartmanni*'ye aittir. Kistleri yuvarlak ve 10 µm'den küçüktür ve sıklıkla 2 çekirdek içerir. *E. hartmanni* kistleri, kalıcı boyalı örneklerde tipik çekirdek yapısı ve yuvarlak veya kare uçlu birçok 'kromatoid çubuk' bulundurması ile karakterizedir. Boyanmamış örneklerde *E. hartmanni*'nin diğer amip kistlerinden ayrımı mümkün değildir. Boyalı trofozoit örneklerinde *E. hartmanni* çekirdek yapısı *E. histolytica*'ya benzer fakat daha küçüktür. İlk zamanlarda bu tür *E. histolytica* veya küçük *E. histolytica* olarak bilinmekteydi. Günümüzde *E. hartmanni*'nin nonpatojen olduğu açıklığa kavuşmuş ve tedavi edilmesine gerek olmadığı bildirilmiştir. *E. coli* trofozoitleri çok sayıda büyük, düzensiz ve ekzantirik karyozoma sahiptir. Ayrıca, trofozoit çekirdeğinde düzensiz yığılmış periferik kromatinler bulunur. *E. coli* kistleri küreseldir ve 8

çekirdek içerir. Çekirdekte periferel kromotinler ve karyozom düzensiz dağılmıştır [1].

Meksika'da 1997 yılında iki türün ayrımını konu alan bir toplantı ile iki türün ayrımının kesin olarak yapılmasının gerektiği vurgulanmıştır. Bu toplantıda eski amöbiyoz tanımı (klinik belirti gösteren veya göstermeyen *E. histolytica* enfeksiyonu şeklindeki) yeniden onaylanmakla birlikte *E. histolytica* açık bir şekilde *E. dispar*'dan ayrılmıştır. Toplantının sonuçları şu şekilde sıralanabilir:

- Klasik taksonomik tanımlamalarda kullanılan kriterler (boyut vb.) iki türü birbirinden ayırt edemez, iki türün kist formu birbirinin aynısıdır.
- Tanı direkt mikroskopi ile konulduğunda sonuç *E. histolytica/dispar* şeklinde bildirilmelidir.
- *E. histolytica/dispar* tespit edilen asemptomatik bireylerin tedavi edilmesi uygun değildir.
- Tanıda en uygun yaklaşım *E. histolytica*'nın spesifik olarak aranması, tespiti durumunda tedaviye başlanmasıdır.
- Taze dışkı incelemesi ya da diğer örneklerde eritrosit fagosite etmiş trofozoit görülmesi, doku biyopsisinde trofozoitlerin görülmesi *E. histolytica*'nın varlığı yada invaziv hastalığı gösterir.
- Semptomatik hastalarda yüksek titrede spesifik antikor varlığı invaziv hastalıkla ilişkilidir [2, 22].

2.3.7. Virulans Faktörleri

E. histolytica suşlarının insanda hastalık oluşturma kapasiteleri değişkenlik gösterir. Fakat virülansı saptayabilecek basit bir metot yoktur. Buna rağmen hayvan deneylerinde cevap alınabilmektedir. Yeni doğan kobayların inokülasyonundan sonra karaciğerlerinde oluşan apseler çok duyarlı virülans göstergesidir. Ancak bu yöntem için aksenik kültürlerde üretilmiş amipler kullanılır. Amip suşlarının virülansı organizmanın yüzey özelliğine bağlıdır. Ayrıca amipler virüsleri de kullanabilirler, ancak bunun virülans ile ilişkisi yoktur [17].

A. Galactose/N-acetyl-D-galactosamine(Gal/GalNAc) lectin

Temel fonksiyonları:

- Hedef hücreye adezyon,

- Sitotoksinite,
- Kompleman direnci,
- Endositosiz,
- Aktin polimerizasyonu.

E. histolytica insan eritrositi ve kolon epitel hücresi de dahil olmak üzere çoğu hücreye Gal/GalNAc lektin aracılığıyla adezyonunu gerçekleştirmektedir. Lektin, ağır ve hafif alt birimler ile bunların non kovalent birliktelik gösterdiği intermediate alt biriminin oluşturduğu, hem konak galaktozuna hem de N-asetil-D-galaktozamine bağlanan virülans faktörüdür [19].

B. Sistein proteinazlar

Temel fonksiyonları:

- İntestinal mukozada bulunan debride dokular ile mukusun azaltılarak bağlanmanın yardımı,
- Hücre dışı matriksin sindirilmesiyle konak dokuya penetrasyonun kolaylaştırılması,
- İmmun yanıtı atlatarak konak proteinlerin azaltılması,
- Kompleman gibi konak hücre proteolitik dizisinin aktivasyonu,
- Metastatik lezyon üretiminin yayılabilmesi için yardım.

E. histolytica hücre lizatlarından üretilen ve hücre dışına salınan sistein proteinazların miktarı, *E. dispar*'dan yaklaşık olarak 1000 kat daha fazladır [19].

C. Amebapor

Temel fonksiyonları:

- Sitoplazmik granüllerde birikme ve hedef sonrası serbest kalma,
- Hem ökaryotik hücrelerde hem de fagosite edilmiş bakteri membranlarında iyon kanalları oluşumu [19].

Amebaporlar küçük (77aa) amfipatik peptitlerdir ve trofozoitlerce salgılanır. Ökaryotik ve bakteriyel hücre zarına entegre olarak zar geçirgenliğini bozar ve konak hücrelerinin nekroz ile ölümüne neden olur. Negatif yüklü fosfolipidlere lisin ucuyla

bağlanır ve hemen membrana entegre olur. Oluşan açıklık lenfositlere, polimorfonükleer lökosit (PMNL) ve makrofajlara kontrolsüz su, iyon ve küçük moleküllerin geçişine neden olur, hücreler şişer ve lizis olur. Amebapor proteinlerin en önemlisi olan Amebapor A'nın aktivasyonu homologlarından çok farklıdır. Histidin aracılığıyla proteinin dimerizasyonu, hedef hücre membranında oligomerik deliklerin oluşmasında bir anahtar görevi görmektedir. 16 yıl önce amebopor proteini izole edilmiş ve primer yapısı ortaya çıkarılmıştır. 2005 yılında üç boyutlu yapısı aydınlatılan proteinin insandaki homoloğu saposin proteinleridir. Epigenetik gen silencing yöntemiyle amebapor protein ekspresyonu azaltılan suşların virulansının azaldığı görülmüştür. *E. dispar*'da da benzer proteinler bulunur fakat *E. dispar*'ın bu proteinleri sadece bakterileri sindirmek için kullandığı, konak dokuyu istila etmediği sanılmaktadır [23].

D. Lipofosfopeptidoglikan yüzey kompleksi

Lipofosfopeptidoglikan yüzey kompleksleri parazit kana veya karaciğere ulaştığında paraziti kompleman ataklarına karşı korur. Ayrıca peroksiredoksin, proteinazlar, lektin de kompleman ataklardan korunmada rol almaktadır [24].

2.3.8. Patogenez

E. histolytica'nın insanda oluşturduğu parazitoza **Amöbiyoz** denir. Amöbiyoz'un oluşmasında konak direnci, amibin virülansı, enfeksiyon yapan amip sayısı, amibin enzimleri ve toksik birimlerinin önemli rolü vardır [16].

Patojen amiplerin şu özellikleri vardır:

- Yüksek derecede eritrosit fagosite edebilme,
- Negatif elektrik yüklü olan memeli hayvanların hücreleriyle teması ve kolaylaştırıcı elektrik yükünün olması,
- Aksenik ortamda bol üreyebilmesi,
- Laboratuvar hayvanlarında lezyonlar yapabilmesi,
- Tipik izoenzimli profilinin patojen zymodemden olması,
- Bir lektin olan konkavalin A'lı ortamda belirgin olarak aglütine olması [25].

İnsanda anatomo-patolojik bozukluklara yol açan amöbiyoza "**invaziv amöbiyoz**" denir. Bu amöbiyozun işaretleri şunlardır:

- Hastalığın klinik belirtilerinin olması,
- Dışkıda eritrosit fagosite edilmiş amiplerin bulunması,
- Bağırsak salgısında çeşitli değişikliklerin olması,
- Kan serumunda antikorların bulunması [25]

2.3.9. Klinik

Aseptomatik formu olabileceği gibi remisyon ve aktivasyonun birbirini takip ettiği kronikleşen klinik formu da vardır. Amipli dizanterili hastada dışkılama sayısı günde 10-15 kadardır. Karnın alt kadranında geçici ağrılar olur. Ateş az olguda görülür (%10-30). Hastalık semptomları tedrici başladığı için kilo kaybı sık görülür [10]. İntestinal amöbiyozisin inkübasyon periyodu birkaç günden haftalar ve aylara kadar değişebilir, genellikle 1-4 haftadır [14].

Amöbiyoz enfeksiyonları, etkeninin bulunduğu yere göre;

A. İntestinal amöbiyoz

1. Aseptomatik
2. Semptomatik

B. Ekstraintestinal amöbiyoz

A. İntestinal amöbiyoz

Entamoeba histolytica'nın kalın bağırsağa yerleşmesiyle meydana gelen enfeksiyondur. Etken çoğu zaman kalın bağırsak boşluğunda sığıntı bir organizma olarak zarar vermeden yaşamlarını sürdürür veya kalın bağırsak çeperine girerek mukuslu, kanlı bir ishalle gelişen akut ya da kronik bir hastalığa yola açar. Bu şekilde gelişen hastalık tablosuna amöbiyozis (amipli dizanteri) bu nedenle intestinal amöbiyoz aseptomatik ve semptomatik amöbiyoz olarak ikiye ayrılır [17].

1. Aseptomatik (noninvaziv) amöbiyoz

Amöbiyozun en sık görülen şeklidir. Dışkıda trofozoit ve kan yoktur. Kolonoskopi normaldir. Bazen hiçbir klinik yakınma göstermezler, bazen de karın

ağrısı ve sulu dışkı gibi nonspesifik gastro intestinal şikayetler vardır. Bu tip olgulara gizli amöbiyoz da denir [16].

İnvaziv enfeksiyonu olmayanlar dahil tüm *E. histolytica* enfeksiyonlu hastaların serumlarında spesifik antikor saptanmıştır. Gelişmiş ülkelerde *E. histolytica* enfeksiyonundan daha sık görülen *E. dispar* enfeksiyonunda kolit ve karaciğer apsesi görülmemektedir [21].

E. histolytica kolonizasyonu olan kişilerin de tedavi edilmesi gerekmektedir. Kist taşıyan bu grup hem toplum için tehlike taşırlarken, hem de aylar sonra kolit gelişme riski vardır [21].

2. Semptomatik (invaziv) bağırsak amöbiyozu

Klasik amipli dizanteri şeklindedir. Semptomatik amöbiyozda etkenin patolojik etkisi trofozoitinin konak hücreye, üzerindeki lektin maddesi ile tutunarak hücre öldürücü salgı yapması, daha sonra bu hücreyi fagosite ederek eritmesi şeklinde olmaktadır.

Amöbiyoz olgularında patojenite amiplerin dokulara girmesi ve istilası ölçülmektedir. Ancak bunda suşun virülansı kadar kişinin direnci de etkili olmaktadır. Konak hücreye tutunan ve salgıladığı tripsin ile bağırsak epitelini eriten amip trofozoitleri kalın bağırsak mukozasının epitel tabakasından başlayarak muskularis mukozaya, submukozaya kadar ulaşmaktadır. Bu şekilde oluşan ülserlerin başlangıcı zımba ile delinmiş bir görüntü verir. Tabana yayıldıkça genişleme gösteren ülserler tipik şişe manzarası gösterir. Bu tip amip ülserleri karaciğer amip ülserlerinden daha tehlikeli ve öldürücüdür [17].

Klinik olarak amöbiyoz akut ve kronik bir seyir gösterir:

a. Akut bağırsak amöbiyozu

Ortalama 1-2 haftalık kuluçka süresinden sonra başlar. Hastalık etkeninin virülansı veya konağın direncine bağlı olarak farklı seyredebilir.

Hafif ve orta dereceli kolit: Hazım bozukluğu, istahsızlık ve halsizlikle başlayan ve en fazla iki hafta süren, basilli dizanteriden daha sakin seyreden tablodur [17].

Ağır kolit: Hastalığın başlangıcında uygun bir sağıltım yapılmamışsa ve hastanın direnci düşükse ağır kolit tablosu ortaya çıkar. Günde 30-40 defa dışkılama

görülebilmektedir ve dışkı yok denecek kadar azdır. Bu tür kolitte sık dışkılama, tenezm ve kolitle özellenen üçlü belirtiler tipik amip dizanteri tablosunu oluşturur. En ağır vakalarda ateş 40-40,5 derece olabilir. Kusma, amip istilasına bağlı olmayan non-spesifik hepatomegali ve karaciğer duyarlılığı görülebilir. Hamilelerde, kortikosteroid kullananlarda ve yenidoğanlarda fulminan amibik kolit görülebilir. Yenidoğanlarda malnütrisyon ve ölümle sonuçlanır. Hastaların %75'inde bağırsak perforasyonu görülür [16, 17].

b. Kronik bağırsak amöbiyozu

Asemptomatik amöbiyozdan sonra en çok rastlanan şekildir. Dışkı ara sıra ishelli, çoğunlukla şekillidir. Kramp şeklinde karın ağrıları görülür. Çoğu kez tedavi edilmemiş veya tedavisi tamamlanmamış hastalarda görülür [17].

Amöbiyoza bağlı bağırsak komplikasyonları

Kanamalar: Ülserlerin ven cidarlarına açılması ile ortaya çıkar. Bazen aniden gelişen bol rektal kanamalar ölümle sonuçlanır.

Bağırsak tıkanmaları: Bağırsakta amibe bağlı lezyonların iyileşmesi sonucunda sikatrikse bağlı olarak tam veya kısmi bir tıkanma gelişir.

Bağırsak duvarının perforasyonu: Peritoneal amöbiyoza yola açar. Şiddetli karın ağrısı ve kollaps gelişir. Hasta aniden kaybedilebilir.

Ameboma (amip granülomasi): Bağırsak amöbiyozlu hastaların %1'inde amebomalar gelişmektedir. Bunlar tamamen semptomatik kitle lezyonlarıdır ve bağırsak lümenine doğru tümör şeklinde çıkıntı yapar veya halka tarzında gelişimi ile lümeni daraltır [17].

B. Ekstraintestinal amöbiyoz

Semptomatik olguların %5'ini oluşturur ve genellikle çeşitli organlarda apse oluşumuna neden olur. Bağırsak dışı amöbiyoza en çok karaciğerde rastlanır. Trofozoitlerin venöz dolaşım ile en sık sağ loba ulaşması sonucu meydana gelir. Apseler soliter olup olguların %90'ında sağ loptadır. Apsenin bitişiğindeki karaciğer parankiması normaldir. Akut dönemde sağ hipokondriumda künt bir ağrı ve lökositöz

vardır. Subakut dönemde karaciğerdeki ağrı daha geniş bir alana yayılır, hastada kilo kaybı ve dizanterinin aksine yüksek ateş görülür [26]. Önce karaciğer büyümesi ve hassasiyeti ile karakterize amip apseleri, daha sonra yerleşme odaklarında nekroz oluşumu ile amip apseleri meydana gelir. Bağırsak dışı amöbiyozun görüldüğü diğer organlar; akciğerler, plevra, perikard, beyin, dalak, ürogenital sistem ve deridir [11].

2.3.10. İmmünoloji

Amöbiyozla karşı insanda belli bir direnç olduğu saptanmıştır. Hastalığın oluşmasında, kişinin beslenme şeklinin ve savunma mekanizmasının durumunun etkili olduğu ileri sürülmüştür. Enfekte kişilerde anti-ektin antikorların oluştuğu ve bunların parazitin sitotoksik etkisini bloke ettikleri ama trofozoitin hücreye yapışmasını engellemediği belirtilmiştir. Ayrıca invaziv amöbiyozdan kurtulanlarda hem humoral hem de hücrel bağışıklığın varlığı saptanmıştır. Araştırmalar, enfekte kişilerin dışkılarında, tükürüğünde ve kolostrumunda trofozoite karşı ve onun hücreye yapışmasını önleyen anti-ektin IgA varlığını göstermiştir. Özellikle bağırsak dışı amöbiyozunda kişilerde antikor oluşumu görülür. Genel olarak *E. histolytica*'ya karşı savunmada, serumda bulunan özgül antikorlardan daha çok hücrel bağışıklığın etkili olduğu görüşü hakimdir [11].

2.4. Tanı Yöntemleri

Amöbiyozun doğru tanısı sadece dizanterili akut hastalar için değil, olguların %90'ını oluşturan asemptomatik kist taşıyıcıları için de önemlidir, çünkü parazit özellikle gelişmekte olan ülkelerde kötü hijyen koşulları ve kontamine içme sularının kullanılması nedeniyle kişiler arasında hızla yayılabilir. Parazitoloji laboratuvarında tanı direkt ve indirekt incelemelere dayanır. Direkt incelemede inceleme materyali dışkıdır. Bunun yanında rektal dermal kazıntı, drenaj, biyopsi, otopsi materyalleri, balgam, aspirasyon sıvısı ve benzeri örnekler de incelenir. Karaciğer amöbiyozunda aspirasyon materyali kokusuz, steril ve pembemsi kahverengidir. Materyalin ince kıvamda, kötü kokulu ve köpüklü olması bakteri enfeksiyonuna işaret eder [11].

Amöbiyoz tanısında dışkı incelemelerinde dikkat edilecek hususlar;

- Örnek mutlaka temiz, kuru, geniş ağızlı, plastik bir kaba alınmalıdır.
- Örnek idrarla veya suyla karışmamalıdır.

- Hasta antibiyotik (tetrasiklin ya da sülfonamid), laksatif, antiasit, müshil (magnezyum sülfat), diyare önleyici ilaçlar (kaolin yada bizmut) kullanmamış olmalı veya lavman yapmamış olmalıdır.
- İshalli veya dizanterili hastalardan laboratuvarında örnek vermeleri istenmelidir,
- Bu örnekler mutlaka en geç 30 dakika içinde incelenmelidir
- En az üç dışkı örneği incelenmelidir
- Dışkı örneği koruyucu fiksatif içermemelidir (polivinil alkol, Schaudinn, mertiyolat-iyodin-formalin (MIF), sodyum asetat-asetik asit-formalin, ya da % 5-10'luk formalin) [11, 21].

İncelemeyi yapacak kişinin mutlaka deneyimli olması gerekir. Dışkı örneği kesin olarak önce çıplak gözle yani makroskobik olarak değerlendirilmeli; sonra bu bulgulara dayanarak mikroskobik inceleme yapılmalıdır. Makroskobik incelemede şu noktalar belirlenir:

- Dışkının kıvamı,
- Kokusu,
- Kan ve/veya mukus içerip içermediği,
- İdrarla ve/veya toprakla bulaşık olup olmadığı [11].

Dışkının kıvamını yani şekilli mi (katı mı), yarı şekilli mi yoksa sulu mu olduğunu belirlemek, amöbiyozun tanısında çok önemlidir. Bunlardan birincisinde dışkı örneği konduğu kap içinde yayılmaz, konduğu şekilde durur ve bu tip örneklerde trofozoitten çok kist görülmesi beklenir; ikinci durumda, dışkı kap içinde belli bir derecede yayılır ama tam olarak kap şeklini almaz. Bu örneklerde hem trofozoit hem de kist dönemleri görülebilir. Üçüncü durumda ise örnek suludur ve hemen konduğu kabın şeklini alır. Kistlerin bulunmadığı, buna karşın trofozoitlerin çok sayıda olabileceği dışkı tipidir. Hastanın kolayca dışkı örneği veremediği durumlarda lavman yapmak gerekebilir. Bunun için serum fizyolojik (SF), sodyum sülfat kullanılabilir. Bu durumda hastanın ilk çıkardığı materyal atılır, çıkardığı ikinci örnek incelenir. Alınan dışkı örneği hemen incelenemeyecek ise veya uzağa gönderilecekse 4°C'de saklanmalıdır [11].

2.4.1. Direkt Tanı Yöntemleri

A. Serum fizyolojik ve lugol ile inceleme

Mikroskopik incelemede SF içinde hazırlanan preparatlar değerlendirilir. Laboratuvar ortamının çok soğuk olduğu durumda bu sıvı 37°C'ye ısıtılmalı veya lamın bir köşesine ısıtılmış metal para konmalıdır. Aynı örnekten iyot eriyiği içinde ikinci bir preparat hazırlanmalı veya olanakların kısıtlı olduğu durumlarda, incelenmiş olan preparatın lameli kenarından iyot eriyiği damlatıldıktan sonra, preparatı yeniden incelenmelidir. SF içinde hazırlanan preparatlarda trofozoitler, tipik yalancı ayaklarıyla (eldiven parmağı şeklinde) hareket ederler ve eğer varsa içlerindeki eritrositler görülebilir. Bazı durumlarda birbirine yapışan eritrositlerin, parazitin hareket yönünün aksi tarafından, trofozoite yapışarak, bir kuyruk oluşturdukları gözlenebilir. Buna Anderson olayı denir. Bu görünüm amöbiyozun tanısı yönünden kesin tanı koydurucu bir gözlemdir. Öncelikle dışkı mikroskopisinde eritrositin görülüp, lökositin az miktarda ya da hiç görülmemesi, örnekte trofozoit görülsün veya görülmesin, tipik Charcot-Leyden kristalleri'nin varlığı da amöbiyozun lehine bir bulgudur. Eozinofillerin yıkımı olan bu kristaller, diğer birçok parazitozda olduğu gibi amöbiyozda da önemli bir göstergedir. İyot eriyiği gerek trofozoitin gerekse kistin çekirdeklerini boyayarak hem onların yapısının hem de sayılarının belirlenmesini sağlar. SF içinde preparat hazırlarken dışkı örneğinde müköz varsa buradan, sulu örneklerde de sulu kısımdan çok, dışkı artığının bulunduğu yerden preparat hazırlamak daha iyi sonuç verir. Birer gün arayla alınan ve hem direkt olarak hem de boyalı preparatları hazırlanıp, incelenen 3-4 örnekle amöbiyozluların %85-95'i saptanabilir [11].

B. Kalıcı boyama yöntemleri

Kalıcı preparat hazırlamada dışkı örneğinden hazırlanan yayma preparatı Schaudinn sıvısında tespit etmek sonra da Heidenhain'in demirli hematoksilin boyası ile veya trikromla boyamak da doğru tanıya götürür [11]. Ayrıca, Giemsa, Metilen Mavisi, Korazol Siyahı, Wright ve İyodin- Trikrom boya olarak başarıyla kullanılır. Rutin laboratuvarlarda *E. histolytica/dispar* tanısında en sık tercih edilen boyalar Wheatley Trikrom ve Modifiye Demirli Hematoksilendir.

Trikrom boyalı preparatlarda merkezi ve küçük bir karyozom ve hemen hemen her yerinde aynı büyüklükte düzgün bir periferik kromatin içeren tipik nukleus yapılarının görülmesi ile *E. histolytica/dispar* tanısı konulmaktadır [27]. Organizmalar ve zemin arasındaki renk kontrastı, organizmaların hematoksilenle boyanmış yaymalara oranla daha iyi fark edilmelerini sağlar. Trikromda, organizmanın sitoplazması genellikle mavi-yeşilden mora çalan bir renge boyanırken, çekirdek kromatini, kromatoid cisimler ve diğer inklüzyonlar kırmızı ya da kırmızımsı mor renk alır [11].

C. Konsantrasyon yöntemleri

Şekli dışkıda bulunan az sayıdaki kistleri saptamak için doymuş tuzlu su veya çinko sülfat yüzdürme yöntemleri uygulanır. Birincide kistlerin görünümü bozulabileceğinden ikincisini uygulamak daha iyidir [11]. Diğer yöntemler formol-etil asetat, modifiye formol-eter ve mertiyolat-iyodin-formalin (MIF)'dir.

D. Kültür yöntemleri

Laboratuvar olanakları elverişli ise kültür yapılabilir. Parazit kültürleri ksenik, monokesnik veya aksenik olabilir (Tablo 2.1). Ksenik parazit kültürünün yapıldığı besiyerinde belirli bir parazitin yanı sıra bilinmeyen mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Monokesnik kültüre genellikle *Escherichia coli* ile parazit birlikte ekilir. Aksenik parazit kültürü ise hiçbir bakteri içermeyen saf kültürlerdir [28]. Bu yöntemler, dışkı örneğinde saptanan trofozoit ve/veya kistin *E. histolytica* mı yoksa *E. dispar* mı olduğunu belirlemez. Bunu saptamak için genetik yöntemlere başvurmak, zimodem analizi yapmak gerekir. Fakat kazıntı ve doku örneklerinde görülen amip trofozoitleri eğer *Acanthamoeba*, *Naegleria* ve benzeri amipler söz konusu değilse, kesin *E. histolytica*'dır[11].

Tablo 2.1. *E. histolytica* besiyerleri sınıflandırması [28]

Ksenik besiyerleri	Monoksenik besiyerleri	Aksenik besiyerleri
Boeck ve Drbohlav'ın Locke-egg-serum besiyeri	TYI-S-33	TYI-S-33
TYSGM-9 (Diamond)	YI-S	YI-S
	LYI-S-2	LYI-S-2

Kültürlerin inkübasyonu için optimum ısı 37°C'dir. Bazı besiyerlerine steril pirinç unu eklemek üremeyi stimüle etmektedir. Kültür materyali zimodem deneylerinde de kullanılabilir [11].

E. dispar ksenik kültürde *E. histolytica* gibi çoğalır fakat aksenik kültürde daha zayıf çoğalır [29]. Ancak, amöbiyozun tanısında besiyerlerine ekim yapılması, mikroskopi sırasında gözden kaçan olguların tespitine katkı sağlayabilmektedir. Tuncay ve arkadaşları uyguladıkları dört yöntemden herhangi biri ile *E. histolytica/dispar* saptadıkları 41 olgudan 29'unu Robinson besiyerine ekmiş ve bunların 20 tanesinde üreme gözlemişlerdir. Ayrıca, bu örneklerin ikisinde nativ-lugol ve Trikrom boyama yöntemleri ile *E. histolytica/dispar* saptanmadığı halde, kültürde *E. histolytica/dispar* üremiştir [7]. Diğer bir problem de istenmeyen organizmaların kültür ortamında aşırı çoğalmasıdır. Özellikle *B. hominis* kültürde aşırı çoğalarak parazitin tanısını zorlaştırabilir. Son olarak kültür sonucu negatif olan bir örneğin yine de *E. histolytica* içerebileceği unutulmamalıdır [30]. Geleneksel olarak patojen ve apatojen iki türün ayrımı, amibik kültürden elde edilen materyalde izoenzim analizi ile gerçekleştirilir [11]. İnsandan izole edilen toplam 24 izoenzimin dokuzu *E. histolytica*'ya ve onikisi *E. dispar*'a aittir. Diğer üç izoenzim de deneysel çalışmalarda elde edilmiştir. Bu zimodemler malik enzim, hegzokinaz ve fosfoglikomutaz enzimlerinin elektroforetik paternlerinden oluşmaktadır. Ayrıca, bu zimodemlerden üçü kültür ortamında parazitlerle birlikte çoğalan bakteri türlerinde de bulunabildiği için tanısız olarak değeri olmadığı bildirilmiştir. Zimodem analizi patojen ve apatojen türün ayrımında güvenilir bir yöntemdir çünkü iki tür genetik olarak farklı hegzokinazları sentezlerler [31]. Yöntemin uygulaması zaman alıcı ve maliyetli olmasının yanısıra deneyimli elemanlar gerektirir. Bununla birlikte yöntem

hastalığın endemik olduğu bölgelerde doğru epidemiyolojik verilerin elde edilmesi açısından önemlidir [32].

E. Biyopsi

Hastadan alınan çeşitli kazıntı ve aspirasyon örneklerinin de su emmeyen bir kaba konarak ve zaman geçirilmeden laboratuvara gönderilmesi ve orada da bekletilmeden incelenmesi gerekir. Hem klinisyen hem de laboratuvar sorumlusu, bu örneklerde sadece trofozoit bulunduğunu, kistlerin olmadığını, havanın oksijeninin ve düşük ısının trofozoitler için ölümcül olduğunu daima göz önüne almalıdırlar. Amibik lezyonlar çekum veya çıkan kolonda olabilir. Bu nedenle tanıda sigmoidoskobiden ziyade kolonoskopi uygulanmalıdır. Biyopsi örneği nekrotik bilgeden ziyade olabildiğince lezyonun sağlam bölgeye yakın kısmından alınmalıdır. Çünkü nekrotik materyal içinde trofozoitleri görmek olanaklı değildir. Biyopsi ve otopsi örnekleri önce çıplak gözle veya merceklerle incelenmeli (değdirme preparatlarda hazırlanabilir) sonra da %10'luk formalinde tespit edilerek rutin işlemlerden geçirilerek histopatolojik kesitler incelenmelidir. Otopsi materyali ölümden sonraki ilk dört saat içinde alınmalıdır. Doku bu süreden fazla beklemişse trofozoitler rutin işlemlerde kullanılan hematoksilen-eozin ile yeterli boyanmayabilir. Bunun için böyle materyallerden hazırlanan kesitleri Best Carmin karşıt boyasıyla da boyamak yararlıdır. Bu boya sitoplazmadaki glikojeni boyadığından trofozoitlerin saptanmasına yardımcı olur [11].

F. Hayvan inokülasyonu

Amöbiyozun tanısında ve kökenlerin patolojisinin belirlenmesinde deney hayvanlarından da yararlanılır. Yavru kedi, köpek, fare, hamster ve yavru tavşan gibi hayvanlar içinde en duyarlısı hamsterdir. Fakat çok az laboratuvarda araştırma amaçlı bu yola başvurulabilir [11].

2.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri

Bu tip tanıya ya hasta serumunda *E. histolytica*'ya karşı antikor olup olmadığı veya çeşitli inceleme örneklerinde parazitin antijenlerinin varlığı serolojik yöntemlerle araştırılır. Serolojik testlerde saptanan antikor genellikle immünoglobulin G (IgG)'dir. Aktif hastalıkta bir dereceye kadar immünoglobulin M

(IgM)'de saptanabilir. Duyarlı serolojik yöntemler arasında İndirekt Hemaglutinasyon (IHA), ELISA, İmmünoelektroforez (IF), İmmünodiffüzyon (ID), Western Blot (WB), Kounter Immuno Elektroforez (CIE), amibik jel difüzyon testi, Kompleman Fiksasyon testi (CF) sayılabilir. Bunların içinde uygun kitler sağlanabilirse en kolay uygulananı İHA'dır. Uygulanması sadece birkaç dakika alan lateks aglutinasyon (LA) testi hızlı tanıda yararlıdır. Karaciğer amöbiyozlu olguların %95'inin, bağırsak amöbiyozluların da yaklaşık %60'ının pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Serolojik deneyler genelde doku invazyonu varsa pozitif sonuç verir. Tedaviden sonra serumun antikor titresini düşer ama yaklaşık iki yıl veya daha uzun süre pozitif kalabilir [11].

Son zamanlarda tanıda galaktoz inhibe edilebilir yapışma proteini=GIAP (galactose-inhibitable-adherence-protein) diyebileceğimiz antijene karşı özgül monoklonal antikorlarla ELISA testi uygulanmaktadır. Bu antijen, parazitin konağın hücrelerine yapışmasında ve hücrenin erimesinde rol oynamaktadır ve sadece patojen *E. histolytica* kökenlerinin hem trofozoit hem de kist formlarında bulunmuştur. ELISA ile amöbiyoz şüpheli hastaların dışkılarında bu antijenin saptanması tanıda çok önemlidir [11].

A.Antikor arama yöntemleri

1. Enzim immuno assay (ELISA)

Serum antilektin IgG amibik kolitli ve karaciğer apseli hastalarda semptomların gözlenmesinden sonraki bir hafta içerisinde bulunmaya başlar ve %95'in üzerinde bu durum gözlenmiştir [33]. Serolojik testler bazen yanlış pozitif verebilir ve eğer sonuç şüpheli ise test tekrar edilmelidir [34]. Uygulanan yöntemlerin yeni kazanılmış hastalıkla, kazanılmış hastalığı ayırt edecek özelliğe sahip olması önemlidir. Endemik bölgelerde yaşayan kişilerde (IgG, IgM, IgA) antikorlarının varlığı hastalığın kazanıldığı zamanı belirlemeye yönelik olarak tespit edilmelidir [35]. Mukozal anti-lektin IgA antikorları parazitin kolonizasyonuna karşı immünolojik reaksiyon ile ilişkilidir ve antikor koruyuculuğunun bir göstergesi olmayabilir [36]. Serum anti-lektin antikorları için kullanılan ELISA testleri amibik karaciğer apsisi olan hastaların ve asemptomatik enfeksiyonun tanısında kullanılmaktadır. Yöntemin hem maliyeti düşüktür, hem de zaman alıcı değildir [12].

En sık tavsiye edilen serolojik testlerin başında gelen ELISA serumda antilektin antikorlarını belirler ve karaciğer apseli ve asemptomatik kist taşıyıcılarında sıklıkla kullanılır. Yeni kazanılmış invaziv amöbiyozlu hastalarda doğru tanı kritik önem taşır. Ayrıca, antikor tespitine dayalı testler zaman ve maliyet açısından uygun değildir [37]. Bir diğer sorun da serolojik testlerin enfeksiyonun zamanını belirlemede yetersiz kalmasıdır. Amöbiyozun laboratuvar tanısı serumda antilektin IgG varlığına göre yapılır (semptomların ortaya çıkışından bir hafta sonra gözlenmeye başlar) veya IgM antikorlarına göre yapılır (özellikle amibik koliti olan hastalarda 1 hafta içinde ortaya çıkar).

2. İndirekt hemagglütinasyon (IHA)

İndirekt hemagglütinasyon tekniğinde eritrositlerin yüzeyine antijenik yapılar yapıştırılır ve bu eritrositler spesifik antikorların varlığında çökelti oluşturur. HIV pozitif hastalarda amöbiyoz tanısı T- hücre aracılı immün yanıtın azalması nedeniyle çok önemlidir[38]. Amibik kist taşıyıcıları HIV ile enfekte olduklarında, latent amöbiyoz yeniden aktif olmakta ve invaziv hale gelebilmektedir [39]. *E. histolytica* antikorlarının serolojik testlerle tespit edilmesi tanıyı kolaylaştırabilir fakat bu hastalarda tanı genelde geç konulur. Bir çalışmada 18 amöbiyozlu hasta (13 amibik kolit histopatolojik olarak tanı konulmuş ve 9 karaciğer apseli radyolojik yöntemlerle tanı konulan) serumlarında antikor varlığı yönünden IHA ile değerlendirilmiş ve yöntem %99,1 seçicilik göstermiştir [40]. Sonuç olarak da IHA yönteminin gastrointestinal semptomları olan HIV+ hastalar için amöbiyoz tanısında faydalı olduğu ortaya konmuştur. Yöntem karaciğer apseli hastalarda semptomların ortaya çıkışından 1-2 hafta sonra %72,4 duyarlılık gösterirken 3. haftanın sonunda bu oran %86,9'a çıkmıştır. Ayrıca, ortalama antikor konsantrasyonunun ancak 6.ayda düşmeye başladığı bulunmuştur [21]. IHA kolay uygulanabilir bir yöntem olmakla birlikte ELISA ile karşılaştırıldığında duyarlılığı düşüktür. Kroul ve arkadaşları IHA, LA ve ELISA yöntemlerini karşılaştırmış ve sırasıyla %97.6, %90.7 ve %93 duyarlılık ve %97, %95 ve %100 seçicilik bulmuşlardır [37].

3. Counter immunoelektroforez (CIE)

Geçmişte en sık kullanılan tanı yöntemleri CIE ve IE dir. Bu testte *E. histolytica* HK-9 antijen %1 lik agaroz içindeki ısıyla inaktive edilmiş serumla

reaksiyona sokulur. *E. histolytica* antijenine karşı belirginleşen bant pozitif olarak değerlendirilir. Bir çalışmada 110 serum örneği (30 karaciğer apseli hasta, 30 amibik kolitli ve 50 kontrol serumu) ELISA ve CIE ile değerlendirilmiştir. ELISA ile amibik kolitli hasta grubunda %10 pozitiflik bulunurken CIE ile aynı grupta hiç pozitif reaksiyon gözlenmemiştir. Kontrol grubu iki testte de negatif sonuçlar vermiştir. Karaciğer apseli hastalarda CIE ve ELISA sırasıyla %66.6 ve % 90 pozitif saptanmıştır. CIE'nin ELISA'dan daha duyarlı bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır [41]. CIE ile antikor tespiti beşinci günden itibaren mümkün olmaktadır ve yaklaşık iki hafta sonra en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Antikor titreleri ile hastalığın şiddeti ve tedavi edilmesi arasında bir korelasyon bulunmamaktadır. Başarıyla tedavi edilen karaciğer apseli hastalarda antikor seviyesinin uzunca belirli bir düzeyde kaldığı IHA, CF, LA yöntemleriyle gösterilmiştir. CIE yöntemiyle tedaviden en az altı ay antikor tespiti yapılabilir, agaroz jel difüzyon yönteminde bu süre 4 yıla kadar uzamaktadır [21]. CIE deneyi invaziv amöbiyoz için özgüllüğü yüksek bir test iken, intestinal amöbiyozda hem duyarlılığı düşüktür, hem de ELISA'dan daha zaman alıcıdır.

B. Antijen arama yöntemleri

Antijen tespitine yönelik ELISA'nın diğer yöntemlere üstün olduğu noktalar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırımı yapan ELISA yöntemleri ayırıcı tanı ve doğru tedaviye büyük katkı sağlar.
- Olağanüstü duyarlılık ve seçicilik gösterirler.
- Uygulanması kolay, kullanıma hazır kitler halinde piyasada bulunabildiği için deneyimli laboratuvar personeli olmadan çalışmalar gerçekleştirilebilir.
- Fazla sayıda örneğin aynı anda çalışılabilmesine imkan sağlayan 96 kuyucuklu plaklar geniş çaplı epidemiyolojik araştırmalarda avantaj sağlar [21].

Ancak formolinle fikse edilmiş dışkı örneklerinde antijenin denatüre olduğu, taze veya dondurulmuş dışkı ile çalışılması gerektiği bilinmektedir.

Triage parasite panel *E. histolytica* ve *E. dispar*'a spesifik monoklonal antikorlarla (29 kDa) kaplı bantların kullanıldığı immünokromatografik bir testtir. Bunun yanı sıra *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) ve *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) için geliştirilmiş şekilleri de vardır. Bir çalışmada bu ELISA ile karşılaştırılmış ve duyarlılığı oldukça yüksek (%100) bulunurken seçiciliğinin (%68,3) düşük olduğu görülmüştür [42]. Günümüzde, antijen aramaya yönelik ELISA kitlerinde *E. histolytica*'ya spesifik monoklonal antikorların kullanımı öne çıkmaktadır. *E. histolytica* Gal/GalNAc-spesifik lektinleri hedef alan (*E. histolytica* test II; TechLab, Blacksburg, Va.) veya *E. histolytica* serinden zengin antijenleri hedef alan (Optimum S kit; Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany) kitler ticari olarak sunulmaktadır. Bu ticari tanı kitlerine ek olarak araştırma amacıyla lizinden zengin yüzey antijenine, lipofosfoglikana, tükürük 170-kDa lektin bağlayıcı antijene ve karakterize edilmeyen bir antijene karşı antijen testleri geliştirilmiştir [43]. Amibik antijenler tükürükte, serumda ve apse sıvısında tespit edilebilmiştir. Hughes ve arkadaşları çoğu karaciğer apseli amöbiyozlu hastaların serumunda TechLab *E. histolytica* test II kitiyle Gal/GalNAc lektin antijeni tespit etmeyi başarmışlardır [44]. Sengupta ve arkadaşları, *E. histolytica* trofozoitlerine karşı elde ettikleri monoklonal antikorları kullanarak yaptıkları ELISA yönteminin çok düşük düzeydeki antijen varlığında dahi doğru sonuç verdiğini ve *E. nana*, *E. coli*, *I. butschlii* ve *E. hartmanni* gibi amip türleriyle çapraz reaksiyonun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir [45].

C. Moleküler biyoloji temelli yöntemler

Moleküler testler metodu intestinal amöbiyoz tanısında duyarlılık ve özgüllük açısından antijen saptama yöntemleri ile yarışmaktadır. Ancak hem teknik olarak ELISA'dan zordur, hem de daha pahalı bir yöntemdir. Profesyonel laboratuvar elemanı ve özel ekipman gerektirdiğinden amöbiyozun endemik olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanımı sınırlıdır. Ancak diğer tanı yöntemlerine (mikroskopi, antijen saptama vb.) kıyasla 'altın standart' olma potansiyeli daha fazladır. *E. histolytica*'nın genetik polimorfizm araştırmalarında da kullanılmaktadır. Yine de PCR'ın kros-kontaminasyona açık olduğu ve dışkıdaki inhibitörlerden kolay etkilendiği unutulmamalıdır. Dışkıdan deoksirübonükleil asit (DNA) izolasyonunun

başarısı ve spesifik primerlerin kullanılması uygulanan PCR yönteminin verimini doğrudan etkiler. Dışkıdan DNA izolasyonundaki başarısı ve kolay kullanımı nedeniyle ticari kitlerin kullanımı tavsiye edilmektedir [46]. Bu yöntemle dışkınn mg'nda bulunan trofozoit sayısı belirlenebilmektedir [47]. Riboprinting küçük veya büyük rDNA subunitlerinin amplifikasyonu ve restriksiyon enzimleriyle fragmentasyonu olarak tanımlanmakta ve *Entamoeba* türlerinin ayrımında faydalı şekilde kullanılabilen bir yöntemdir Ribotiplendirme amip türlerinin epidemiyolojisini anlamakta oldukça faydalı bir yöntem olmakla birlikte uygulaması zor, maliyetli ve zaman alıcıdır [21].

PCR amibik karaciğer apsesi tanısında da kullanılabilir, ancak DNA izolasyonu öncesinde aspirasyon materyalini proteazlarla muamele etmek gerekmektedir [21].

Amibik kolit ve amibik karaciğer (KC) apsesi için kullanılan tüm tanı testlerinin duyarlılık ve özgüllük yönünden karşılaştırılması Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Amöbiyozis için kullanılan tanı testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri [12]

Test ve örnek tipi		Amibik kolit		Amibik KC apsesi
		Duyarlılık (%)	Özgüllük(%)	Duyarlılık (%)
Mikroskopi	Dışkı	<60	10-50	<10
	Apse sıvısı	VY*	VY*	<25
İzoenzim analizi ile kültür		PCR veya antijen testlerinden daha düşük	Altın standart	<25
Antijen saptama (ELISA)	Dışkı	>95	>95	Genellikle negatif
	Serum	65 (erken dönemde)	>90	~75 (geç); ~100 (ilk 3 gün)
	Apse sıvısı	VY*	VY*	~100 (tedaviden sonra)
	Tükürük	yapılmadı	yapılmadı	70
PCR	Dışkı	>70	>90	yapılmadı
Serumda antikor saptama (ELISA)		>90	>85	70-80 (akut dönem); >90(iyileşme dönemi)

*VY: veri yok

2.4.3. Diğer Tanı Yöntemleri

Komplike olmayan bağırsak amöbiyozunda kan tablosu normaldir veya çok az değişiklik gösterir. Fakat parazitozun dizanterik şeklinde kansızlık görülür. Dehidre durumdaki hastalarda hemokonsantrasyon nedeniyle bu durumun gözden kaçabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca süreğen amibik kolitte ve/veya işe bakterilerin karıştığı amibik apandisitte, orta derecede nötrofilik lökositoz görülebilir. Amöbiyozun farklı tiplerinin tanısında radyoloji, rektoskopi, sigmoidoskopi (eğer distal bağırsak etikelenmemişse sigmoidoskobinin bir yararı yoktur), kolonoskopi gibi yardımcı yöntemlerden de yararlanılır. Radyolojik incelemeler bağırsakta lezyonların yerleşim yerlerini, baryum verildikten sonra görüntü alınması da bağırsaktaki dolma defektlerini belirler. Plevra veya akciğerdeki gölgeler apseyi çağrıştırır. Tabanı karaciğer yönünde, tepesi hiluma uzanan, üçgen görünümdeki gölge hepato-bronkiyal fistüle işaret eder. Karaciğer skenning ise amibik apsenin saptanmasında çok yararlıdır. Bu işlemle, şüphe edilen multiple lezyonlar belirlenebileceği gibi tedavi esnasında da lezyondaki değişiklikler izlenebilir. Ultrasonografi (USG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) de yine bu parazitozun tanısında kullanılan önemli yöntemlerdir [11]. Ancak bu teknikler amip apsesini, pyojenik apsedan ayıramamaktadır; ayırıcı tanı için, serumda amibe karşı antikörlerin serolojik yöntemlerle aranması veya aspirasyon materyalinde amiplerin görülmesi gereklidir. Amöbiyozis tanısında yukarıda sözü edilen yöntemler dışında; kompleman birleşmesi, amip immobilizasyonu, Stafilokok A proteini ile yüzey koagülasyonu, Bentonite flokulasyon, Latex aglütinasyon, Ouchterlony immunodiffüzyon, kapiller tüp presipitin, fluoresans immunoassay, selüloz asetat membran presipitin, *E. histolytica* trofozoitlerinin parçalanmasıyla elde edilen antijenlerin cilt içine uygulanmasıyla yapılan deri testi yöntemlerinin de kullanılabildiği bildirilmektedir [48].

2.5. Ayırıcı Tanı

Amibik kolit, diğer kolit şekillerinden ayırt edilmelidir. Bunlar arasında idiyopatik ülseratif kolit, kolorektal karsinoma, bağırsak şistozomiyozu, ağır trikuriyoz, balantidiyoz sayılabilir. Crohn hastalığı, ilioçekal tüberküloz, divertikülit ve anorektal lenfogranüloma venerum, şigeloz ve bruselloz da bu parazitozla

karıştırılabilir. Karıştırıldığı bir diğer parazitoz da *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) enfeksiyonudur. Şigelloz, salmonelloz ve ülseratif kolitli kişilerin dışkılarında çok sayıda polimorfonükleer lökosit bulunduğu, amöbiyozlu kişide ise böyle olmadığı ayırıcı tanıda yardımcıdır. Nadir de olsa şigelloz ile amöbiyozun birlikte olabileceği unutulmamalıdır [11].

Karaciğer amöbiyozunda önemli radyolojik bulgu diyafragmanın sağ tarafta yükselmiş görünümüdür. Kanda normokromik normositer anemi saptanır fakat karaciğer fonksiyon testleri normaldir veya çok hafif bir yükselme vardır. Skenning bu organdaki dolma defektini gösterme yönünden büyük önem taşır ama lezyon henüz tam gelişmemişse atipik bir görüntü alınır. Karaciğerdeki lezyonların yaklaşık %70'i tek olmakla birlikte çocuklarda ve dizanterinin de görüldüğü olgularda birden fazla lezyon görülebilir. Bu konuda USG ve BT incelemeleri çok yararlıdır. Lezyonlar yuvarlak-oval görünümde ve yaklaşık 4-10 cm çapındadır ve bunların çoğu USG'da hipoekoik, belirgin çeperli olarak gözlenir. Erişkin erkekte, sinsi başlangıç, kronik ishal öyküsü, göğüs ağrısı, sağ lopta tek lezyon varlığı amöbiyozun lehine bulgulardır [11].

2.6. Tedavi

Bağırsak amöbiyozunda klinik belirtiler kendiliğinden ortadan kalkabilir ama bu parazitoz, özgül ilaç tedavisi olmadan iyileşmez. Amöbiyozun bütün tiplerine aynı dercede etkili, ideal tek bir ilaç yoktur. İlaçla tedavinin yanında hastaya destek tedavisi de uygulanmalıdır [11].

Amöbiyozda tedavi uygulanırken hastanın kliniği göz önüne alınmalıdır. Asemptomatik olgularda serolojik olarak serumda yüksek pozitif antikor yanıt varsa ve/veya direkt mikroskopi sonucu eritrosit fagosite etmiş eritrositler varsa tedavi uygulanması gerekir. Serumda antikor pozitifliği yoksa ve trofozoitler eritrosit fagosite etmemişse bireyin *E. dispar* ile enfekte olduğu düşünülerek tedaviye gerek duyulmayabilir. Fakat ayırıcı tanı yöntemleri (ELISA, PCR, izoenzim analizi) kullanılarak kesin tanı konulmalı ve tedavi buna göre verilmelidir [49]. *E. histolytica* ile enfekte bireyler asemptomatik olmalarına rağmen tedavi edilmelidirler, aksi takdirde kist taşıyıcısı olarak tanımlanan bu bireyler çevrelerindeki insanlara paraziti bulaştırabilir veya aylar sonra bu kişilerde amibik kolit gelişebilir [50]. *E.*

histolytica'ya karşı etkili ilaçlar etki yerlerine göre farklılık göstermektedir. Lümende ve dokuda yerleşen trofozoitlere etkili olanlar, sadece dokuda yerleşen trofozoitlere etkili olanlar, sadece luminal trofozoitlere etkili olanlar olmak üzere 3 gruba ayrılabilir [1].

2.6.1. Lümende ve Dokuda Yerleşen Trofozoitlere Etkili Olanlar

Bu grupta yer alan ilaçlar nitroimidazol türevleridir.

A. Metranidazol: Hastalarda %90'dan yüksek oranda iyileşme sağlar ve ilk seçenek olarak kullanılmalıdır. Erişkinlere günde 1,5-2 gr 7-10 gün yemeklerden önce 3-4 kez, çocuklarda 40-50 mg/kg 3 dozda 7-10 gün olarak uygulanır. Parazitin kist formuna karşı etkisizdir. Hücre içinde serbest radikallere dönüşür ve DNA replikasyonunu inhibe eder. Hamilelerde ve karaciğer yetmezlikli hastalarda kullanılması tavsiye edilmez. Metronidazol tedavisi sırasında hastaların %30'unda yan etkiler geliştiği için paramomisin'le birlikte verilmemelidir [13].

B. Seknidazol: Ağızda metalik tat oluşturmaması ve tedavi süresinin kısa olması nedeniyle metranidazolün yerini almaya başlamıştır. Erişkinlere 2 gr tek doz bir gün, çocuklarda 30 mg/kg bir gün olarak uygulanır. Asemptomatik durumlarda bu dozlar üç gün devam ettirilmelidir [13].

C. Tinidazol: Çocuklarda kullanılması önerilmeyen bu ilaç günde 50-60 mg/kg tek doz 3-5 gün olarak uygulanmaktadır [13].

D. Ornidazol: Günde 3 gr 3-5 gün verilen bu ilaç tinidazol gibi çocuklar için uygun değildir. Tinidazol ve ornidazolün yarılanma ömürleri daha uzun, yan etkileri daha az ve tedavi süreleri daha kısadır [13].

E. Niridazol: Tedavide önerilmeyen bir ilaçtır, çünkü nöropsikiyatrik ve diğer yan etkileri fazladır [13].

2.6.2. Sadece Dokuda Yerleşen Trofozoitlere Etkili Olanlar

A. Emetin: Tedavi süresi beş gün ile sınırlı tutulmalıdır. Hipotansiyon, taşikardi, dispne ve perikardiyal hasara neden olabilmektedir. Günde 1 kez 1mg/kg (en fazla 65mg) erişkinlerde, çocuklarda 2mg/yaş 5-10 gün süreyle uygulanmaktadır [13].

B. Dehidroemetin: Emetin'e göre daha az toksik olması nedeniyle tercih edilmektedir. Günde 1 kez 1mg/kg (en fazla 90 mg) olarak uygulanır [13].

C. Klorokin: Bu ilaç DNA sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Akut amibik kolit sonrasında metranidazol kullanımına rağmen karaciğer apsesi gelişmişse kullanılmalıdır. Yan etkilerinin sıklığından tercih edilmemektedir. Günde 2 kez 500 mg, 1-2 gün uygulamanın ardından 14-20 gün süreyle 250 mg idame dozu olarak devam ettirilmelidir [13].

2.6.3. Sadece Lümende Yerleşen Trofozoitlere Etkili Olanlar

A. Iyodoquinol: Asemptomatik amöbiyozda portörlerin tedavisinde veya ekstraintestinal amöbiyozda doku amibisidleriyle birlikte kullanılabilir. Günde 3 kez 650 mg 20 gün süre ile kullanılmalıdır [13].

B. Diloksanit furoat: Güçlü bir luminal amibisididir. Asemptomatik olgularda %90'a varan bir eradikasyon sağlar. Doku trofozoitlerine etkisiz olup çok hafif gastrointestinal bozukluklara neden olabilir [13].

C. Antibiyotikler (Tetrasiklin ve oksitetrasiklinler, paromomisin): Tek başlarına tedavide kullanılamazlar diğer amibisid ilaçlarla birlikte kullanılmaları gerekir. Luminal etkili ilaçlar arasında yan etkisi en az olan ve kısa sürede tedaviyi sağlayan paromomisinidir (30 mg/kg/gün, günde 3 doz, 5-10 gün). Paromomisin bağırsaktan emilmez ve kolon mukozasını invaze eden trofozoitlere orta derecede etkilidir. Bu nedenle gebelik döneminde hafif invazif hastalıkta tek ilaç olarak kullanılabilir. Etkinliği %85-90 düzeyinde ve başlıca yan etkisi diyaredir. Başarılı bir amöbiyoz tedavisi için hastalara yatak istirahatı önerilmeli ve bununla birlikte su kaybını önlemeye yönelik tedbirler alınmalıdır. Bağırsak amöbiyozunda fulminan amibik kolitler gelişmişse perforasyon riski nedeniyle geniş spektrumlu antibiyotikler tedaviye eklenmeli ve akut karın, toksik megakolon ve gastrointestinal kanama geliştiğinde gecikmeden cerrahi müdahale yapılmalıdır[13].

2.7. Korunma

Ağız yolundan bulaşan bütün parazitozlarda olduğu gibidir. Bunları kısaca şu şekilde toplayabiliriz:

- Altyapının iyileştirilmesi,
- Karasinek ve hamam böcekleriyle mücadele edilmesi,

- İnsan dışkısının gübre olarak kullanılmasının önlenmesi,
- Topluma temiz içme ve kullanma suyunun sağlanması,
- Toplum bireylerine kişisel temizlik alışkanlıklarının kazandırılması ve eğitimi,
- Çiğ sebze ve meyveleri güvenilir suyla yıkamak veya 100°C'de 30 saniye tutmak,
- Şüpheli suları kaynatarak tüketmek,
- Endemik bölgelere seyahat sonrası kişilerin takibi olarak sıralanabilir [1, 11, 13].

Aşı çalışmaları: Parazitler kompleks yaşam döngüleri, ara konaklarda değişik antijenik özellikleri, konak bağışıklık sistemini etkilemeleri aşı çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Ayrıca hücre içi parazitlerde konak bağışıklık sisteminin etkinliği daha azdır. *E. histolytica* hücre dışı parazittir, ara konağı yoktur ve tek konağı insan ve bazı maymun türleridir. *E. histolytica*'nın konak savunma sisteminde bir takım değişimlere neden olduğu bilinmekle birlikte günümüze kadar herhangi bir antijenik varyasyon bildirilmemiştir. Bu nedenlerle *E. histolytica* için geliştirilen bir aşının diğer parazitlere göre daha başarılı olacağı söylenebilir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda daha önceden amibik kolit ve karaciğer apsesi geçiren hastaların daha sonra enfeksiyona yakalanma riskleri azalmaktadır ve parazitin yüzey lektinlerine karşı gelişen mukozal IgA antikorlarının bu doğal bağışıklık mekanizmasında rol aldığı düşünülmektedir. Geliştirilecek olan aşı doğal bağışıklıktan daha koruyucu olmalıdır. Ayrıca rekombinant amibik proteinler, virulansı azaltılmış parazit veya parazite ait doğal antijenler verilerek yapılan uygulamalardan daha etkilidir [51]. Paraziti yüksek miktarda çoğaltmak ve antijen izole etmek zor, zaman alıcı ve maliyetli bir işlemdir. Buna yönelik olarak bazı araştırmacılar amibik antijenleri virulansı azaltılmış antijenik *Salmonella* ve *Vibrio cholera* vektörü ile rekombinant formda uygulamışlardır. Böylece aynı anda birden fazla bağırsak enfeksiyonuna karşı bağışıklık geliştirilmesi hedeflenmiştir [52]. Ağır (hgl) subuniti kodlayan gendeki DNA dizisinin korunması - mutasyonun azlığı - bu antijenin kullanılmasında küresel olarak bize çok daha efektif olacağı ipuçlarını vermektedir. Kazanılmış immunitenin mukoza immün yanıtla birlikte olduğu sonucu klinik gözlemlerle elde edilmiştir (mukoza anti-lectin IgA antikoru olan kişiler %64 daha az yeni *E.*

histolytica enfeksiyonuna yakalanmışlardır) [53]. Çok yeni bir çalışma olan Gonzales ve arkadaşlarının deneysel karaciğer amibik apse oluşturulan hamsterlardan üç farklı aşı çalışması yapmışlardır. Bu aşılar da 30-kDa'luk *E. histolytica* yüzey kollajen bağlayıcı protein peroksiredoksin (EhCBP30)'i tek başına ve şaperon (CHP) veya ATPaz içeren (ATP) *Trypanosoma cruzi* (TcHSP70)'ye ait ısı şok proteini 70 ile birlikte bulunmaktaymış. rEhCBP30 ve rEhCBP30-CHP ile yapılan rekombinant aşıların hamsterlarda amibik karaciğer apsesi (AKA) gelişimini %70 azalttığını bildirmişler ve iyi bir aşı olabileceğini yayınlamışlar [54].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması; 201111021 nolu ve 27.05.2011 tarihinde kabul edilen ‘Sularla Bulaşan İntestinal Protozoonların Epidemiyolojisi ve Tanıda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması’ adlı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında ‘*Entamoeba histolytica*’nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması’ adlı tez çalışması olup, etik kurul tarafından 31.05.2011-09 tarihinde onaylanmıştır. Çalışmamızın ilk aşamasında; öncelikle gerekli izinler alınarak farklı bölge ilköğretim okulları ve iki farklı hastaneden gelen dışkı örneklerinin toplanması, genel bir bağırsak paraziti taranması ve bölgemizdeki *Entamoeba histolytica/dispar* oranlarının belirlenmesi planlanmıştır. 01.01.2011- 31.07.2012 tarihleri arasında hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen dışkı örnekleri, Eskişehir Devlet Hastanesi acil servisine ishal şikayetiyle gelen hastalardan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen dışkı örnekleri ile Valilik ve Milli Eğitim Müdürlüğünden izin alınıp rastgele seçtiğimiz ilköğretim okullarındaki öğrencilerden ailelerinin izni olanlardan topladığımız dışkı örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Toplanan 977 dışkı örneği; öncelikle moleküler yöntem ile ve ELISA yöntemiyle çalışılmak üzere fiksatsiz olarak ayrılarak -70 derecede saklanmıştır. Kalan örnekler, rutinde bakıldığı şekilde santrifüj edilerek, direkt mikroskobik inceleme (lugol ve serum fizyolojikle) ve trikrom boyama yapılmıştır. Tüm örnekler aksenik besiyeri olan TYI-S-33 besiyerine ekimleri yapılarak 48. saatte trikrom boyama ile değerlendirilmiştir. Direkt mikroskopi ve kültür sonucunda şüpheli kist ve trofozoiti bulunan örnekler ELISA testi ile *Entamoeba histolytica* varlığı araştırılmış, ayrıca ekstraksiyon kiti ile DNA izolasyonları yapıldıktan sonra multiplaks real time PCR yöntemi ile (*Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, ve *Giardia intestinalis*) varlığı araştırılmıştır.

Çalışmamıza katılan ilköğretim okullarından 6’sı Eskişehir il merkezinde olup sadece Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulu kırsal kesimde olup mevsimlik işçilerin bulunduğu bölgededir. Eskişehir merkezindeki ilköğretim okulları Eskişehir Valiliği ve Eskişehir Milli Eğitim Müdürlüğünden izin alınıp rastgele seçilmiştir. Seçilen ilköğretim okulları şunlardır; Halil Yasin İlköğretim Okulu, Milli Zafer İlköğretim Okulu, Porsuk İlköğretim Okulu, Şehit Piyade Üsteğmen Gökhan Yavuz

İlköğretim Okulu (Ş. P. Ü. Gökhan Yavuz İlköğretim Okulu), Ziya Gökalp İlköğretim Okulu, Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu. İlköğretim okullarından sadece ailelerinin izni olan öğrencilerden onam formu ve sosyodemografik özelliklerini içeren bir anket formu doldurularak örnekler toplanmıştır.

Veli onam formları (EK-1), anket formları (EK-2) ve örnek toplama kapları, bir gün öncesinden sınıf öğretmenleri ile birlikte derse girilerek, öğrencilere paraziter hastalıklarla ilgili kısa bilgi verildikten sonra dağıtılmış ve ertesi günü ilk ders saatinde gidilerek örnekler toplanmıştır.

Dışkı örnekleri temiz, ağız geniş ve vidalı kapaklı kaplarda toplanmıştır. Örnekler PCR ve ELISA testlerinde de kullanılmak üzere saf haliyle üç farklı 2 mililitrelik ependorf tüplerine yaklaşık tüpün üçte birini dolduracak şekilde ayrılmış, bunlar 100 lük saklama kutuları içinde -70°C ' de çalışılıncaya kadar saklanmıştır.

Kültür için yine fiksatifsiz şekilde TYI-S 33 besiyerine bezelye büyüklüğünde ekilip 37°C 'lik inkübatöre kaldırılmıştır. Direkt mikroskopi için örnekler serum fizyolojik ve lugol ile incelenmiştir.

Kontaminasyon ve bulaş riski taşıyan tüm işlemler güvenlik kabini içinde yapılmıştır.

Tüm veriler SPSS programına girilerek yöntemler birbirleri ile karşılaştırılmış ve dağılım yüzde olarak tanımlanmıştır [55].

3.1. Direkt Mikroskopik İnceleme

3.1.1. Nativ-lugol Yöntemi

Dışkının parazitolojik açıdan değerlendirilmesinde direkt tanı yöntemlerinden biri olan nativ-lugol yöntemi, basit ve etkili bir yöntemdir. Bir lam üzerine bir köşesine bir damla serum fizyolojik damlatıldı, diğer köşesine bir damla lugol solüsyonu damlatıldı. Üzerine plastik baget yardımıyla alınan yaklaşık 2 mg dışkı kondu her iki köşeye kondu ve iyice karıştırıldıktan sonra üzerine lamel kapatılarak preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar x40 büyütmede incelendi. Bu yöntemde parazitlerin boyanmasını sağlamak amacıyla lugol solüsyonu kullanılmaktadır. Lugol solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Kullanılan maddeler

- Potasyum iyodür 10 gr

- İyot kristalleri 5 gr
- Distile su 100 ml

Hazırlanışı

100 ml distile su içerisinde 10 gr potasyum iyodür çözdürülerek üzerine 5 gr iyot kristalleri eklendi. Çözelti kapaklı kahverengi cam bir şişeye süzülerek stok lugol solüsyonu hazırlandı. Kullanılmadan önce distile su ile bire bir oranında sulandırıldı[28].

3.1.2. Modifiye Formol-Etil Asetat Sedimentasyon Yöntemi

Dışkı numunelerinde parazitlerin kist, trofozoit ve yumurtaları az sayıda bulunabilir. Bu durumda bu yapılar gözden kaçabilir ve sonuç negatif olarak verilebilir. Bu sakıncayı en aza indirmek için dışkı incelemelerinde modifiye formol-etil asetat sedimentasyon yöntemi uygulandı.

Kullanılan maddeler

- %10 Formol
- %0,85 Salin solüsyonu (serum fizyolojik)
- Etil asetat veya eter

Yöntem

- 1) Yaklaşık bezelye büyüklüğünde dışkı örneği (sıvı örneklerde 5-6 ml) üzerine 10 ml %10'luk formol ilave edilerek iyice ezildi. Fiksasyon işlemi için en az 30 dakika beklendi.
- 2) Süspansiyon iki kat gazlı bez konulmuş huniler aracılığı ile 15 ml'lik konik santrifüj tüpüne aktarıldı.
- 3) Süspansiyona 3 ml etil asetat eklendi, tüpün ağzı sıkıca kapatılarak, 30 saniye çalkalandı.
- 4) Süspansiyon 500 X g'de 2-3 dakika santrifüj edildi. Tüp santrifüjden çıkarıldığında 4 tabaka gözlemlendi. En üstte etil asetat tabakası, altında tüpün duvarlarına yapışan dışkı artığı tabakası, onun altında formol tabakası, en dipte ise çökelti görüldü.
- 5) Bir pipet yardımıyla tüpün yüzündeki artıklar üstteki süspansiyonla karıştırılıp döküldü.

6) Dipteki çökeltiden pipet yardımıyla birkaç damla alınıp incelendi [28]. Serum fizyolojik ve lugol ile hazırlanan preparatlar x40 büyütmede incelendi.

3.2. Boyalı Mikroskopik İnceleme

3.2.1. Trikrom Boyası

- Chromtrope 2R 3 gr
- Light green SF 1,5 gr
- Fosfofungustik asit 3,5 gr
- Glasiyel asetik asit 5 ml
- Distile su 500 ml

Renkli cam şişede hazırlandı [28].

3.2.2. D'antoni Solüsyonu

- 2 gr KI
- 200 ml distile su
- 3gr iyot kristali (I₂) karıştırıldı.

100 ml için 5 ml glasiyel asetik asit eklendi [28].

3.2.3. Schaudinn Fiksatif

90 gr Cl₂Hg 1 litre distile su içinde eritildi. 300 ml'si alınıp 500'lük şişeye aktarıldı. Üzerine 150 ml %95'lik etil alkol eklendi. Kullanırken 80 ml stok solusyona 4 ml glasiyel asetik asit eklendi [28].

3.2.4. Trikrom Boyama Yönteminin Uygulanması

1) Schaudinn fiksatif: 30 dak-2 saat fiksasyon

**lam üzerine ince bir tabaka halinde yayılan dışkı örneği tam olarak kurumadan fiksetife konu*

2) D'antoni iyot solüsyonu: 1 dakika \Leftrightarrow IŞIK ALMAYAN ŞALEDE

3) Alkol (%70'lik metanol)-1: 1 dakika

4) Alkol (%70'lik metanol) 2: 1 dakika

5) Trikrom boyası: 8-10 dakika \implies IŞIK ALMAYAN ŞALEDE

6) %90'lık asit alkol: 8-10 saniye

**fazla kalırsa örnekler kırmızıya boyadığı için, konuşma hızında 8'e kadar sayıldı.*

7) Alkol (%100'lük metanol)-1: yavaşça çalkalanır

8) Alkol (%100'lük metanol)-2: 30 saniye

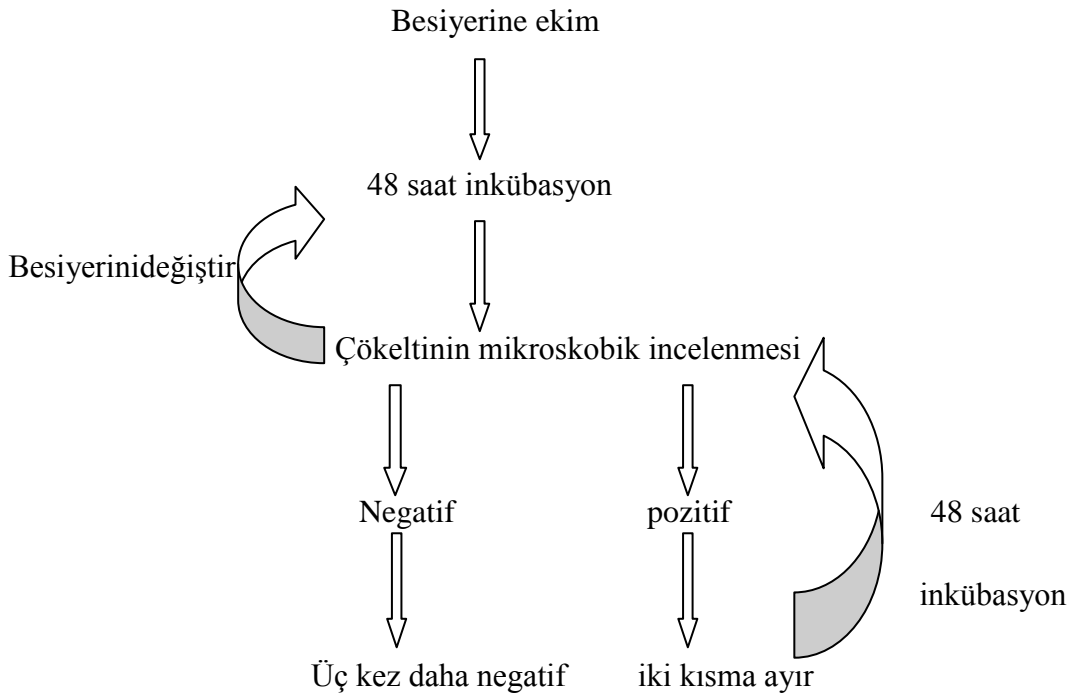
**eğer preparat tam yeşil değilse yeşile dönünceye kadar 1 veya 2 dakika bekletildi.*

9) Ksilen: 1 dakika

Boyama sırasında kullanılan boya kapları ve şalelerin mutlaka renkli ışık almayan tarzda olması gerekir. Hazırlanan preparatlar kuruduktan sonra x100'lük objektifte immersiyon yağı ile incelendi [28].

3.3. Kültür Yöntemi

Tüm örnekler akselik besiyeri olan TYI-S-33 besiyerine ekim yapılmıştır. Kültürde izlediğimiz algoritma Şekil 3.1'de tarif edilmiştir.



Şekil 3.1. Parazitlerde kültür yöntemi ile ilgili algoritma [28]

3.3.1. TYI-S 33 Besiyerinin Hazırlanışı

A. Nutrient broth:

• Potasyum fosfat, dibazik (K ₂ HPO ₄)	1.0 g
• Potasyum fosfat, monobazik (KH ₂ PO ₄)	0.6 g
• Sodyum klorid (NaCl)	2.0 g
• Casein digest peptone	20.0 g
• Yeast extract	10.0 g
• Glukoz	10.0 g
• L-cysteine-HCl	1.0 g
• Askorbik asit	0.2 g
• Ferric ammonium citrate	22.8 g
• Damıtık su	870.0 g

- 1) İçerisinde manyetik karıştırıcı olan 700 ml damıtık suda yukarıdaki malzemeler eritildi.
- 2) 1 N NaOH ile pH 6,8'e ayarlandıktan sonra damıtık su ile 870 ml'ye tamamlandı.
- 3) Whatman No:1 filtre kağıdı ile filtre edildi.
- 4) 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra oda ısısına gelene kadar soğutuldu ve 4°C'de saklandı [28].

B. Vitamin No:13 karışımı:

B1. Solüsyon 1: Solüsyon 1a, 1b, 1c, 1d ve 1e aşağıdaki formüllere göre ayrı ayrı hazırlandıktan sonra aşağıdaki sıra ile karıştırıldı. Karışımın pH'sı 6,5 ile 7,0 arasında ayarlandı [28].

1. Solüsyon 1a:

• Niacin	40.0 mg
• <i>p</i> -aminobenzoik asit	180.0 mg

100 ml damıtık su içinde çözüldü ve 125 ml'ye tamamlandı.

2. Solüsyon 1b:

• Nicotinamide	40.0 mg
----------------	---------

- Pyridoxal hydrochloride 40.0 mg
- Pyridoxine 80.0 mg
- Calcium pantothenate 25.0 mg
- Choline chloride 830.0 mg
- *l*-inositol 125.0 mg
- Thiamine hydrochloride 25.0 mg
- Vitamin B₁₂ 12.0 mg

100 ml damıtık su içinde çözüldü ve 125 ml'ye tamamlandı.

3. Solüsyon 1c:

- Riboflavin 25.0 mg

Manyetik karıştırıcı ile 100 ml damıtık su içinde 1 N NaOH damla damla eklenerek çözüldü ve 450 ml'ye tamamlandı.

4. Solüsyon 1d:

- Folik asit 30.0 mg

Manyetik karıştırıcı ile 100 ml damıtık su içinde 1 N NaOH damla damla eklenerek çözüldü ve 450 ml'ye tamamlandı.

5. Solüsyon 1e:

- D-biyotin 30.0 mg

Manyetik karıştırıcı ile 100 ml damıtık su içinde 1 N NaOH damla damla eklenerek çözüldü ve 450 ml'ye tamamlandı.

B2. Solüsyon 2: Solüsyon 2a ve 2b aşağıdaki formüllere göre ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karıştırıldı. Karışım damıtık su ile 300 ml'ye tamamlandı [28].

1. Solüsyon 2a:

- DL-6,8-thioctic acide (okside) 100.0 mg
- %95 etanol 50.0 ml

2. Solüsyon 2b:

- Tween 80 5.0 g
- Menadione sodium bisulfite 30.0 mg
- α -tokopherol acetate 25.0 mg

Manyetik karıştırıcı ile 100 ml damıtık su içinde çözüldü ve 200 ml'ye tamamlandı.

B3. Solüsyon 3: Solüsyon 1 ve solüsyon 2 karıştırıldı ve damıtık su ile 2000 ml'ye tamamlandı. 0.22 μ m por çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edildi. Aseptik olarak 50 ml'lik steril endorff tüplerine bölüştürüldü. Üzerine tarih yazılıp 'vitamin mix No: 13' yazılarak -70°C'de saklanmıştır [28].

C. Tam besiyerinin hazırlanması:

- Nutrient broth 870.0 ml
- Bovine serum (56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş) 100.0 ml
- Vitamin mix No:13 20.0 ml

Karışımın pH'sı 6,6 olacak şekilde ayarlandı. Aseptik olarak küçük hacimlerde (~13-15 ml) kapaklı cam tüplere (16x125 mm) dağıtıldı. Tüpler %75'ine kadar dolduruldu. Karanlıkta 4°C'de iki hafta içinde kullanmak üzere saklandı [28].

3.3.2. TYI-S 33 Besiyerine Ekim ve Değerlendirme

Karanlıkta 4°C'de bekletilen taze besiyerleri 35°C'de 1-2 saat inkübe edildi. Bezelye büyüklüğünde dışkı besiyerine inoküle edildi. Dışkının varsa mukuslu ve kanlı kısımlarından örnek alındı. 48 saat inkübe edildi. Amipler varsa tüp duvarına yapışacağı için 5- 10 dakika buzlu suya daldırıp besiyeri nazikçe çalkalandı amipin duvardan ayrılıp homojen olarak dağılması sağlandı. Tüm örnekler pastör pipetiyle temiz bir lama ince tabaka halinde yayılıp tam kurumadan trikrom boyama setine alındı. Boyanan örnekler x100'lük objektifte immersiyon yağı ile incelendi. Negatif olan örnekler üç kez daha pastör pipetiyle taze besiyerine ekilip 48 saat sonra tekrar değerlendirildikten sonra negatif olarak çıkarılmıştır.

3.4. ELISA

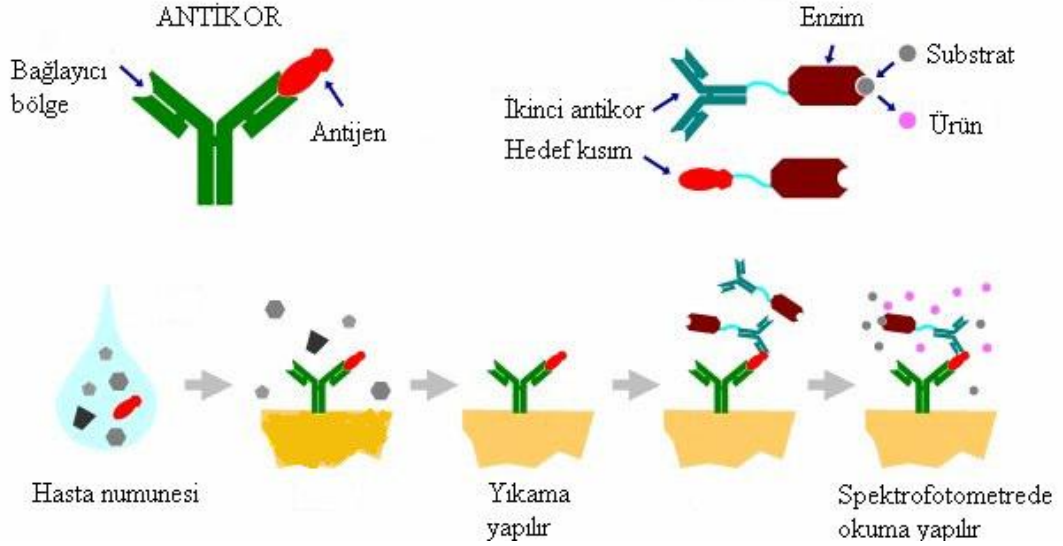
ELISA testi ile direkt mikroskopi ve kültür yöntemlerinden amip kist/trofozoit olarak tanımlanan örnekler, ESOGÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen örnekler, Eskişehir Devlet Hastanesi çocuk acil servisine ishal şikayeti ile gelen örnekler ve Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulundan gelen dışkı örneklerinin tamamı (okulun mevsimlik işçilerin geldiği bölgede olması nedeniyle) ELISA testi ile çalışılmıştır (Toplam 360 hasta). Örnekler çalışma öncesi -70°C'lik derin dondurucudan çıkarılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

Enzim bağlı immuno sorbent testinin ilkeleri;

- Bir enzimin bilinen bir antijen ya da antikora bağlanması,
- Enzim bağlı materyalin hasta örneği ile tepkimeye sokulması,
- Enzime ait substrat eklenerek enzim etkinliğinin ölçülmesidir.

Antikor ölçümü için bilinen antijenler olduğu gibi katı bir yüzeye (örneğin: Plastik bir levhada küçük kuyucukların dibine) tespit edilir. Hasta serumunun çeşitli seyreltileri ile inkübe edilir, yıkanır. Yıkama sonunda antikora özgü spesifik antijen hariç diğer antijenler atılır. Spesifik antikorlar antijenlerle non-kovalent bağlarla birleşir. Daha sonra konjugat eklenir. Konjugatın içerisindeki enzim ve spesifik ikinci antikor, antijen-antikor kompleksi ile birleşir. Son olarak ortama substrat eklenir. Substrat, enzim ile reaksiyona girerek ürün oluşturur ki bu da renk oluşumuna sebep olur. Enzim etkinliği, enzime ait substratın eklenmesi ve oluşan rengin bir spektrofotometrede okunması ile ölçülür. Bağlı antikor miktarı enzim etkinliği ile orantılıdır (Şekil 3.2)

ELISA



Şekil 3.2. ELISA testi çalışılmasının şematik anlatımı [56]

Tanıda TECHLAB (Blacksburg, VA 24060, USA) tarafından üretilen *E. HISTOLYTICA* II ELISA kiti kullanıldı. Kitin kuyucuklarında *Entamoeba histolytica/dispar* adezin antijenine karşı oluşmuş monoklonal antikorlar bulunmaktadır.

Kit prosedürüne göre ELISA testinin uygulanması;

1. Dışkı örnekleri dilüe edildi.

a. Sıvı örnekler; 400 mikrolitre dilüent ile 400 mikrolitre dışkı 2ml'lik ependorfa konulup, karıştırıldı.

b. Katı veya yarı katı örnekler; 400 mikrolitre dilüent ile dilüent hacmi kadar dışkı 2 ml'lik ependorfa konulup, karıştırıldı.

2. Kuyucuklardan biri pozitif kontrol, biri negatif kontrol ve diğе 94 kuyucuk çalışılacak numune kuyucuğу olarak ayarlandı. Tek seferde tüm kit kullanıldı.

3. Tüm kuyucuklara bir damla (50 mikrolitre) konjugat ilave edildi.

Konjugat: *E.histolytica*'nın adezin antijenine karşı spesifik antikorlar ve peroksidaz enzimi içerir.

4. Pozitif kontrol kuyucuğuna bir damla (50 mikrolitre) pozitif kontrol solüsyonu, negatif kontrol kuyucuğuna ise iki damla (100 mikrolitre) dilüent kondu.

5. Sonraki kuyucuğa, dilüe edilmiş dışkı örneğinden 200 mikrolitre eklendi.

6. Kuyucukların ağzı parafinle kapatılıp oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakıldı.

7. İnkübasyon süresi sonunda ayrı ayrı pipetler yardımı ile kuyucukların her birinin üstündeki sıvı alınarak atıldı.

8. Tüm kuyucuklar hazırlanan yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkanıp, iyice kurutuldu.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması: 50 mililitre yıkama solüsyonu 950 mililitre distile su ile karıştırıldı (Solüsyon 2-8°C’de saklandı).

9. Tüm kuyucuklara iki damla (100 mikrolitre) substrat eklendi. 5 dakika hafifçe çalkalanıp, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi (Substrat, peroksit ve tetrametilbenzidin içermektedir).

10. Tüm kuyucuklara stop solüsyonundan bir damla eklendikten sonra 2 dakika sonunda spektrometrede 450 nm. dalga boyunda okunmuştur.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Kit prosedürüne göre hasta sonuçları;

- Hasta sonuç değerinden negatif kontrol değeri çıktıktan sonraki değerden yüksek olan sonuçlar yada okunan değer 0.050 nm dalga boyunda ise pozitif olarak değerlendirildi.
- Okunan değer 0.050 nm dalga boyunun altındaki değerler negatif olarak değerlendirildi.

3.5. PCR

Örnekler -70°C’den oda ısısına çıkarıldı. Oda ısısına gelen örneklerden önce QIAamp DNA Stool Mini Kit ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı, ekstrakte edilen örnekler Gastrointestinal Parasites 5;A Multipleks Tandem PCR kiti (AusDiagnostics Pty Ltd) ile değerlendirildi.

3.5.1. Ekstraksiyon

Mikroskopik inceleme sonucu 977 örnekten parazit kist ve yumurtası görülmeyen örnekler rastgele çıkarılarak, elimizde 750 ekstraksiyon kiti bulunması

sebebiyle 750 dışkı örneğinin ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde uygulandı [57].

Başlamadan Önce

1. Buffer AW1 ve Buffer AW2'nin üzerlerindeki etikette yazdığı oranlarda sulandırıldı.

2. Eğer Buffer ASL veya Buffer AL içerisinde çökeltiler oluşmuşsa, bunlar 70°C'de inkübe ederek çözüldü.

3. Adım 3 ve adım 12'de kullanılmak üzere ısıtıcı blok 70°C'ye ayarlandı.

Protokol:

1) Katı örnekler için 180-220 mg sıvı örneklerde ise 500 µl dışkı 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı.

2) Her bir örnek üzerine 1,4 ml Buffer ASL eklendi (Şekil 3.3). Dışkı örneği tamamen homojenize oluncaya kadar, yaklaşık 1 dk. vortekslendi.

3) Elde edilen karışım 5 dk ısıtıcı blokta 70°C'de inkübasyona bırakıldı.

4) Örnekler 15 sn vortekslenip, en yüksek devirde (14000) 1 dk. dışkı çökeltisi elde edinceye kadar santrifüj edildi.

5) Üst sıvıdan 1,2 ml alıp, yeni 2 ml'lik ependorf tüpleri içerisine pipetlendi. Dip kısmındaki çökelti kısımları atıldı.

6) Her bir örnek içerisine 1'er adet InhibitEX Tablet ekleyip (Şekil 3.3), sonrasında 1 dk tablet tamamen eriyene kadar vortekslendi. İnhibitörlerin InhibitEX matrix'ine yapışmasını sağlamak için, örnekleri 1 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

7) İnhibitörlerin çökmesini sağlamak amacıyla örnekleri en yüksek devirde 3 dk santrifüj edildi.

8) Üstte kalan sıvıdan, 200 µl'yi 1,5 ml'lik yeni ependorf tüpleri içerisine alıp, çökelti kısımlarını atıldı. Ardından örneklerinizi 3 dk en yüksek devirde santrifüj edildi.

9) Tüm örneklerin üzerlerine 15'er µl proteinase K eklendi.

10) 200'er µl Buffer AL ekleyip, 15 sn vortekslendi.

11) Isıtıcı blokta 70°C'de 10 dk. İnkübasyons bırakıldı. Tüp kapaklarındaki damlacıkları önlemek için santrifü edildi.

12) Lizatların üzerlerine 200'er µl ethanol (%96-100'lük) ekleyip, vorteksleyerek karışmalarını sağlandı. Tüp kapaklarındaki damlacıkları önlemek için santrifüj edildi.

13) Örnek sayısı kadar QIAamp spin kolon çıkartıp, kapak kısımlarını numaralandırıldı. Daha sonra, kapakları kapatıp 12. adımda elde edilen tüm lizatu spin kolonlara aktarıp, en yüksek devirde 1 dk santrifüjlendi. Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 2 ml'lik ependorflara aktarıldı.

14) QIAamp spin kolonların kapaklarını dikkatlice açılarak, içlerine 500'er µl AW1 eklendi. Kapakları yeniden kapatılarak, en yüksek devirde 1 dk santrifüjlendi. Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 2 ml'lik ependorflara aktarıldı.

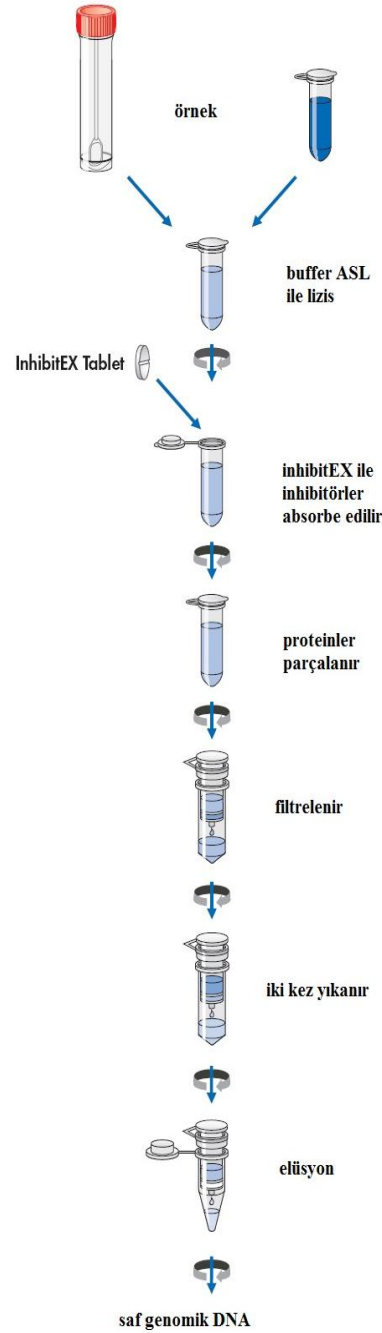
15) QIAamp spin kolonların kapaklarını dikkatlice açıp, içlerine 500'er µl AW2 eklendi. Kapakları kapatılarak, en yüksek devirde 3 dk santrifüjlendi.

16) Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 2 ml'lik kolleksiyon tüplere aktarıldı. En yüksek devirde 1 dk santrifüjlendi. Bu basamak, filtre üzerinde kalan ethanol ve buffer'ın uzaklaştırılması için uygulandı.

17) Alttaki sıvılı kısmı atıp, filtre kısımlarını yeni boş 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. QIAamp spin kolonların kapaklarını dikkatlice açılarak, direkt membranların üzerlerine 60'er µl buffer AE eklendi (Şekil 3.3). Daha sonra kapaklarını kapatıp, 1 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından en yüksek devirde 1 dk. santrifüjleyerek, DNA ayrıştırıldı.

18) 1,5 ml'lik tüplerin kapakları kapatıldı.

1,5 ml'lik tüplere ayrılan ekstrakte örnekler 0,2 ml'lik üç ependorf tüpüne 20'er µl pipetlenerek ayrıldı ve bu örnekler de çalışılıncaya kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.3. Ektraksiyon işlemlerinin şematik görünümü [57].

3.5.2. Multipleks Tandem Real-Time PCR

Multipleks Tandem Real-Time PCR yöntemi ile ekstrakte edilmiş 750 örnekten direkt mikroskopi ve kültür yöntemlerinden herhangi biri ile amip kist/trofozoit tanımlanan örnekler, ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

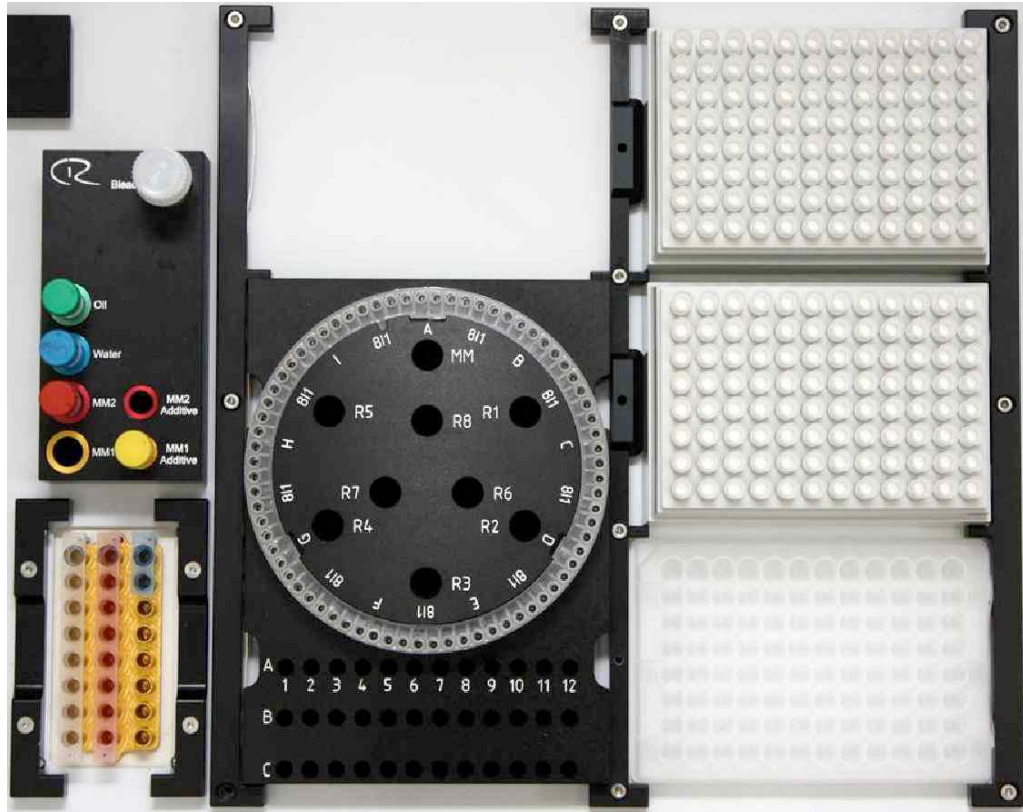
laboratuvarına gelen tüm örnekler, Eskişehir Devlet Hastanesi acil servisine ishal şikayeti başvuran hastalardan alınan dışkı örneklerinin tamamı ile mevsimlik işçi göçünün olduğu bir bölgede olan Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulundan gelen 420 örnek PCR yöntemi ile çalışılmıştır (elimizde 420 test bulunması sebebiyle). Ancak bunlar arasında bazı örneklerin internal kontrollerinin çalışmaması nedeniyle, toplam 402 örnek değerlendirilebilmiştir. Multipleks Tandem Real-Time PCR yöntemi dışkıda *Cryptosporidium spp.*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia intestinalis* varlığını saptamaktadır. Testin prensibi; iki sekansiyal PCR basamağından oluşmaktadır. Birinci basamakta bütün hedef bölgelerdeki primerlerle preamplifikasyon uygulanır. Bu aşamada RNA hedef bölgeleri ile revers transkriptaz basamağı oluşmaktadır (Komplementer DNA sentez reaksiyonu gerekli değildir). Birinci basamakta sentez edilen ürünler dilüe edilerek iç içe (nested) primerler içeren kuyucuklara dağıtılır. Tüm bu işlemler otomatik olarak *Easy-Plex™* sistemi tarafından yapılmaktadır. İkinci basamakta PCR reaksiyonu Rotor-Gene Q ile gerçekleştirilmektedir. DNA varlığında spesifik DNA amplifikasyonu gerçekleşmekte, bu işlem sırasında 'Eva-Green™ dye' ile floresans vererek DNA miktarı ölçülebilir hale gelmektedir.

Birinci basamakta beş bölge amplifiye edilmektedir. Test bloğunda 6 kuyucuklu ve 8 kuyucuklu toplam 14 hasta çalışılabilen örnek koyma stripleri bulunmaktadır. İkinci basamakta ise 72 kuyucuklu yuvarlak oluşturmuş tüplerde çalışılmaktadır. Bütün birinci basamak tüpleri internal kontrol içermektedir. Ayrıca yine birinci basamakta her hedef bölgedeki DNA için DNA ergime ısılarını da saptamaktadır.

Multipleks tandem real-time PCR yönteminde 4 farklı parazit çalışılmaktadır. Bunlardan *E. histolytica* için peroxiredoxin gen bölgesi kullanılmış olup prx olarak kısaltılmıştır. *Dientamoeba fragilis* için small subunit Ribozomal (16S-like) RNA bölgesi, *Cryptosporidium spp.* için 18S Ribozomal RNA, *Giardia spp.* için small subunit Ribozomal (16S-like) RNA bölgesi kullanılmıştır. SPIKE olarak görünen internal kontroldür (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Multipleks tandem real-time PCR yönteminde kullanılan parazitlerin gen bölgeleri ve kısaltmaları

Hedef bölge (Target)	kısaltması
<i>Entamoeba histolytica</i> peroxiredoxin geni	prx
<i>Dientamoeba fragilis</i> small subunit Ribozomal (16S-like) RNA	Dientamoeba
<i>Cryptosporidium spp.</i> 18S Ribozomal RNA	Cryptosporidium
<i>Giardia spp.</i> small subunit Ribozomal (16S-like) RNA	Giardia
İnternal kontrol	SPIKE



Şekil 3.4. Easyplex real-time PCR cihazı

Multipleks Tandem Real-Time PCR yöntemi için üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde çalışıldı [58].

- 1) Easyplex cihazının kapağı ve bilgisayar açıldı.

2) 8 ve 6 kuyucuklu olan tüplere örnek sırasına göre ekstrakte ettiğimiz örneklerden 10'ar µl pipetlendi.

3) Easyplex cihazının sol üst köşesindeki bloktaki bölmelere (Şekil 3.4) kitin içinden oda sıcaklığında saklanan su ve yağ yazan renkli kapaklı tüplerle -20°C'de saklanan mastermix 1 ve 2 yazan renkli kapaklı tüpleri renk kodlarına doğru yerlere yerleştirilip kapakları açıldı. Kitin içinden çıkan boş tüpe ise 4 ml çamaşır suyu koyup renksiz olan yere kapağı açılıp yerleştirildi.

4) Easyplex cihazının ortasındaki bloğa (Şekil 3.4) yuvarlak şekilli tüpler üzerindeki plastiği çıkarıp yerleştirildi.

5) Easyplex cihazının sağ üst köşesindeki iki bölmeye (Şekil 3.4) cihaza uygun steril 100 µl'lik pipet içeren 96'lık raklar yerleştirildi.

6) Easyplex cihazının sağ alt köşesindeki bölmeye kitin içerisinden çıkan 96'lık pleyt yerleştirildi.

7) Easyplex cihazının kapağı kapatılıp bilgisayardan örnekler uygun sırasına göre kodlanıp cihaz çalıştırıldı.

8) İşlem bittikten sonra Easyplex cihazının kapağı açılıp içinden yuvarlak şeklinde tüpler alınıp ve kitin içinden çıkan özel plastik madde tüplerin üzerine yapıştırıldı.

9) Yapıştırma işleminden sonra yuvarlak şeklindeki tüpler rotor-gene cihazına yerleştirildi.

10) Easyplex cihazının sonuçları rotor-gene cihazına gönderilip ikinci bir program ile ikinci basamak başlatıldı.

11) İşlem bittikten sonra sonuçlar kaydedildi [58].

Sonuçların değerlendirilmesi

Testin çalışma kontrolü, internal kontrolün çoğaldığının görülmesiyle sağlanmaktadır. İnternal kontrol çalışmaya başladığında ekranda spike yazan bölümde var olduğunu gösteren 'present' yazısı çıkmaktadır. Diğer parazitler için moleküler yöntem ile gen bölgelerinde çoğalma varsa onların da karşılarında var olduklarını gösteren 'present' yazısı çıkmakta ve kopya sayısı yazmaktadır. Eğer spike yazan bölmede çoğalma yoksa parazitin karşısında 'present' yazsa bile test geçersiz sayılmaktadır (Tablo3.2).

Tablo 3.2. PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

prx*	Dientamoeba	COWP**	Giardin	Spike	Yorum
+				+	<i>Entamoeba histolytica</i>
	+			+	<i>Dientamoeba fragilis</i>
		+		+	<i>Cryptosporidium</i> ookisti
			+	+	<i>Giardia intestinalis</i>
+/-	+/-	+/-	+/-	-	Geçersiz sonuç

* *Entamoeba histolytica* peroxiredoxin geni

***Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)

4. BULGULAR

Bu çalışmada; 01.01.2011- 31.07.2012 tarihleri arasında toplanan toplam 977 dışkı örneği (483 kadın, 476 erkek, 18 isimsiz) çalışılmıştır. Örneklerin tamamına direkt mikroskopi, trikrom boya ve kültür işlemleri uygulanmış olup, bunlardan 351 örneğe (174 kadın, 168 erkek, 9 isimsiz) deneysel çalışmamızda kullandığımız tüm yöntemler uygulanmıştır. Direkt mikroskopik inceleme ile 40'ı kadın 42' si erkek ve 1 isimsiz olmak üzere 83 örnekte şüpheli amip kist ve trofozoitleri saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Direkt mikroskopi sonucuna göre *E. histolytica/dispar* tespit edilen olguların cinsiyete göre dağılımı

CİNSİYET	Sayı	%	Pozitif Olgu	%
Kadın	174	49.6	40	11.4
Erkek	168	47.9	42	11.2
İsimsiz Örnekler	9	2.6	1	0.3
TOPLAM	351	100.0	83	23.6

Eskişehir İli farklı sosyoekonomik bölgelerden ve kırsal alandan da 1 bölge olmak üzere toplam 7 ilköğretim okulu ve 2 ayrı hastaneden toplam 977 dışkı örneğinin toplanmış olup tüm yöntemleri uyguladığımız 351 dışkı örneğidir. İlk iki sütünde incelediğimiz örneklerin toplandığı yere göre dağılımı ve yüzdeleri son iki sütun ise direkt mikroskopide *E. histolytica/dispar* pozitif olan örneklerin sayıları ve yüzdeleridir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Tüm dışkı örneklerinin ve direkt mikroskopi sonucuna göre *E. histolytica/dispar* tespit edilen dışkı örneklerinin topladığımız bölgelere göre dağılımı

OKUL/HASTANE	Sayı	%	Pozitif Olgu	%
ESOGÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı	88	25.0	62	17.7
Eskişehir Devlet Hastanesi	103	29.3	0	0
Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulu	75	21.3	0	0
Halil Yasin İlköğretim Okulu	17	4.8	11	3.1
Milli Zafer İlköğretim Okulu	1	0.3	0	0
Porsuk İlköğretim Okulu	24	6.8	0	0
Ş. P. Ü. Gökhan Yavuz İlköğretim Okulu	13	3.7	9	2.6
Ziya Gökalp İlköğretim Okulu	6	1.7	0	0
Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu	24	6.8	1	0.3
TOPLAM	351	100.0	83	23.6

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına tüm dışkı örneklerinin 88 tanesi gelmiş olup toplam örnek sayısının %25.0'ini oluşturmaktadır. Bu örnekler en çok örnek dahiliye bölümünden gelmekte olup bunlarında çoğunluğu gastroenteroloji bölümüne başvuran inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip olup ishal atağı ile yatan hastalardan oluşmaktadır. Bu örneklerin kliniklere göre dağılımı ve direkt mikroskopik inceleme sonuçlarına *E. histolytica/dispar* tespit edilen örneklerin sayıları ve yüzdeleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinden toplanan dışkı örneklerinin ve direkt mikroskopik inceleme sonuçlarında *E. histolytica/dispar* tespit edilen örneklerin kliniklere göre dağılımı

SERVİS	Sayı	%	Pozitif Olgu	%
Acil servis	19	5.4	15	4.3
Dahiliye	30	8.5	22	6.2
Enfeksiyon hastalıkları	4	1.1	4	1.1
Fizik tedavi	1	0.3	1	0.3
Genel cerrahi	8	2.3	7	2.0
Kemik iliği transplantasyonu	2	0.6	0	0
Onkoloji	2	0.6	2	0.6
Pediyatri	18	5.1	9	2.6
Pediyatri acil	4	1.1	2	0.6
TOPLAM	88	25.0	62	17.7

İlköğretim okulu öğrencilerinden toplanan toplam dışkı örnek sayısı 687 olup tüm yöntemleri uyguladığımız örnek sayısı 152'dir. Bunların 21 tanesi direkt mikroskopik inceleme ile şüpheli amip kist ve trofozoiti saptanmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. İlköğretim okulu öğrencilerinden toplanan dışkı örneklerinin ve direkt mikroskopik inceleme sonuçlarına *E. histolytica/dispar* tespit edilen örneklerin sınıflara göre dağılımı.

SINIF	Sayı	%	Pozitif Olgu	%
Anasınıfı	16	4.6	0	0
1. sınıf	31	8.8	0	0
2. sınıf	26	7.4	4	1.1
3. sınıf	27	7.7	4	1.1
4. sınıf	23	6.6	9	2.6
5. sınıf	11	3.1	2	0.6
6. sınıf	3	0.9	0	0
7. sınıf	11	3.1	2	0.6
8. sınıf	4	1.1	0	0
Toplam	152	43.3	21	6.0

Direkt mikroskopik inceleme 977 örneğe uygulanmıştır. Tüm yöntemlerin uygulandığı 351 örneğin 83'ünde (%23.6) şüpheli amip kisti, 46'sında(%13.1) şüpheli amip kisti, eritrosit ve lökosit birlikte görülmüş olup 268 (%76.3) örnekte ise hiçbir parazit kist ve yumurtası görülmemiştir (Tablo 4.5).

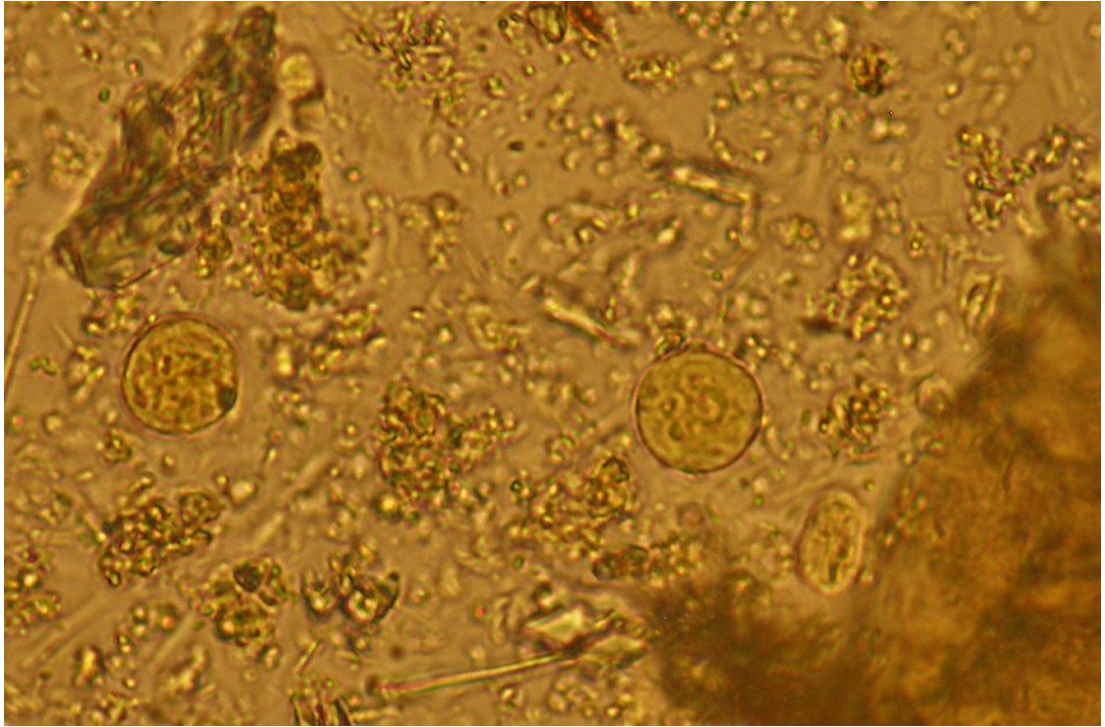
Tablo 4.5. Dışkı örneklerinin direkt mikroskopik inceleme sonuçlarının parazit türlerine göre dağılımı

PARAZİT	Sayı	%
Şüpheli Amip kist/trofozoit	83	23.6
<i>Blastocystis hominis</i>	64	18.2
<i>Giardia intestinalis</i>	18	5.1
<i>Endolimax nana</i>	5	1.4
<i>Entamoeba coli</i>	18	5.1
<i>Enterobius vermicularis</i>	12	3.4
<i>Ascaris lumbricoides</i>	6	1.7
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0.3
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	1	0.3
Negatif	268	76.3
TOPLAM	351	100.0

Direkt mikroskopik incelemede nativ-lugol yöntemiyle gördüğümüz şüpheli amip kisti (Şekil 4.1) ve *Entamoeba coli* kistlerinin (Şekil 4.2) görüntüleri aşağıda verilmiştir. Bu görüntüler ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında mikroskop altında incelediğimiz örneklerden çekilmiş olup bilgisayar ortamına atılmıştır.



Şekil 4.1. Şüpheli amip kisti ve eritrositler (lugol boyama 40X)



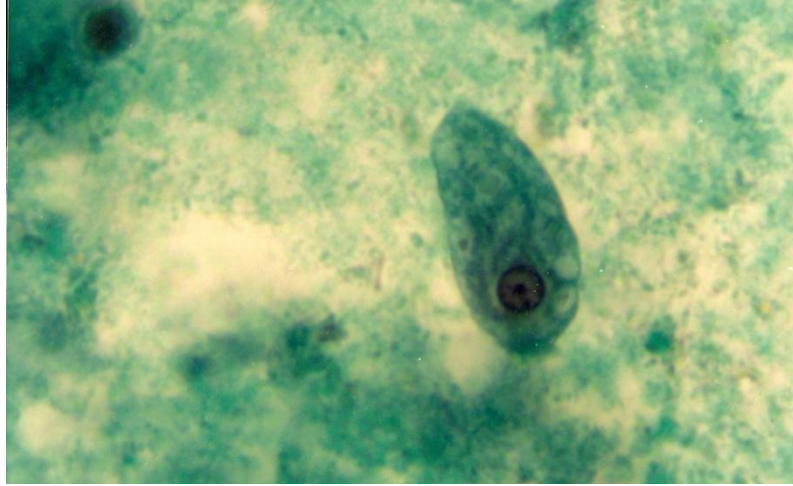
Şekil 4.2. *Entamoeba coli* kistleri (lugol boyama 40X)

Trikrom boyama 977 örneğe uygulanmıştır. Tüm yöntemlerin uygulandığı 351 örnekten 60 (%17.1) tanesinde şüpheli amip kisti/trofozoiti görülmüş olup 188 (%28.4) örnekte ise parazit kist ve yumurtası görülmemiştir (Tablo 4.6).

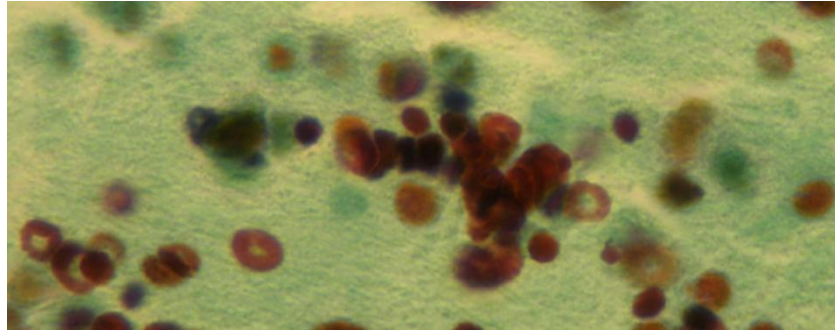
Tablo 4.6. Trikrom boyama yöntemi ile saptanan parazitlerin dağılımı

TRİKROM BOYAMA	SAYI	%
Şüpheli Amip Kist/Trofozoiti	60	17.1
<i>Microsporidia spp.</i>	17	4.8
<i>Blastocystis hominis</i>	56	16.0
<i>Entamoeba coli</i>	18	5.1
<i>Giardia intestinalis</i>	14	4.0
<i>Endolimax nana</i>	6	1.7
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	0.6
Negatif	188	28.4
TOPLAM	351	100.0

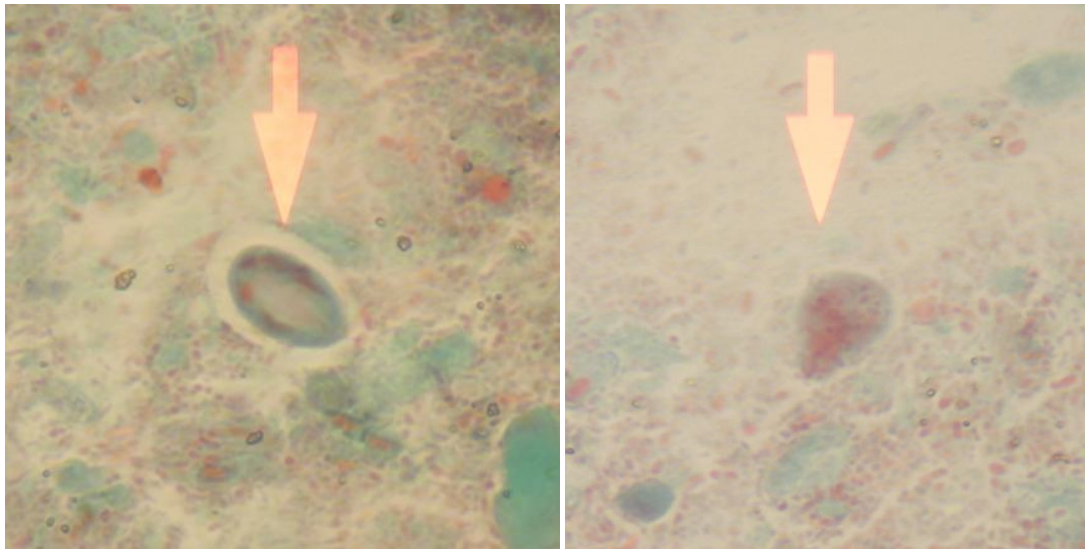
Trikrom boyama yöntemi ile gördüğümüz şüpheli amip trofozoiti (Şekil 4.3), eritrositlerin yapmış olduğu rulo formasyonu (Şekil 4.4) ve giardia kisti ve trofozoiti (Şekil 4.5) aşağıdaki şekillerde verilmiştir. Bu görüntüler ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında mikroskop altında kendi örneklerimizden çekilmiş olup bilgisayar ortamına atılmıştır.



Şekil 4.3. Şüpheli amip trofozoiti (Trikrom boyama100X)



Şekil 4.4. Eritrositlerin yapmış olduğu rulo formasyonu(Trikrom boyama100X)



Şekil 4.5. *Giardia lamblia* kisti (solda) ve trofozoiti (sağda) (Trikrom boyama100X)

TYI-S 33 besiyeri ile aksenik kültür, örneklerin tamamı olan 977 örneğe uygulanmıştır. Tüm yöntemlerin uygulandığı 351 örnekten 45 (%12.8) tanesinde şüpheli amip kisti/trofozoiti görülmüş olup 243 (%69.2) tanesinde parazit kist ve yumurtası görülmemiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. TYI-S 33 besiyerine ekilen örneklerin kültür sonuçları

KÜLTÜR SONUÇLARI	SAYI	%
Şüpheli Amip Kisti/Trofozoiti	45	12.8
<i>Blastocystis hominis</i>	35	10.0
<i>Microsporidia spp.</i>	5	1.4
<i>Giardia intestinalis</i>	11	3.1
Negatif	243	69.2
TOPLAM	351	100.0

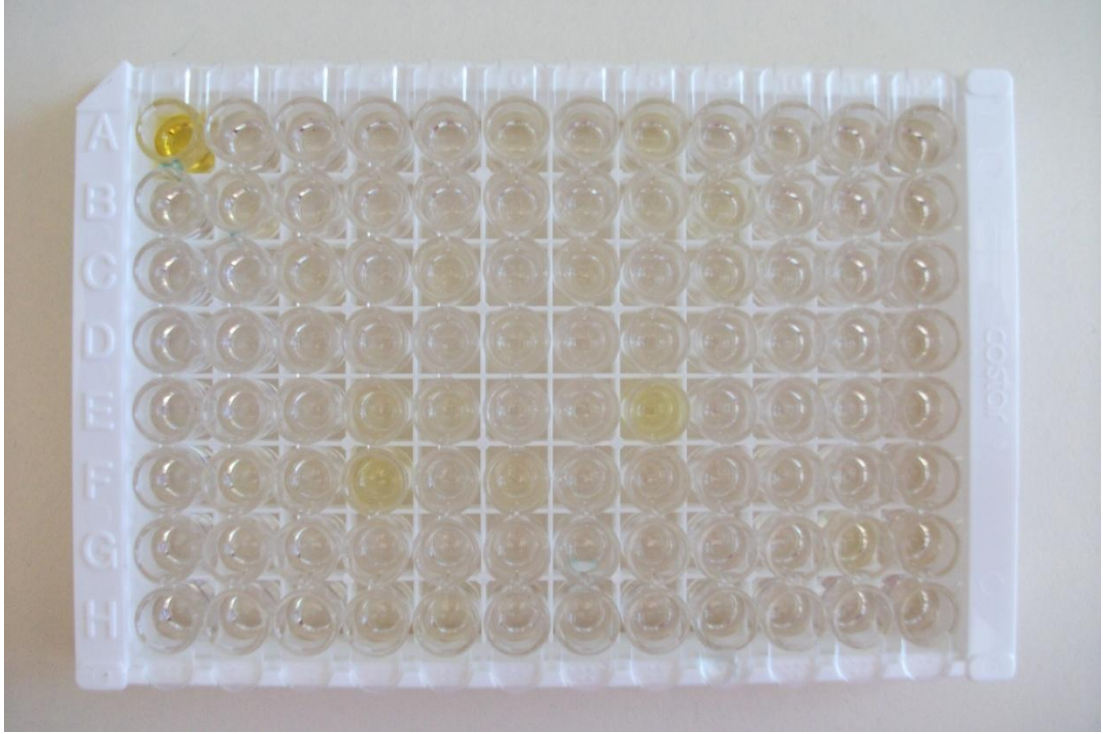
Elimizde 360 testlik kit bulunduğu için 360 örnekte ELISA testi çalışılmıştır. Tüm yöntemlerin birlikte uygulandığı 351 örnekten 30 (%8.5) tanesi pozitif 321'i (%91.5) negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. ELISA testi sonuçları

ELISA	SAYI	%
Pozitif	30	8.5
Negatif	321	91.5
TOPLAM	351	100.0

ELISA pleytinin A1 kuyucuğu pozitif kontrol, A2 kuyucuğu negatif kontrol, diğer kuyucuklar hasta kuyucuklarıdır. Makroskobik olarak sarı görülen kuyucuklar

kesin pozitif olarak değerlendirilirken kesin sonuçlar spektrofotometrede ölçüm sonucu belirlenir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Dışkı örneklerinin ELISA testi sonuçları (A1 pozitif kontrol, F4 ve E8 makroskobik olarak görülebilen pozitif örnek)

Moleküler çalışma için öncelikle örneklerden parazit kist ve yumurtası görülmeyenler ve eritrosit/lökosit saptanamayan örnekler rastgele çıkarılarak elimizde 750 testlik ekstraksiyon kiti olması sebebiyle 750 örneğe ekstraksiyon işlemi uygulandı. Seçilen örneklerde ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen dışkı örnekleri, Eskişehir Devlet Hastanesine ishal şikayetiyle başvuran hastalardan alınan örnekler ile mevsimlik işçi göçü olan Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulundan gelen örneklere öncelik tanındı. Ekstraksiyon yapılan örnekler arasında ELISA testi çalışılan dışkı örnekleri seçilerek toplam 420 örnek çalışıldı. Bunlar arasında internal kontrolleri çalışmayan 18 örnek çalışmaya dahil edilmedi. Bunlardan tüm yöntemlerin uygulandığı 351 örnekten *Entamoeba*

histolytica, *Dientamoeba fragilis*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium spp.*, için yalnız başına pozitif çıkan örnek sayıları sırasıyla 5 (%1.4), 59 (%16.8), 7 (%2.0) ve 2 (%0.6) olarak saptanmıştır. *Entamoeba histolytica* ve *Dientamoeba fragilis* 2 (%0.6) örnekte, *Dientamoeba fragilis* ve *Giardia intestinalis* 5 (%1.4) miks parazit enfeksiyonu olarak saptanmıştır (Tablo 4.9). *E. histolytica* pozitif olarak saptanan 7 örnekten 4 tanesi direkt mikroskopide de saptanmış olup 2 tanesi trikrom boyama ve kültür yöntemiyle saptanmış, yalnızca 1 tanesi ELISA yöntemiyle pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.10).

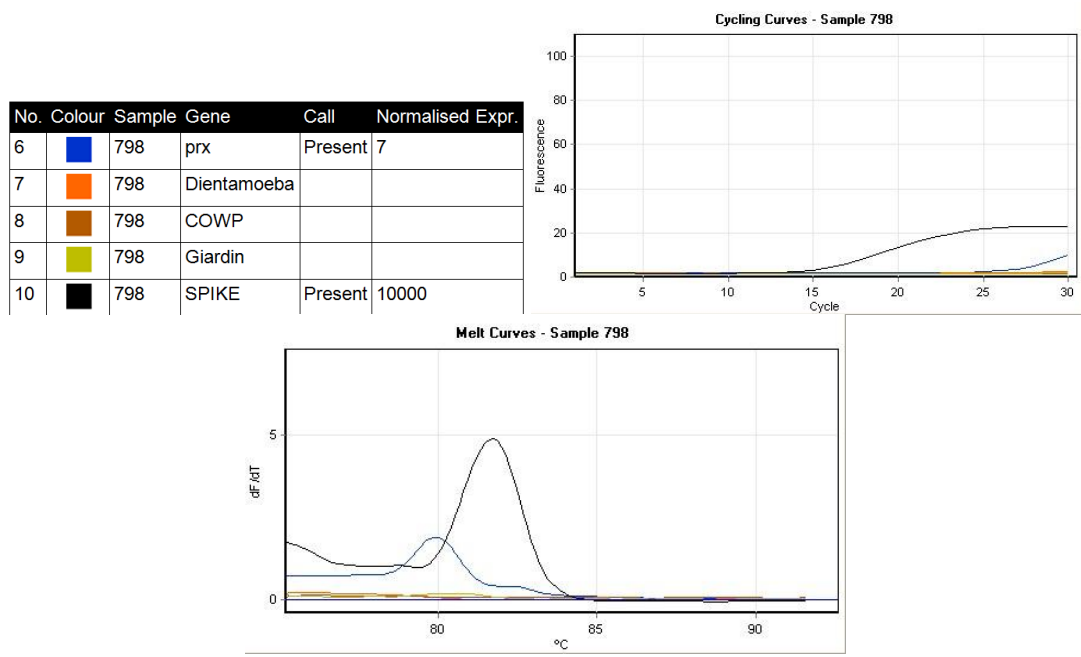
Tablo 4.9. Multipleks tandem real-time PCR sonuçları

MULTİPLEKS TANDEM REAL-TİME PCR SONUÇLARI	SAYI	%
<i>Entamoeba histolytica</i>	5	1.4
<i>Dientamoeba fragilis</i>	59	16.8
<i>Giardia intestinalis</i>	7	2.0
<i>Cryptosporidium spp.</i>	2	0.6
<i>E. histolytica</i> + <i>Dientamoeba fragilis</i>	2	0.6
<i>Dientamoeba fragilis</i> + <i>Giardia intestinalis</i>	5	1.4
Negatif	271	77.2
TOPLAM	351	100.0

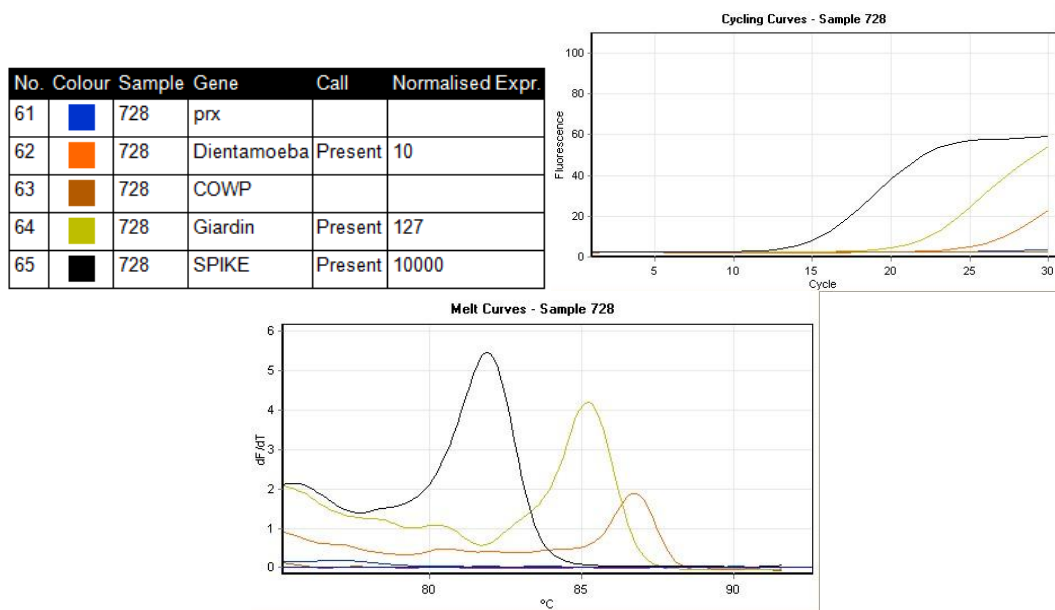
Tablo 4.10. PCR yöntemiyle pozitif çıkan olguların diğer yöntemlerle saptanan sonuçları

Olgu	Hastane/Okul	Direkt Mikroskopi	Trikrom Boyama	Kültür	ELISA	PCR-kopya sayısı
1	ESOGÜ/dahiliye	şüpheli amip kistleri, yoğun lökosit, az eritrosit	şüpheli amip kisti	şüpheli amip kisti	pozitif	<i>E. histolytica</i> -7
2	Halil Yasin İlköğretim Okulu	şüpheli amip kistleri, <i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	negatif	negatif	<i>E. histolytica</i> -3; <i>D. fragilis</i> -20260
3	Ş. P. Ü. Gökhan Yavuz İlköğretim Okulu	şüpheli amip kistleri, <i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	negatif	negatif	<i>E. histolytica</i> -5; <i>D. fragilis</i> -675
4	Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulu	parazit kist ve yumurtası görülmedi	negatif	negatif	negatif	<i>E. histolytica</i> -4
5	Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulu	parazit kist ve yumurtası görülmedi	negatif	negatif	negatif	<i>E. histolytica</i> -2
6	Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okulu	<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	negatif	negatif	<i>E. histolytica</i> -7
7	ESOGÜ/dahiliye	şüpheli amip kisti yoğun eritrosit yoğun lökosit	şüpheli amip kisti	şüpheli amip kisti	negatif	<i>E. histolytica</i> -9

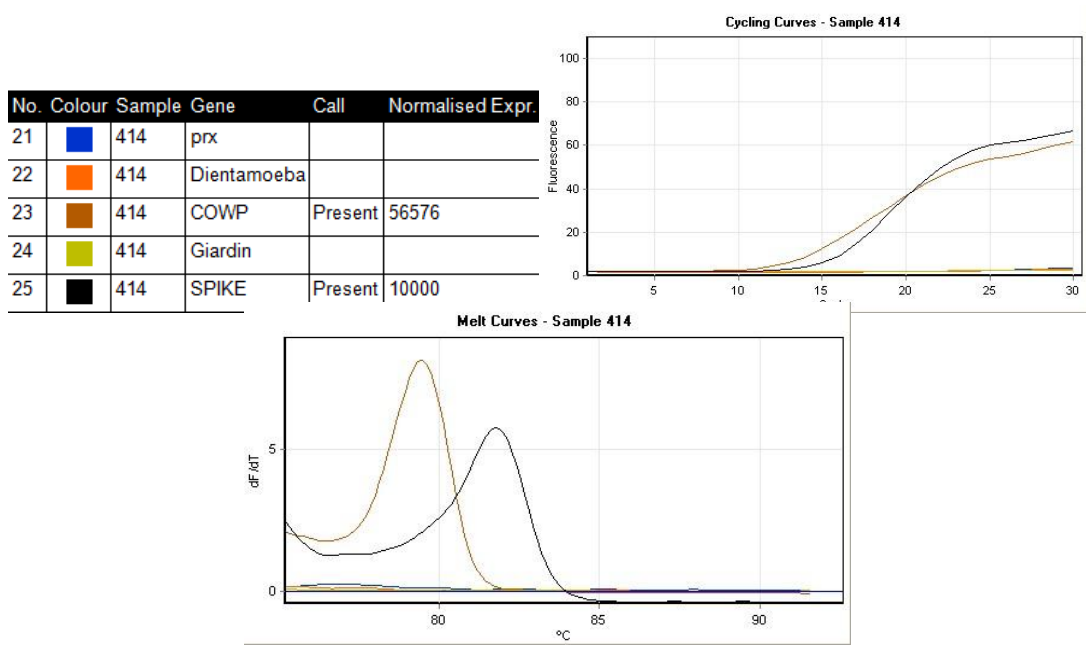
Multiplik tandem real-time PCR çalışmasında sonuçlar için bilgisayar ekranında entamoeba için mavi, dientamoeba için turuncu, cryptosporidium için kırmızı, giardia için sarı ve internal kontrol için siyah olmak üzere farklı renkte kod bulunmaktadır. Sonuçlarda ilk grafik parazitin var olup olmadığını göstermektedir. İkinci grafik kopya eğrilerini üçüncü grafik ise parazit DNA'sının ergime derecelerini göstermektedir. İnternal kontrolde bir çoğalma olmaması dışı içinde bulunan inhibitörlerden dolayı ekstraksiyonumuzda bir sorun olduğunu göstermektedir. Aşağıdaki resimler farklı parazitler için pozitif sonuçların ekrandaki grafikleri göstermektedir (Şekil 4.7- 4.10) .



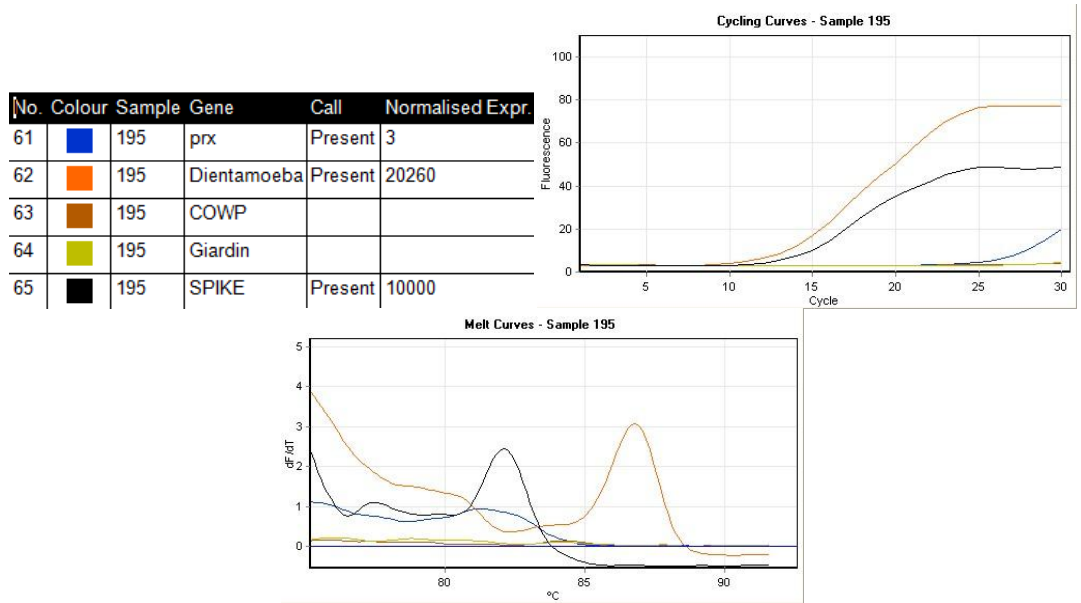
Şekil 4.7. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile *E. histolytica* (mavi) pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)



Şekil 4.8. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile *D. fragilis* (turuncu) ve *G. intestinalis* (sarı) pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)



Şekil 4.9. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile *Cryptosporidium spp.* (kırmızı) pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)



Şekil 4.10. Multipleks tandem real-time PCR yöntemi ile *E. histolytica* (mavi) ve *D. fragilis*'in (turuncu) beraber pozitif örneğin kopya sayısı, çoğalma eğrisi ve ergime derecesi (internal kontrol siyah)

Çalışmada 351 örneğe tüm testler uygulanmıştır (direkt mikroskopi, trikrom boyama, kültür, ELISA ve PCR). Direkt mikroskopi ile *E. histolytica/dispar* pozitif çıkan örnek sayısı 83 (%23.6), trikrom boyama yöntemiyle 60 (%17.0), kültür yöntemiyle 45 (%12.8) olup ELISA testiyle *E. histolytica* pozitif çıkan örnek sayısı 30 (%8.5), moleküler yöntemle ise 7 (%2.0) olarak saptanmıştır. Bunların yöntemlere göre dağılımı Tablo 4.11’de; sosyodemografik özelliklere göre dağılımı Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Tanıda kullandığımız tüm yöntemlerle *E. histolytica* pozitiflik oranları

	Direkt Mikroskopi		Trikrom Boyama		Kültür		ELISA		PCR	
	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Pozitif	83	23.6	60	17.0	45	12.8	30	8.5	7	2.0
Negatif	268	76.4	291	83.0	306	87.2	321	91.5	344	98.0
TOPLAM	351	100	351	100	351	100	351	100	351	100

Tablo 4.12. Direkt mikroskopi yöntemi ile *E. histolytica/dispar* tespit edilen örneklerin öğrencilerin sosyodemografik özelliklere göre dağılımı

Anket verileri	Direkt mikroskopi sonucu pozitif örnek sayısı					
	8. yaş	9. yaş	10. yaş	11. yaş	12. yaş	13. yaş
yaş	4 (%1.1)	4 (%1.1)	9 (%2.6)	2 (%0.6)	0 (%0)	2 (%0.6)
Anne öğrenim	Okuma-yazması olmayan		ilkokul		lise	üniversite
	2 (%0.6)		15 (%4.2)		4 (%1.1)	0 (%0)
Baba öğrenim	0 (%0)		17 (%4.8)		3 (%0.8)	1 (%0.2)
Anne meslek	evhanımı			işçi		
	18 (%5.1)			3 (%0.8)		
Baba meslek	işsiz		işçi		esnaf	diğer
	3 (%0.8)		14 (%4.0)		2 (%0.6)	2 (%0.6)
El yıkama alışkanlığı	yeterli			yetersiz		
	18(%5.1)			3 (%0.8)		
El yıkamada kullanılan temizleyici	Yalnız su		sabun		Sıvı sabun	
	1 (%0.2)		5 (%1.4)		15 (%4.2)	
banyo yapma sıklığı	hergün			Haftada bir		
	1 (%0.2)			20 (%5.7)		
Evde kullanılan tuvalet	alaturka			alafranga		herikisi
	12 (%3.4)			5 (%1.4)		4 (%1.1)
Tuvalet kağıdı kullanımı	evet			hayır		
	18 (%5.1)			3 (%0.8)		
Ortak çamaşır kullanımı	evet			hayır		
	6 (%1.7)			15 (%4.2)		
Hayvanlarla temas	evet			hayır		
	12 (%3.4)			9 (%2.5)		
Toplam sayı	21 (%6.0)					

Direkt mikroskopik inceleme ile 351 örnekten 83 (%23.6) tanesinde şüpheli amip kist ve trofozoitleri görülmüş olup, bunların 21 (%6.0) tanesi ilköğretim okuluna giden öğrencilerden toplanan dışkı örneklerine aittir. 21 örnekten 15 öğrencinin annesi, 17 öğrencinin ise babası ilkokul mezunu olarak saptanmıştır. Yine bu 21 örnekten 18 öğrencinin annesi ev hanımı 14 öğrencinin ise babası işçi olarak saptanmıştır. Bu örneklerden 12 dışkı sahibi öğrencinin ise hayvanlarla teması olduğu belirlenmiştir.

Direkt mikroskopide şüpheli amip kist ve trofozoitleri görülme oranı 83 (%23.6) olup; bunların 45 (%12.8) tanesi trikrom boyama ile, 32 (%9.1) tanesi kültür yöntemi ile, 13 (%3.7) tanesi ELISA yöntemiyle, 4 (%1.1) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.13). Tablo 4.13’de kullandığımız tüm tanı yöntemlerinin ikili olarak ortak pozitif çıkan örneklerin sayıları ve yüzdeleri verilmiştir. Yatay satır ve dikey sütunlarda keşişen örnek sayısı ortak pozitif çıkan örnek sayısıdır.

Tablo 4.13. Kullandığımız tüm tanı yöntemlerinin birbirleriyle ikili olarak karşılaştırılması

	Direkt Mikroskopi		Triokrom Boyama		Kültür		ELISA		PCR	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Direkt Mikroskopi	83	23.6	45	12.8	32	9.1	13	3.7	4	1.1
Triokrom Boyama	45	12.8	60	17.0	37	1.5	12	3.4	2	0.6
Kültür	32	9.1	37	10.5	45	12.8	10	2.8	2	0.6
ELISA	13	3.7	12	3.4	10	2.8	30	8.5	1	0.3
PCR	4	1.1	2	0.6	2	0.6	1	0.3	7	2.0

Triokrom boyama ile *E. histolytica/dispar* 60 (%17.1) örnekte tespit edilmiş olup; bunların 45 (%12.8) tanesi direkt mikroskopik inceleme ile, 37 (%10.5) tanesi kültür yöntemi ile, 12 (%3.4) tanesi ELISA yöntemiyle ve 2 (%0.6) tanesi moleküler yöntemlerle pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.13).

Kültür yöntemiyle 45 (%12.8) örnekte amip üremesi tespit edilmiş olup; bunlardan 32 (%9.1) tanesi direkt mikroskopik inceleme ile, 37 (%10.5) tanesi trikrom boyama yöntemi ile, 10 (%2.8) ELISA yöntemi ile ve 2 (%0.6) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.13).

ELISA yöntemiyle 30 (%8.5) örnekte *E. histolytica* pozitif olarak saptanmış olup; bunlardan 13 (%3.7) tanesi direkt mikroskopi ile, 12 (%3.4) tanesi trikrom boyama ile, 10 (%2.8) tanesi kültür yöntemi ile ve 1 (%0.3) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.13).

Moleküler yöntem ile 7 (%2.0) örnekte *E. histolytica* pozitif olarak saptanmış olup; bunlardan 4 (%1.1) tanesi direkt mikroskopi ile, 2 (%0.6) tanesi trikrom boyama yöntemi ile, 2 (%0.6) tanesi kültür yöntemi ile ve 1 (%0.3) tanesi ELISA yöntemi ile pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.13).

Tüm yöntemler ile *E. histolytica* pozitif olarak saptanan örnek sayısı ise 1(%0.3) olarak saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Amöbiyoz; dünyada en yaygın görülen paraziter hastalıklardan birisidir. Tropik ve subtropik bölgelerde oranı %50-80'lere ulaşabilen hastalığın dünya nüfusuna oranı %10 civarındadır. Olguların %90'ı belirtisiz olarak seyreder. Okul, kreş, hastane, cezaevleri gibi toplu halde yaşanan yerlerde daha sıklıkla ve salgınlar halinde görülmektedir. Dünyada her yıl 500 milyon kişinin *E. histolytica* ve ona mikroskopik olarak benzeyen *E. dispar* ile enfekte olduğu, bunların önemli bir miktarının kolit veya karaciğer apsesine yakalandığı ve 40-100 bin kadarının öldüğü tahmin edilmektedir [3].

Ülkemizde yakın tarihe ait çalışmalarda *E. histolytica/dispar* görülme sıklığı %0.3-17.4 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir [3]. İzmir'de %0.16-%5.16; Van'da %2-%0.27; Sivas'ta %4.8; Ankara'da %0.9-%17.4; Manisa'da %5.5; Isparta'da %1.3-%4.23; Diyarbakır'da %0.4-%53.60; Kütahya'da %0.74; Kocaeli'nde %0.9-3.4; Kayseri'de %1.45-%4.1; Malatya'da %0-4.4; Samsun'da %8; Afyon'da %2.4; Elazığ'da %0.2; Hatay'da %0-13.4; Bursa'da % 0.34; Eskişehir'de %3.2 ve Şanlıurfa'da % 8.19-%12.63. [59-66]. Birçok araştırmacı yaygınlığın bölgeler arasında farklı olmasının nedeni olarak başta sosyo-ekonomik düzey ve eğitim seviyesini göstermektedir. Ayrıca, dışkı incelemelerinde farklı yöntemlerin kullanılması da sonuçları etkilemektedir.

Günümüzde mikroskopinin yanı sıra, antijen saptama yöntemleri ve PCR gibi yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. PCR yöntemleri; özgüllük ve duyarlılığının oldukça yüksek olması sebebiyle son yıllarda antijen saptayan ELISA kitleri kadar yaygınlaşmaya başlamıştır [32].

PCR yönteminin *E. histolytica*'nın tanısında kullanımına 1990'ların başında başlanmıştır. 1991'de ise tek gen amplifikasyonu ile *E. histolytica* ve *E. dispar* ayrımı yapılmıştır. Daha sonraları *E. histolytica* tanısında real-time PCR ve multipleks real-time PCR'da kullanılmaya başlanmıştır. PCR klinik ve epidemiyolojik çalışmalar için Dünya Sağlık Örgütü tarafından temel tanı yöntemlerinden biri kabul edilmektedir [67].

Son zamanlarda mikroskopik incelemelerde parazitin morfolojik ve histolojik özellikleri bir arada değerlendirilmekle birlikte tek bir dışkı örneğinin incelenmesi esasıyla yapılan geleneksel mikroskopi yönteminin duyarlılığı ve seçiciliği büyük bir

problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Direkt mikroskopinin duyarlılığı en iyi koşullarda %10-60 arasında değişmektedir [68]. Tuncay ve arkadaşları saptadıkları 41 *E. histolytica*/*E. dispar* olgusunun ancak 25'ini mikroskopik incelemede görebilmişlerdir [7]. Dışkıda makrofajlar veya *E. dispar* ve *E. moshkovskii* gibi apatojen türlerin bulunması yanlış pozitifliklere neden olmaktadır. Bu nedenlerle *E. histolytica* tanısında mikroskopik tanı etkili olmayan, yetersiz bir tanı yöntemidir. *E. histolytica*'nın tanısında gelişmiş tanı yöntemleri kullanılması gerekmektedir [69].

Tanyüksel ve arkadaşları nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemi ile 380 dışkı örneğinin 91'inde (%24) *E.histolytica/dispar* saptarken, 51 tanesi *E. histolytica* test II;TechLab ELISA ile pozitif, bunlardanda mikroskopi ile pozitif saptanan örneklerin sayısını 14 ve mikroskopi ile negatif olduğu saptanan örneklerin sayısını 37 olarak bildirmişlerdir [70]. Bizim çalışmamızda ise nativ-lugol ve trikrom yöntemi ile 351 örnekten 45 (%12.8) 'inde *E.histolytica/dispar* saptanırken, bunların 30 (%8.5) tanesinde *E. histolytica* test II;TechLab ELISA ile pozitif saptanmış olup, 13 olgu mikroskopi ile pozitif, 17'si mikroskopi ile negatif olarak saptanmıştır.

Bangladeş de yapılan bir çalışmada çocuklarda *E. histolytica* yaygınlığı direkt mikroskopi, hücre kültürü ve 2. jenerasyon ELISA testi olan *E. histolytica* test II; TechLab yöntemiyle araştırdıklarında; mikroskopik bakı ile %3.5'i, kültür ile %4.2'si ve ELISA ile % 8'i pozitif bulmuşlardır. Altın standart olarak kabul edilen izoenzim çalışmaları ile ELISA'nın doğruluğunu denetlemişler ve testin duyarlılığını %87.5, özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır. Ayrıca, çalışmada kullanılan monoklonal ELISA yönteminin Shigella, Salmonella, Campylobacter türleri ve diğer enterik patojenler ile çapraz reaksiyon vermediğini de bildirmişlerdir [71].

Ekinci ve arkadaşları Muğla İli merkez ilköğretim okulu öğrencilerinde yaptıkları bağırsak paraziti araştırmasında, 3560 ilköğretim okulu öğrencisinden 663'ünün ailesi araştırmaya izin vermiştir. Örnekleri nativ-lugol inceleme ile değerlendirmiş, öğrencilerden 73'ünde (%11.01) bağırsak parazitine rastlamışlardır. 35 kız öğrenci ve 45 erkek öğrencide parazit saptamışlar kız erkek arasında parazit görme sıklığı açısından bir fark bulamamışlar. Parazit görülenlerin %54.8'inin aile gelir durumunu 750 TL ve altı olarak saptamışlar, %64.4'ünün anne-babasını ilköğretim mezunu olarak saptamışlar [72]. Bizim çalışmamızda direkt mikroskopik inceleme ile *E. histolytica/dispar* görülen örnekler kadınlarda 40 örnek erkeklerde 42 örnek

olup kadın ve erkek arasında amip kisti/trofozoti görülmesinin cinsiyet açısından anlamlı bir farkı bulunamamıştır. Çalışmamızda sosyoekonomik düzeyi düşük bölgelerde parazit saptanma oranı daha fazla bulunmuştur. Beylikova Yeniyurt İlköğretim Okuluna giden öğrencilerin büyük kısmını güneydoğu anadoludan gelen mevsimlik işçilerin çocukları oluşturmaktadır. Bu işçiler çadırkentlerde ikamet etmekte ve temiz içme suyu bulma sıkıntısı ve kanalizasyon bağlantısı ile ilgili sorunları mevcuttur. Bu gibi sebeplerden dolayı *Blastocystis hominis* ve *Giardia intestinalis* görülme sayıları en fazla bu ilköğretim okuluna bağlı öğrencilerde görülmüştür. Direkt mikroskopik inceleme ile 351 örnekten 83 (%23.6) tanesinde *E. histolytica/dispar* görülmüş olup bunların 21 (%6.0) tanesi ilköğretim okuluna giden öğrencilerden toplanan dışkı örneklerine aittir. Bu 21 örnek yaş gruplarına göre bakıldığında 8-11 yaş arasında yığılma göstermektedir. 21 örnekten 15 öğrencinin annesi, 17 öğrencinin ise babası ilkokul mezunu olup anne- baba eğitim seviyesinin düşüklüğünün şüpheli amip kisti/trofozoiti görülme oranını arttırdığını göstermiştir. Yine bu 21 örnekten 18 öğrencinin annesi ev hanımı 14 öğrencinin ise babası işçi olarak saptanmıştır. Bu durum bize ailenin ekonomik düzeyinin düşüklüğünün şüpheli amip kisti/trofozoiti görülme oranını arttırdığını göstermiştir. Bu örneklerden 12 dışkı sahibi öğrencinin ise hayvanlarla teması olduğu belirlenmiş olup hayvanlarla temasında şüpheli amip kisti/trofozoiti görülme oranını arttırdığını göstermiştir.

Azian ve arkadaşları Cameron Highlands'ta 212 dışkı örneği ile çalışmış, 31 örnekte mikroskopik olarak ve nested PCR yöntemiyle *E. histolytica/E. dispar* kompleksi pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Moleküler yöntemlerle bunların 28'i *E. histolytica*, 12'si *E. dispar* olarak bildirmişlerdir. Yaş gruplarına göre prevelansına baktıklarında ise en çok 5-10 yaş grubundaki hastalarda görüldüğünü rapor etmişlerdir. Kadın erkek arasında görülme sıklığı açısından bir fark olmadığını belirtmişlerdir [73]. Bizim çalışmamızda da 8-10 yaş grubundaki hastalarda prevelans daha yüksek bulunmuş olup, kadın erkek arasında anlamlı bir farklı bulunamamıştır.

Tan ve arkadaşları taze dışkı örneklerinden *E. histolytica* trofozoitlerinin tanısında üç farklı boyama metodu olan Eosin-Y, Wheatley trikrom ve Iodine boyama yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Wheatley trikrom boyama yöntemini trofozoitlerin boyanmasında standart yöntem olarak kabul etmişlerdir. Eosin-Y

boyama yöntemini en kolay ve en pratik yöntem olarak saptamışlar ve trofozoitleri görmek için en iyi zamanın dışkı verilmesini takiben ilk 6 saat içinde yapılan mikroskopik inceleme olduğunu bildirmişlerdir [74].

Vianna ve arkadaşları alkalın lizis ile DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu sonucu direkt mikroskopi ile tanımladıkları 39 pozitif *E. histolytica* ve *E. dispar* kisti ve/veya trofozoitinin 35 tanesini PCR ile pozitif olarak saptamışlardır. Diğer kalan 4 tanesinin ise dışkıda bulunan inhibitörler nedeniyle negatif olarak saptandığı sonucuna varmışlardır [75]. Bizim çalışmamızda direkt mikroskopide pozitif olarak saptanan 83 *E. histolytica* ve *E. dispar* kisti ve/veya trofozoitinin 4 tanesini PCR yöntemiyle *E. histolytica* olarak bulunmuştur. Çalışmamızda direkt mikroskopi ile şüpheli amip kisti/trofozoiti olarak değerlendirilen 83 örneğin 25 tanesinde ise multipleks tandem real-time PCR yöntemiyle *Dientamoeba fragilis* saptanmıştır. Bu durum bize direk mikroskopinin duyarlılığının azlığını ve amip kisti/trofozoitinin diğer parazitlerle ve makrofaj, epitelyum hücresi gibi hücrelerle karışabildiğini göstermiştir.

Stark ve arkadaşları Vincent's Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim dalında *Entamoeba* kompleksi (*E. histolytica*, *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba moshkovskii*) içeren dışkı örnekleri ile dışkıdan *E. histolytica* antijenini saptayan iki ELISA kiti (Entamoeba CELISA PATH ve TechLab *E. histolytica* II kit) ve PCR yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında PCR yöntemini referans olarak kabul etmişler ve CELISA PATH kitinin duyarlılığını %28 ve özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır. TechLab *E. histolytica* II kiti PCR ile karşılaştırıldığında diğer entamoeba türleriyle çapraz reaksiyon göstermesi sonucu pozitif reaksiyon verdiğini belirtmişlerdir. ELISA kitlerinin PCR yöntemine kıyasla 1000 ila 10000 kat daha az duyarlı olduğunu ve endemik olmayan bölgelerde kullanılmasının uygun olmadığını bildirmişlerdir [76].

Roy ve arkadaşları *E. histolytica* tanısında real-time PCR ve geleneksel PCR yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Toplamda 205 dışkı ve karaciğer apse materyali ile çalışmışlardır. TechLab *E. histolytica*-spesifik antijen saptama testi ile 101 (%49) tanesini pozitif, geriye kalan 104 (%51) tanesini de negatif olarak saptamışlardır. Dışkıdan DNA ekstraksiyonu sonucu 124 tanesini real-time PCR ile pozitif olarak saptarken, 90 tanesini geleneksel yöntem PCR ile pozitif olarak saptamışlardır.

Antijen saptama testi real-time PCR ile karşılaştırıldığında %79 duyarlılık ve %96 özgüllüğe sahip olarak bulmuşlardır. Geleneksel PCR yöntemi real-time PCR ile karşılaştırıldığında %72 duyarlılık ve %99 özgüllüğe sahip olduğunu, üç yöntem birbiri ile karşılaştırıldığında ise real-time PCR yöntemini en duyarlı olarak saptamışlardır [77].

Santos ve arkadaşları başka bir çalışmada *E. histolytica* tanısında multipleks PCR ile antijen saptama metodlarını karşılaştırmışlar. Direkt mikroskopik inceleme ile *E. histolytica*/*E. dispar* kompleks olarak tanımlanan 127 dışkı örneğinin; multipleks PCR ile 2 tanesinde *E. histolytica* ve 9 tanesinde *E. dispar* saptamışlardır. Direkt mikroskopik inceleme negatif saptanan örneklerden bir *E. histolytica* ve üç *E. dispar* Multipleks PCR ile pozitif olarak saptadıkları çalışmalarında tek bir dışkı örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde duyarlılığının oldukça az olduğunu vurgulamışlardır [78].

Qvarnstrom ve arkadaşları 51 klinik amöbiyozis vakalarındaki 42 dışkı örneği ve 9 karaciğer apse örneğinden izole ettikleri *E. histolytica* ve *E. dispar* saptanmasında geleneksel PCR yöntemini, SYBR Green, LightCycler ve TaqMan yöntemi olmak üzere üç farklı real-time PCR yöntemiyle karşılaştırmışlardır. TaqMan yönteminin kantitatif amöbiyozis tanısında çalıştıkları diğer PCR yöntemlerine göre daha iyi olduğunu belirtmişlerdir [79].

Stark ve arkadaşları dışkı örneklerinden *Cryptosporidium spp.*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia intestinalis*'in Multipleks Tandem Real-Time PCR ile saptanması ile ilgili yaptıkları çalışmalarında St. Vincent's Hastanesi mikrobiyoloji bölümüne ishal etyolojisi araştırılmak üzere gelen 472 dışkı örneği kullanmışlardır. Bütün dışkı örneklerini direkt mikroskopik olarak incelemişler; RT-PCR ve MT-PCR yöntemleri ile çalışmışlardır. Kullandıkları tanı metodlarından 2/3'ünde pozitif olan örneğin gerçek pozitif olarak kabul etmişlerdir. MT-PCR ile RT-PCR arasında %100 uyum olduğunu bildirmişlerdir. Her iki yöntemle 28 *G. intestinalis*, 26 *D. fragilis*, 11 *E. histolytica*, ve 9 *Cryptosporidium sp.* tespit etmişlerdir. MT-PCR ve RT-PCR yöntemlerinin %100 duyarlı ve özgül olduklarını bildiren araştırmacılar günümüzde moleküler yöntemlerin amöbiyozis tanısında altın standart olabileceğini belirtmişlerdir [80]. Bizde de moleküler yöntem olarak aynı kiti kullanarak 351 örnekten 7 *G. intestinalis*, 59 *D. fragilis*, 5 *E. histolytica*, 2

Cryptosporidium sp., 2 *E. histolytica*- *D. fragilis* ve 5 *G. intestinalis*- *D. fragilis* saptanmıştır.

Khairnar ve arkadaşları dışkı örneklerinden nested multipleks PCR yöntemi ile *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* ve *E. dispar* tespiti ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, toplam 1720 dışkı örneğinden direkt mikroskopi ve/veya kültür yöntemiyle *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* türleri açısından 202 örnek pozitif olarak tanımlamışlar. Bunların 164'ü kültür ve direkt mikroskopi ile, 22'si sadece direkt mikroskopi ile, 16'sı kültür yöntemiyle pozitif olarak sonuçlandırılmıştır. Nested multipleks PCR yöntemi ile *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* açısından pozitif olarak kabul edilen 202 örnek ve 35 negatif kontrol örneği olmak üzere 237 örnek çalışılmıştır. 202 örnekten 190 tanesi nested multipleks PCR yöntemi ile *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* açısından pozitif olarak bulunmuş (duyarlılık %94), negatif kontrol örneklerinin hepsi nested multipleks PCR yöntemi ile *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* açısından negatif olarak saptamışlardır (özgüllük %100) [69].

Fotadar ve arkadaşları Sidney'de dışkıda PCR yöntemi ile *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* varlığını araştırmışlar. 5921 örnekten 177 tanesi direkt mikroskobik olarak *Entamoeba kompleks* olarak tespit edilmiş, PCR yöntemi ile 5 örnekte *E. histolytica*, 63 örnekte *E. dispar*, 55 örnekte *E. moshkovskii* tespit etmişlerdir [81].

Solaymani-Mohammadi ve arkadaşları İran'da asemptomatik kist taşıyıcılarında yaptıkları çalışmalarında; *E. histolytica*/*E. dispar* tanısında dışkıdan antijen saptama kiti (ELISA) ve PCR yöntemini karşılaştırmışlar, TechLab *E. histolytica* II dışkı antijen kiti ile nested PCR yöntemi arasında %100 uyum saptamışlardır. Araştırmacılar *E. dispar* enfeksiyonun İran'da asemptomatik kist taşıyıcılarında daha yaygın olduğunu tespit etmişlerdir [4]. Çalışmamızda TechLab *E. histolytica* II dışkı antijen kiti ile 30 örnek pozitif olarak saptanmış olup, bu örneklerden yalnızca 1 tanesini multipleks tandem real-time PCR yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır.

Beck ve arkadaşları Tanzanya'daki HIV pozitif hastaların dışkılarında *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* varlığını dışkıdan antijen saptama testi ve PCR metodu kullandıkları çalışmalarında 136 HIV pozitif hastanın 108'inde (%81) direkt

mikroskopi ile amip tanımlanmış, bunlardan 7 (%7)'si PCR ile *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii* olarak saptanırken, 28'inde (%26) ELISA pozitifliği görülmüştür [82].

Hove ve arkadaşları seyahat öyküsü ve ishal kliniği olan hastalardan 2591 taze dışkı örneği ile çalışmışlardır. Direkt mikroskobik inceleme, gerekenlere ELISA testi uygulanmışlar ve haftalık olarak multipleks real-time PCR (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* ve *Strongyloides stercoralis*) testleri karşılaştırmışlardır. Direkt mikroskobik inceleme ve antijen saptama yöntemi ile *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Strongyloides stercoralis* pozitif sonuçlar sırasıyla %0.3, %4.7, %0.5 ve %0.1 olarak bulmuşlardır. Real-time PCR yöntemi kullanılarak baktıklarında ise görülme oranlarında artış gözlemişler ve sırasıyla %0.5, %6.0, %1.3 ve %0.8 olarak bulmuşlardır [83].

Haque ve arkadaşları 129 dışkıda antijen saptama testi ve PCR testi ile birlikte pozitif sonuçlanan hastaları altın standart yöntem olarak kabul etmiş ve *E. histolytica*, *G. intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp. parazitleri için tek tek çalışılan real-time PCR yöntemi ile hepsinin çalışıldığı multipleks real-time PCR yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Altın standart tanı yöntemi olarak kabul ettikleri yöntem ile *E. histolytica*, *G. intestinalis*, ve *Cryptosporidium* spp. parazitleri için pozitiflik oranları sırasıyla 42, 54 ve 31 olarak bulunmuş. *E. histolytica* saptanmasında multipleks real-time PCR yönteminin duyarlılığı %86 ve tek tek çalışılan real-time PCR yönteminin duyarlılığı %95, özgüllükleri sırasıyla %98, ve %99 olarak bulunmuş. Ayrıca PCR yöntemi ile spesifik DNA segmentinin saptanmasının direkt mikroskobiden daha duyarlı bir yöntem olduğunu bildirmişler [84].

Haque ve arkadaşları başka bir çalışmalarında vaka grubu olarak diyare ile başvuran 3646 hasta ile kontrol grubu olarak 2575 asemptomatik hastayı dışkıdan antijen testleri ve PCR yöntemlerini kullanarak *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* parazitleri açısından karşılaştırma yapmışlardır. *Cryptosporidium* türleri ve *Entamoeba histolytica* sağlıklı kontrol grubuna göre tüm yaşlarda akut ishal ile gelenlerde daha sık bulmuşlardır. Diyareli hasta grubunda ise kantitatif real-time PCR ile dışkıdaki parazit yükü ölçülmüş ve kontrol grubundan fazla olmadığını saptamışlardır. Hasta

grubundaki amöbiyozis düşünülen dışkıda kan görmeyi asemptomatik kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında anlamlı bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir (%8 ve %1.6; $P < .001$) [85].

Intarapuk ve arkadaşları Myanmar'da dışkı örneklerinden PCR ile *Entamoeba histolytica* ile *Entamoeba dispar* varlığını araştırdıkları çalışmalarında, 455 dışkı örneğinin 30 'unda direkt mikroskopi ile entamoeba şüpheli örnek tanımlamışlardır. Pozitif örneklerde PCR yöntemi ile small subunit rRNA (SSU-rRNA) bölgesi, kitinaz ve serinden zengin *Entamoeba* protein gen bölgelerini amplifiye etmişlerdir. SSU-rRNA gen bölgesi amplifikasyonu kullanılarak 30 örnekten 3 örnekte *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar* tespit etmişlerdir. PCR primeri olarak *Entamoeba histolytica* kitinaz bölgesi kullanılarak 12 örnekte pozitif bulmuşlardır. *Entamoeba histolytica* ile *Entamoeba dispar* için iki ayrı serinden zengin primerler amplifiye edilmiş ve 20 *Entamoeba histolytica*, 16 *Entamoeba dispar* örneğini pozitif olarak bulmuşlardır. Kültür gereksinimi olmadan dışkıdan direkt DNA ekstraksiyonu ile entamoeba türlerinin bulunabileceğini bildirmişlerdir [86].

Rostamighalehjahgi ve arkadaşları 2332 dışkı örneği ile PCR yöntemi ile primer olarak Cp5 geni kullanarak *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar* tespiti konusunda çalışmışlardır. Direkt mikroskopi ile pozitif bulunan 148 örnek Robinson besiyerine ekmişler ve gen bankasından Cp5 gen bölgeleri oligonükleotidler kullanılarak amplifiye edilmiş ve primer olarak kullanmışlardır. İlk basamakta kollojen bağlayıcı protein (cbp-30) geni *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* varlığı açısından amplifiye etmişler ve 43 örnek (22 örnekte dizanterili olmayan hastadan alınmış) pozitif olarak saptamışlardır. Kontrol için standart suşlar da kullanmışlardır. 43 örneğin tamamı Cp5 gen bölgeleri kullanılarak çalıştıklarında *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* varlığı açısından pozitif olarak saptamışlardır [87]. Bizim çalışmamızda ise *Entamoeba histolytica* peroksiredoksin gen bölgesi kullanılmış olup multipleks tandem real time PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Farklı gen bölgeleri kullanarak ve sadece *E. histolytica* çalışılarak yeni çalışmalar yapmamız gerektiğini söylemekteyiz.

Haque ve arkadaşları amibik kolitli hastalar ve amibik karaciğer apsesi olanların kan, idrar ve tükürük örnekleri real-time PCR yöntemi ile *Entamoeba histolytica* varlığı ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. 98 amibik karaciğer apseli hasta,

28 amibik kolitli hasta ve 43 kontrol grubu ile çalışmışlardır. Amibik karaciğer apseli hastarın kan, idrar ve tükürük örneklerinde real-time PCR yöntemi ile *Entamoeba histolytica* DNA varlığı sırasıyla %49, %77 ve %69 olarak bulmuşlardır. Amibik kolitli hastarın kan, idrar ve tükürük örneklerinde real-time PCR yöntemi ile *Entamoeba histolytica* varlığı saptama duyarlılığı sırasıyla %36, %61 ve %64 olarak saptamışlardır. Kontrol grubunda ise kan, idrar ve tükürük örneklerinde real-time PCR yöntemi ile *Entamoeba histolytica* varlığı saptayamamışlardır. Noninvaziv olarak alınabilen tükürük ve idrar örneklerinin amibik karaciğer apseli hastaların tanısında kullanılabileceğini bildirmişlerdir [88].

Solaymani-Mohammadi ve arkadaşları dışkı mikroskopisi ve serolojisi negatif olarak gelen ishal, şiddetli karın ağrısı ve ateşi olan 20 yaşında bir bayan hastanın dışkılarından SSU-rRNA gen bölgesi amplifikasyonu kullanılarak PCR yöntemi ile *Entamoeba histolytica* varlığı saptadıklarını bildirmişlerdir [89].

Zeyrek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada direkt bakı ile (nativ-lugol) şüpheli buldukları 87 dışkının 19 (%21.7)'unda ELISA metodu ile *E. histolytica* / *E. dispar* spesifik antijen pozitif, 23 (%26.4)'ünde trikrom boyama yöntemiyle *E. histolytica* / *E. dispar* kompleksini pozitif saptamışlardır. *E. histolytica* / *E. dispar* sıklığını trikrom boyama ile %1.4 (23/1600), ELISA yöntemiyle %1.2 (19/1600) olarak bulmuşlardır [90]. Bizim çalışmamızda direkt bakı ile şüpheli 83 dışkının 13 (%15.6)'sında ELISA metodu ile *E. histolytica* / *E. dispar* spesifik antijen pozitif, 45 (%54.2)'sinde trikrom boyama yöntemiyle *E. histolytica* / *E. dispar* kompleksi pozitif olarak saptanmıştır. *E. histolytica* / *E. dispar* sıklığını trikrom boyama ile %17.0 (60/351), ELISA yöntemiyle %8.5 (30/351) olarak bulunmuştur.

Mısır'da değişik gastrointestinal yakınması olan 210 hastada *E. histolytica* yaygınlığını belirlemeye yönelik bir çalışmada ELISA testi kullanmışlardır. Bu hastaların 115 (%54.7)'inde akut amöbiyozun en önemli klinik belirtisi olan dizanteri şikayeti mevcutmuş. Dizanteri şikayeti olan hastaların 18'inde *E. histolytica* yüzey adezin molekülleri ELISA ile tespit etmişlerdir [91].

Güney Afrika'da gerçekleştirilen çalışmada hastanelerden ve ilkokullardan toplanan örneklerde *E. histolytica*/*E. dispar* yaygınlığı ELISA ve nested-PCR ile araştırmışlardır. *E. histolytica* yaygınlığı hastane örneklerinde 37/197 (%18.8), ilköğretim okulu örneklerinde 1/47 (%2.1) şeklinde tespit etmişler; *E. dispar* hastane

örneklerinde 50/197 (%25.3) ilköğretim öğrencilerine ait örneklerde 4/47 (%8.5) olarak tespit etmişlerdir. Aynı bölgede HIV pozitif 31 hastanın 5'inde (%16.1) *E. histolytica* infeksiyonu, HIV negatif 213 bireyin 33'ünde (% 15.5) *E. histolytica* infeksiyonu gözlemlendiği bildirilmişlerdir [92]. Bizim çalışmamızda direkt mikroskopik inceleme ile hastanelerde 62 (%17.6) , ilkokullarda 21 (%6.0) *E. histolytica/E. dispar* pozitif örnek bulunmuştur.

Filistin'de yapılan çalışmada direkt mikroskopi, demir-hematoksilen boyaması, ELISA ve PCR ile 92 çocukta *E. histolytica/dispar* sıklığını araştıran bir çalışmada araştırmacılar PCR ile 64 (%69.6) örnek pozitif saptamışlardır. Bu çocukların 21'inde (%22.8) *E. dispar* saptarken, 7 (%7.6) çocukta mikst infeksiyon görmüşlerdir [49].

Tayvan'da akıl hastanesinde *E. histolytica* infeksiyonunun eradikasyonun amaçlanan yaklaşık iki yıllık çalışmada araştırmacılar 443 yetişkin birey ELISA ile takip etmişlerdir. Programın başlangıcında %10.8 olan infeksiyon oranı %6.3, %3.6, %2.7, %3.4, %2.2 ve sonunda da tamamen ortadan kalktığını bildirmişlerdir [93].

Suudi Arabistan'da gastrointestinal yakınmalarla hastaneye başvuran 186 hastaya araştırmacılar direkt mikroskopi ve ELISA yöntemiyle çalışmışlar, *E. histolytica/dispar* mikroskopik yöntemle 26 hastada (%31.3) görmüşler ve çalışmada en sık rastlanılan paraziter infeksiyon olduğu bildirmişlerdir. Pozitif sonuçlanan örnekleri *E. histolytica* test II; TechLab ile çalıştıklarında yalnızca 5 tanesinde (%19) *E. histolytica* antijeni pozitif olarak saptamışlardır. Bu bölgede *E. histolytica* yaygınlığı %2.7 olduğunu ve bu çalışma sonuçlarının bu veriyi desteklediğini belirtmişlerdir [94]. Bizim çalışmamızda direkt mikroskopik inceleme ile 351 örneğin 83'ü (%23.6) şüpheli amip kist ve trofozoitleri saptanmış, 30 (%8.5) örnekte ise ELISA *E. histolytica* test II (TechLab) ile *E. histolytica/dispar* pozitif olarak saptanmıştır. ELISA testi pozitif çıkan örneklerin 13 (%3.7) tanesi direkt mikroskopi ile pozitif olarak saptanmıştır.

Rosmaria ve arkadaşları Meksika'da PCR yöntemiyle semptomatik çocuk hastalardan aldıkları mikroskopisi pozitif 120 dışkı örneğinin 13 tanesinde *E. histolytica*, sadece 1 tanesinde *E. dispar*'a rastlamışlardır [95].

Calderaro ve arkadaşları 108 hastaya ait 166 örneği *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın görülme sıklığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, sonuçları,

sırasıyla %5.6 ila %8.3 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar; mikroskopi, kültür ve serolojiyle tanısı konmuş hastalarda PCR testiyle doğrulama yapmak gerektiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada kullanılan real-time PCR yöntemi ise tanı amaçlı kullanılabilecek daha pratik bir yöntem olarak tanımlamışlardır [96].

Nohynkova ve arkadaşları Çek Cumhuriyeti'nde yılda toplam 40-50 *E. histolytica/E. dispar* infeksiyonu bildirildiğini belirtmişler ve *E. histolytica/E. dispar* oranını belirlemek amacıyla multipleks nested PCR kullandıkları 68 örneklik çalışmalarında, olguların 65'i (%95.6) *E. dispar* olarak saptanırken yalnızca 3 olgu (%4.4) *E. histolytica* olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar, Çek Cumhuriyeti'nde *E. histolytica* oranının çok düşük olduğu ve *E. histolytica/E. dispar* infeksiyonlu hastaların tanısında PCR kullanılarak tür ayrımı yapılması gerekliliğini belirtmişlerdir [97].

Gonin ve arkadaşları 95 dışkı örneğini mikroskopta incelemişler, *E. histolytica* II test kiti ile antijen aramışlar ve PCR yöntemi uygulamışlardır. 51 hastadan ELISA, mikroskopi ve PCR yöntemi ile, 9 hastadan PCR ve mikroskopi yöntemi ile, 4 hastadan sadece PCR yöntemi ile pozitif sonuç bulduklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarının sonucu olarak *E. histolytica-E. dispar* ayrımını yapmada ELISA testinin duyarlılığının düşük olduğu şeklinde yorumda bulunmuşlar ve PCR yönteminin kullanılmasını önermişlerdir [98]. Bizim çalışmamızda 351 örnekten; ELISA, direkt mikroskopi ve PCR testi ile 1 (%0.2) hastada, PCR ve direkt mikroskopi ile 4 (%1.1) hastada, sadece PCR yöntemi ile ise 7 (%2.0) hastada pozitif olarak saptanmıştır.

Nunez ve arkadaşları direkt mikroskopi, ELISA testi ve multipleks PCR yöntemi ile 3 ayrı gruptaki hastaların dışkı örneklerini incelemişlerdir. Birinci grupta direkt mikroskopisi ve ELISA'sı pozitif olan 52 hasta, ikinci grupta direkt mikroskopisi ve ELISA'sı negatif 30 kişilik kontrol grubu ve üçüncü grupta 40 hastalık, başka parazitler taşıyan kros-reaksiyon grubu yer aldığı çalışmalarında; negatif kontrol grubu ve kros-reaksiyon grubunda hiçbir hastada PCR pozitifliği tanımlanmamış ve multipleks PCR çalışmasının özgüllüğünün maksimum olduğu şeklinde yorumlamışlardır. *E. histolytica/E. dispar* infeksiyonu doğrulanmış gruptaki 52 hastanın 49'u *E. dispar* pozitif bulmuşlar, 3 tanesinin PCR sonucu negatif olarak

saptamışlar ve testin duyarlılığını %94 olarak bildirirlerken çalışmalarında hiçbir organda *E.histolytica*'ya rastlamamışlardır [99].

Helmy ve arkadaşları Entamoeba cinsi açısından direkt mikroskopisi pozitif (40 kist ve 11 trofozoit) 51 dışkı örneğine *E. dispar*/*E. histolytica* ayırımını yapmak için nested PCR uyguladıkları çalışmalarında, 9 hastada *E. dispar* saptarlarken, 31 hasta *E. histolytica* ile enfekte olarak tanımlamışlardır. 11 hastada ise hem *E. dispar*, hem de *E. histolytica* ile eş zamanlı enfekte olarak tanımlamışlar ve araştırmacılar, bu sonuçların, moleküler yöntemlerin, patojen ve patojen olmayan tiplerin tanımlaması açısından önemli bir potansiyel tanı yöntemi olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir [100].

Dağcı ve arkadaşları 7 dışkı örneğini *E. dispar*/*E. histolytica* primerleri kullanarak PCR yöntemiyle incelediklerinde, örneklerin tamamının *E. dispar* olduğunu göstermişlerdir [101].

Kurt ve arkadaşları 2047 hastadan aldıkları dışkı örneklerinin 59 tanesinin (%2.9) mikroskopi veya kültür incelemesini *E. histolytica*/*E. dispar* açısından pozitif olarak bulmuşlardır. Örneklerin 14 tanesi (%23.7) PCR ile, 5 tanesi (%8.5) antijen spesifik ELISA testi ile *E. histolytica* pozitif olarak bulmuşlardır. *E. dispar* PCR ile 31 hastada (%52.5), ELISA ile 52 hastada (%88.1) pozitif olarak bulmuşlardır [102]. Bizim çalışmamızda 351 örnekten 96 (%27.3) örnekte direkt mikroskopi veya TYI-S 33 besiyerine ekim sonucu *E. histolytica*/*E. dispar* açısından pozitif olarak bulunmuş olup 7 (%2.0) tanesi PCR ile, 30 (%8.5) tanesi ELISA ile *E. histolytica*/*E. dispar* açısından pozitif saptanmıştır.

Mengeloğlu ve arkadaşları direkt mikroskopi ile incelenen 1720 dışkı örneğinin 44'ünde (%0.37) amip kistleri görmüşler, kist görülen örneklerde ELISA ile *Entamoeba histolytica* spesifik antijen araştırmışlardır. Örneklerin 26'sında (%59.1) spesifik antijen varlığı saptamışlardır. Amöbiyoz şüphesi olan hastalarda tanıyı doğrulamak için, direkt mikroskopi duyarlılığının düşük olmasından dolayı, ELISA metodunun uygulanmasının hastaya verilecek tedavinin belirlenmesi veya hastanın gereksiz tedavi almasının önlenmesi açısından uygun olduğunu belirtmişlerdir [103]. Bizim çalışmamızda ise toplamda 351 örnekten 30 (%8.5) tanesi ELISA ile pozitiflik saptanmıştır.

Çalışmamızda; toplam 977 gaita örneği içinde tüm testlerin uygulandığı (direkt mikroskopi, trikrom boyama, kültür, ELISA ve PCR) örnek sayısı 351 olmuştur. Çalışılan testlere göre oranlar sırasıyla; Direkt mikroskopi ile *E. histolytica/dispar* pozitif çıkan örnek sayısı 83 (%23.6), trikrom boyama yöntemiyle 60 (%17.0), kültür yöntemiyle 45 (%12.8) olup, ELISA testiyle *E. histolytica* pozitif çıkan örnek sayısı 30 (%8.5), moleküler yöntemle ise 7 (%2.0) olarak saptanmıştır.

Direkt mikroskobide *E. histolytica/dispar* görülme oranı 83 (%23.6) olup, bunların 45 (%12.8) tanesi trikrom boyama ile, 32 (%9.1) tanesi kültür yöntemi ile, 13 (%3.7) tanesi ELISA yöntemiyle, 4 (%1.1) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır.

Trikrom boyama ile *E. histolytica/dispar* 60 (%17.1) örnekte tespit edilmiş olup, bunların 45 (%12.8) tanesi direkt mikroskobik inceleme ile, 37 (%10.5) tanesi kültür yöntemi ile, 12 (%3.4) tanesi ELISA yöntemiyle, 2 (%0.6) tanesi moleküler yöntemlerle pozitif olarak saptanmıştır.

Kültür yöntemiyle 45 (%12.8) örnekte *E. histolytica/dispar* tespit edilmiş olup, bunların 32 (%9.1) tanesi direkt mikroskobik inceleme ile, 37 (%10.5) tanesi trikrom boyama yöntemi ile, 10 (%2.8) ELISA yöntemi ile ve 2 (%0.6) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır.

ELISA yöntemiyle 30 (%8.5) örnekte *E. histolytica* pozitif olarak saptanmış olup, bunlardan 13 (%3.7) tanesi direkt mikroskopi ile, 12 (%3.4) tanesi trikrom boyama ile, 10 (%2.8) tanesi kültür yöntemi ile ve 1 (%0.3) tanesi moleküler yöntem ile pozitif olarak saptanmıştır.

Moleküler yöntem ile 7 (%2.0) örnekte *E. histolytica* pozitif olarak saptanmış olup, bunlardan 4 (%1.1) tanesi direkt mikroskopi ile, 2 (%0.6) tanesi trikrom boyama yöntemi ile, 2 (%0.6) tanesi kültür yöntemi ile ve 1 (%0.3) tanesi ELISA yöntemi ile pozitif olarak saptanmıştır. Tüm yöntemlerin uygulandığı 351 örnekten *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium spp.*, için yalnız başına pozitif çıkan örnek sayıları sırasıyla 5 (%1.4), 59 (%16.8), 7 (%2.0) ve 2 (%0.6) olarak saptanmıştır. *Entamoeba histolytica* ve *Dientamoeba fragilis* 2 (%0.6) örnekte, *Dientamoeba fragilis* ve *Giardia intestinalis* 5 (%1.4) miks parazit enfeksiyonu olarak saptanmıştır. Tüm yöntemler ile *E. histolytica* pozitif olarak saptanan örnek sayısı ise 1 olarak saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dışkının direkt incelenmesinin deneyimli laboratuvar personeli tarafından yapılması son derece önemlidir. *E. histolytica* kist/trofozoitleri diğer birçok amip türleriyle, iri lökositler, polenler, tam olarak sindirilmemiş sebze artıkları ve konakçının somatik hücreleriyle kolaylıkla karışabilmesi nedeniyle birçok laboratuvarda olguların ancak 1/3'ünün doğru tanımlanabilmesi nedeniyle tanıda birden fazla yöntemin birlikte kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Direkt mikroskopinin eş zamanlı olarak parazite ait çekirdek yapılarının daha iyi gözlemlenmesi nedeniyle trikrom boyama yöntemiyle birlikte yapılması gerekir. Fakat bu iki yöntemde *E. histolytica/dispar* ayırımında yeterli değildir. Eş zamanlı olarak mümkünse kültür yöntemi ve özgül antijen saptayan ELISA yöntemi de çalışılmalıdır.

Yaptığımız araştırma bir tarama çalışması niteliğinde olup diğer yayın ve araştırmalarda %100 duyarlı ve özgül olarak bildirilen moleküler yöntem ile 7 örnekte *E. histolytica* pozitifliği saptadık. Bu örneklerden 4 tanesini direkt mikroskopi yöntemiyle, 2 tanesini trikrom boyama yöntemiyle, 2 tanesini kültür yöntemiyle ve 1 tanesini de ELISA yöntemiyle pozitif olarak saptadık. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında doğru tanı için moleküler yöntem ile çalışılmıyorsa direkt mikroskopi, trikrom boyama, kültür yöntemi ve ELISA yöntemi kombine edilmeli bu dört yöntemle ortak pozitif çıkan sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmelidir. Çalışmamızda moleküler yöntem ile ELISA yöntemi arasında uyum saptayamadığımız için moleküler yöntemin alternatifi olarak ELISA yönteminin kullanılmasını öneriyoruz.

Mikrobiyolojik tanının enfeksiyon hastalığı tanısında sadece bir parametre olduğu gerçeği düşünülerek, hastanın diğer yardımcı verileri ile birlikte tanı konulmalıdır.

Dışkıda bulunan safra tuzları, hemoglobün yıkım ürünleri gibi inhibitör maddeler ve dışkıdan DNA ekstraksiyonunun zor olması moleküler yöntemler için bir dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon yapacağımız dışkı miktarının içinde parazit varlığının olmaması ya da parazit yükünün çok az olması yalancı negatif sonuçlar oluşturmaktadır. Dışkı örneklerinin toplandıktan sonra -70°C'de saklanması, taze örneklerle dışkının hemen çalışılmaması gibi nedenlerde yalancı

negatif sonuçların çıkmasında önemli bir etmendir. Bu sebeplerden dolayı dışkıdan parazit DNA'sının ekstraksiyonu ile ilgili problemlerin giderilmesi, parazitin farklı gen bölgeleriyle de çalışmalar yapılarak standardizasyonun sağlanacağı araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. John DT, Petri WJ. Markell and Voge's Medical Parasitology. 2006. Saunders Elsevier, Missouri.p:22-45
2. World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization. 1997. 75 (3): 291-292.
3. Kılıç AY. Tıbbi Parazitoloji.Doğan N, Altuntaş H, Altunsoy F. 2010. TC Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını No: 1121.p86-91.
4. Solaymani-Mohammadi S, Rezaian, M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, Petri WAJr. Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. Journal of Clinical Microbiology, 2006. 44(6): p. 2258-61.
5. Huston CD, Haque R, Petri WA Jr. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Expert Rev Mol Med 1999. 22: p. 1-11.
6. Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Journal of Clinical Microbiology. 1998. 36: p. 449-452.
7. Tuncay S, Inceboz T, Över L, Yalçın G, Usluca S, Şahin S, Delibaş SB, Aksoy Ü, Akısü Ç. Dışkıda *Entamoeba histolytica*'nın Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Birlikte Değerlendirilmesi Türkiye Parazitoloji Dergisi. 31 (3): 188-193, 2007
8. Cox FE. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(4): p. 595-612.
9. Unat EK. Amöbiyazlar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. Yaşaryol Ş, Budak S, Özcel MA, Kuman HA, Sermet İ.1985.p:1-30.
10. Yakut M, Özden A. Amip, Amebiasis ve İlişkili Hastalıklar. Güncel Gastroenteroloji, 2008. 12(2): p. 81-97.
11. Saygı G. Paraziter Hastalıklar ve Parazitler. 2009.p:38-61.
12. Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 2. 2009.p:2092-2097.
13. Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007.p:279-305.
14. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology, 3rd edition. 1997, ASM Press, Washington, D.C.p:6-32.

15. Altıntaş N, Kuman HA. Protozoon Hastalıkları. 1996, Ege Üniversitesi Basımevi Bornova, İzmir.
16. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, Emir G, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999, Günes Kitapevi, Ankara.
17. Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji. 2002, MN Medical & Nobel Tıp kitapçıları, İstanbul.
18. <http://www.dpd.cdc/dpdx>.
19. Tanyüksel M. Bağırsak protozoonlarında virülans faktörleri. 2006, XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi-Kongre kitabı, Belek/Antalya.
20. Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley S L Jr. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. Infect Immun, 2004. 72(2): p. 678-83.
21. Tanyüksel MA, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev, 2003. 16(4): p. 713-29.
22. Ackers JP. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J. Biosc., 2002. 27(3): p. 573-578.
23. Leippe M, Bruhn H, Hecht O, Grotzinger J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. Trends Parasitol, 2005. 21(1): p. 5-7.
24. Moody S, Becker S, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Identification of significant variation in the composition of lipophosphoglycan-like molecules of *E. histolytica* and *E. dispar*. J Eukaryot Microbiol, 1998. 45(2): p. 9-12.
25. Unat EK, Yücel A, Altas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 1991, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul 4. baskı.
26. Salles JM, Moraes LA, Salles MC. Hepatic amebiasis. Braz J Infect Dis, 2003. 7(2): p. 96-110.
27. Özcel MA, Altıntaş N. Besiyerleri ve hayvan inoklasyonları, Parazit Hastalıklarında Tanı. ed. Daldal N, Aksoy, Akısü Ç. 1997, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 155-157s.
28. Korkmaz M, Ok ÜZ. Parazitolojide Laboratuvar. 2011, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 23.

29. Clark CG. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. J Eukaryot Microbiol, 1995. 42(5): p. 590-3.
30. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(3): p. 329-41.
31. Ortner S, Plaimauer B, Binder M, Scheiner O, Wiedermann, G, Duchene M. Molecular analysis of two hexokinase isoenzymes from *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 1995. 73(1-2): p. 189-98.
32. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. Clin Microbiol Rev, 2007. 20(3): p. 511-32.
33. Abd-Alla MD, el-Hawey AM, Ravdin JI. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-adherence protein antibodies in sera of patients with invasive amebiasis in Cairo, Egypt. Am J Trop Med Hyg, 1992. 47(6): p. 800-4.
34. del Carmen Sanchez-Guillen M, Velazquez-Rojas M, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Perez-Fuentes R, Martinez-Munguia J, Talamas-Rohan P. Seroprevalence of anti-*Entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assays in blood donors from Puebla, Mexico. Arch Med Res, 2000. 31(4 Suppl): p. 53-4.
35. Abd-Alla MD, Ravdin JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. Trop Med Int Health, 2002. 7(4): p. 365-70.
36. Haque R, Ali I M, Sack R B, Farr B M, Ramakrishnan G, Petri W A Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. J Infect Dis, 2001. 183(12): p. 1787-93.
37. Kraoul L, Adjmi H, Lavarde V, Pays J.F, Tourte-Schaefer C, Hennequin C. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. J Clin Microbiol, 1997. 35(6): p. 1530-2.

38. Burchard GD, Hufert FT, Mirelman D. Characterization of 20 *Entamoeba histolytica* strains isolated from patients with HIV infection. *Infection*, 1991. 19(3): p. 164-9.
39. Liu CJ, Hung CC, Chen MY, Lai YP, Chen P J, Huang SH, Chen DS. Amebic liver abscess and human immunodeficiency virus infection: a report of three cases. *J Clin Gastroenterol*, 2001. 33(1): p. 64-8.
40. Hung CC, Chen PJ, Hsieh SM, Wong JM, Fang CT, Chang SC, Chen MY. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. *AIDS*, 1999. 13(17): p. 2421-8.
41. Restrepo MI, Restrepo Z, Elsa Villareal CL, Aguirre A, Restrepo M. Diagnostic tests for amoebic liver abscess: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Rev Soc Bras Med Trop*, 1996. 29(1): p. 27-32.
42. Pillai DR, Keystone J S, Sheppard DC, MacLean J D, MacPherson DW, Kain KC. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis*, 1999. 29(5): p. 1315-8.
43. Petri WAJr, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis*, 1999. 29(5): p. 1117-25.
44. Hughes MA, Petri WAJr. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am*, 2000. 14(3): p. 565-82, viii.
45. Sengupta K, Das P, Johnson TM, Chaudhuri PP, Das D, Nair GB. Production and characterization of monoclonal antibodies against a highly immunogenic fraction of *Entamoeba histolytica* (NIH:200) and their application in the detection of current amoebic infection. *J Eukaryot Microbiol*, 1993. 40(6): p. 722-6.
46. Verweij JJ, Blotkamp J, Brienen EA, Aguirre A, Polderman AM. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000. 19(5): p. 358-61.

47. Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg*, 1994. 51(1): p. 115-8.
48. Healy GR. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiology in the United States. *Rev Infect Dis*, 1986. 8(2): p. 239-46.
49. Al-Hindi A, Shubair ME, Marshall I, Ashford RW, Sharif FA, Abed AA, Kamel EG. *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* among children in Gaza, Gaza Strip. *J Egypt Soc Parasitol*, 2005. 35(1): p. 59-68.
50. Irusen EM, Jackson TF, Simjee AE. Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic *Entamoeba histolytica* in amebic liver abscess: prevalence, response to therapy, and pathogenic potential. *Clin Infect Dis*, 1992. 14(4): p. 889-93.
51. Snow MJ, Stanley SLJr. Recent progress in vaccines for amebiasis. *Arch Med Res*, 2006. 37(2): p. 280-7.
52. Stanley SLJr. Progress towards development of a vaccine for amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 1997. 10(4): p. 637-49.
53. Tanyüksel M, Amebiasis Tanı ve Aşı Çalışmaları için Umutlar, 2005, Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.
54. Gonzalez-Vazquez MC, Carabarin-Lima A, Baylon-Pacheco L, Talamas-Rohana P, Rosales-Encina JL. Obtaining of three recombinant antigens of *Entamoeba histolytica* and evaluation of their immunogenic ability without adjuvant in a hamster model of immunoprotection. *Acta Trop*, 2012. 122(2): p. 169-76.
55. Trapp RG, Dawson-Saunders B. *Basic & Clinical Biostatistics*. 1998, Appleton & Lange, Connecticut, USA, 2nd ed. 232-249.
56. Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA, E. and http://www.biosystemdevelopment.com/site_graphics/elisa.jpg.
57. QIAGEN, QIAmp DNA Stool Handbook, 2007.
58. AusDiagnostics, AusDiagnostics Multipleksed Diagnostics Gastrointestinal Parasites 5 Handbook, 2011.
59. Akdemir C, Helvacı R. Evaluation of parasitology laboratory results of a group of people older than 15 years of age in Kutahya. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 2007. 31(2): p. 129-32.

60. Tamer GS, Caliskan S, Willke A. Distribution of intestinal parasites among patients who presented at the parasitology laboratory of the Kocaeli University School of Medicine Hospital. *Türkiye Parazitol Derg*, 2008. 32(2): p. 126-9.
61. Kaya S, Demirci M, Demirel R, Arıdoğan BC, Öztürk M, Şirin C. Isparta şehir merkezinde bağırsak parazitleri prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2004. 28(2): p. 103-105.
62. Demirli H, Arabacı F. Van ilinde 6-12 yaş grubu çocuklarda bağırsak parazitlerinin araştırılması *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 2004. 28(2): p. 106-109.
63. Uzun A, Tekay F, Kardeşahin Ö, Yeşilmen S, Topçu M, Gül K. Diyarbakır il merkezinde farklı bölgelerdeki beş ilköğretim okulunda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2004. 28(3): p. 133-135.
64. Çulha G. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2006. 30(4): p. 302-304.
65. Doğan N, Demirüstü C, Aybey A. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin beş yıllık bağırsak paraziti prevalansının türlere ve cinsiyetlere göre dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2008. 32(2): p. 120-125.
66. Usluca S, Yalcin G, Over L, Tuncay S, Sahin S, Inceboz T, Aksoy U. The distribution of intestinal parasites detected in the Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital between 2003 and 2004. *Turkiye Parazitol Derg*, 2006. 30(4): p. 308-12.
67. Singh A, Houpt E, Petri WA. Rapid Diagnosis of Intestinal Parasitic Protozoa, with a Focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009. 2009: p. 547090.
68. Göğebakan M, Aksaray N, Yılmaz HL, Alhan E, Tanrıverdi S, Özcan K. Bağırsak Amebiyazisli çocuklarda serolojik yöntemlerin tanısal değeri. *Türkiye Klinikleri Pediatri*, 2001. 10(4): p. 190-196.
69. Khairnar K, Parija SC. A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiol*, 2007. 7: p. 47.

70. Tanyuksel M, Yilmaz H, Ulukanligil M, Araz E, Cicek M, Koru O, Tas Z, Petri WAJr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol*, 2005. 110(3): p. 322-6.
71. Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lyerly DM, Petri WAJr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis*, 1997. 175(3): p. 734-6.
72. Ekinci B, Karacaoğlan E, Bulucu E, Sül N. Investigation of intestinal parasites among elementary school students in the Mugla province *Turkiye Parazitol Derg*, 2011. 35(2): p. 92-5.
73. Noor Azian MY, Lokman Hakim S, Maslawaty MN. Use of molecular tools to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection among the aborigines in Cameron Highlands. *Tropical Biomedicine*, 2006. 23(1): p. 31-36.
74. Tan ZN, Wong WK, Nik Zairi Z, Abdullah B, Rahmah N, Zeehaida M, Rumaizi S, Lalitha P, Tan GC, Olivos-Garcia A, Lim BH. Identification of *Entamoeba histolytica* trophozoites in fresh stool sample: comparison of three staining techniques and study on the viability period of the trophozoites. *Trop Biomed*, 2010. 27(1): p. 79-88.
75. Vianna EN, Costa,JO, Santos CK, Cury MC, Silva EF, Costa AO, Gomes MA. An alternative method for DNA extraction and PCR identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in fecal samples. *Parasitology*, 2009. 136(7): p. 765-9.
76. Stark D, van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol*, 2008. 46(5): p. 1678-81.
77. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WAJr, Haque R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(5): p. 2168-72.
78. Santos HL, Peralta RH, de Macedo HW, Barreto MG, Peralta JM. Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *Braz J Infect Dis*, 2007. 11(3): p. 365-70.

79. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(11): p. 5491-7.
80. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. 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(1): p. 257-62.
81. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol*, 2007. 45(3): p. 1035-7.
82. Beck DL, Dogan N, Maro V, Sam NE, Shao J, Houpt ER. High prevalence of *Entamoeba moshkovskii* in a Tanzanian HIV population. *Acta Trop*, 2008. 107(1): p. 48-9.
83. ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009. 28(9): p. 1045-53.
84. Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SM, Mondal D, Houpt E, Petri WAJr. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium spp.* *Am J Trop Med Hyg*, 2007. 76(4): p. 713-7.
85. Haque R, Mondal D, Karim A, Molla IH, Rahim A, Faruque AS, Ahmad N, Kirkpatrick BD, Houpt E, Snider C, Petri WAJr. Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clin Infect Dis*, 2009. 48(9): p. 1191-7.
86. Intarapuk A, Kalambaheti T, Thammapalerd N, Mahannop P, Kaewsatien P, Bhumiratana A, Nityasuddhi D. Identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR assay of fecal specimens obtained from Thai/Myanmar border region. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2009. 40(3): p. 425-34.
87. Rostamighalehjaghi S, Jamali R, Rezaie S, Babaei Z, Hooshyar H, Rezaeian M. Evaluation of a Single PCR Assays on Cp5 Gene for Differentiation of

- Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. Iranian J Publ Health 2010. 39(4): p. 64-69.
88. Haque R, Kabir M, Noor Z, Rahman SM, Mondal D, Alam F, Rahman I, Al Mahmood A, Ahmed N, Petri WAJr. Diagnosis of amebic liver abscess and amebic colitis by detection of *Entamoeba histolytica* DNA in blood, urine, and saliva by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol, 2010. 48(8): p. 2798-801.
89. Solaymani-Mohammadi S, Coyle CM, Factor SM, Petri WAJr. Amebic colitis in an antigenically and serologically negative patient: usefulness of a small-subunit ribosomal RNA gene-based polymerase chain reaction in diagnosis. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. 62(3): p. 333-5.
90. Zeyrek FY, Özbilge H, Yüksel MF, Zeyrek CD, Sırmatel F. Şanlıurfa'da Parazit Faunası ve ELISA Yöntemi ile Dışkıda *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* Sıklığı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2006. 30(2): p. 95-98.
91. El-Kadi MA, Dorrah AO, Shoukry NM. Patients with gastrointestinal complains due to enteric parasites, with reference to *Entamoeba histolytica/dispar* as detected by ELISA *E. histolytica* adhesion in stool. J Egypt Soc Parasitol, 2006. 36(1): p. 53-64.
92. Samie A, Obi LC, Bessong PO, Stroup S, Houpt E, Guerrant RL. Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. Am J Trop Med Hyg, 2006. 75(3): p. 565-71.
93. Su SB, Guo HR, Chuang YC, Chen KT, Lin CY. Eradication of amebiasis in a large institution for adults with mental retardation in Taiwan. Infect Control Hosp Epidemiol, 2007. 28(6): p. 679-83.
94. Barnawi AB, Tonkal AM, Fouad MA, Al-Braiken FA. Detection of *Entamoeba histolytica/dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay in the population of Jeddah City, Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol, 2007. 37(1): p. 143-50.
95. Redondo RB, Mendez LGM, Baer G, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differentiation by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. Parasitol Latinoam 2006. 61: p. 37-42.
96. Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays

- for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006. 100(5): p. 450-7.
97. Nohynkova E, Pysova I, Tumova P, Tolarova V. Pathogenic *Entamoeba histolytica*--a rare incidence in persons microscopically positive for cysts in faeces. *Cas Lek Cesk*, 2007. 146(2): p. 132-6.
98. Gonin P, Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(1): p. 237-41.
99. Nunez YO, Fernandez MA, Torres-Nunez D, Silva JA, Montano I, Maestre JL, 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(5-6): p. 293-7.
100. Helmy MM, Rashed LA, Abdel-Fattah HS. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR. *J Egypt Soc Parasitol*, 2007. 37(1): p. 257-74.
101. Dagci H, Erdogan DD, Toz SO, Kurt O, Ustun S, Akarca U. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR: a preliminary study in Izmir, Turkey. *New Microbiol*, 2007. 30(1): p. 45-8.
102. Kurt O, Demirel M, Ostan I, Sevil NR, Mandiracioglu A, Tanyuksel M, Ak M, Dagci H. Investigation of the prevalence of amoebiasis in Izmir province and determination of *Entamoeba spp.* using PCR and enzyme immunoassay. *New Microbiol*, 2008. 31(3): p. 393-400.
103. Mengeloglu FZ, Aktas E, Kulah C, Comert FB. Detection of *Entamoeba histolytica* in stool specimens with the ELISA method. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2009. 33(1): p. 1-3.

EK-1.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DIŞKIDA PARAZİT ARAŞTIRILMASI İLE İLGİLİ VELİ İZİN
FORMU**

Bağırsak parazitleri özellikle çocukluk yaş grubunda görülen ülkemizin önemli sağlık sorunlarından biridir. Çocukların beden ve zeka gelişimini önemli ölçüde engelleyen bağırsak parazitlerinin en önemli belirtileri arasında, karın ağrısı, karında gaz ve kramplar, geçici ishallere, burun kaşınması, anüste ve vücutta kaşınma, deri döküntüsü, sabahları mide bulantıları, yastığa salya akması, dış gıcırdatma, kilo alamama, ağız kokusu, iştahsızlık, yorgunluk, halsizlik olarak sayılabilir. Eğer bu belirtilerden herhangi biri sizin çocuğunuzda görülüyorsa dışkıda parazit varlığının araştırılması gerekmektedir.

Amacımız; ilimizde ilköğretim çocuklarındaki parazit varlığını ve oranını tanımlamaktır. Bu amaçla izin verdiğiniz takdirde, çocuğunuza verilen ağzı kapaklı plastik kaplar içine mümkünse sabah okula gelirken, değilse akşamdan çocuğunuzun bir miktar dışkısı (ceviz büyüklüğü kadar) konulup ağzı sıkıca kapatılıp, üzerine isim yazılacaktır. Çocuğunuzun sonuçları size bildirebilmemiz ve varsa paraziti tedavisini sağlayabilmemiz içinde dışkı kapları ile birlikte yollayacağımız anket formunu doldurmanız gerekmektedir. Buradaki bilgiler ilimizdeki çocuklara ait yaşam koşullarını ve parazit varlığını belirlemek amacıyla Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalınca yapılmaktadır. Ailenizle ve çocuğunuzla ilgili hiçbir bilgi sizin dışınızda kesinlikle kimseye paylaşılmayacaktır.

İzin verdiğiniz takdirde, lütfen aşağıdaki bölümü doldurup imzalayınız.

Doç. Dr. Nihal DOĞAN

ESOGÜ Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İzin veriyorum

Öğrenci Adı-Soyadı:

Okulu:

Veli Adı- Soyadı:

İmza:

EK-2.

PARAZİT ANKET FORMU

CİNSİYET: Kız Erkek

YAŞ:.....

OKUL:.....

SINIF:.....BOY/KİLO:.....

AİLE SOSYO-DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ:

ANNE ÖĞRENİM DURUMU: Okur Yazar Değil İlkokul Lise Üniversite

BABA ÖĞRENİM DURUMU: Okur Yazar Değil İlkokul Lise Üniversite

ANNE MESLEĞİ: Ev Hanımı İşçi Memur Esnaf Diğer

BABA MESLEĞİ: İşsiz İşçi Memur Esnaf Diğer

AİLE GELİR DURUMU: İyi Orta Kötü

KİŞİSEL HİJYEN ALIŞKANLIKLARI

EL YIKAMA ALIŞKANLIĞI: Yeterli Yetersiz

EL YIKAMADA KULLANILAN TEMİZLEYİCİ: Su Sabun Sıvı Sabun Diğer

BANYO YAPMA SIKLIĞI: Her gün Haftada Bir Daha az

EVDE KULLANILAN TUVALET: Alaturka Alafranga

TUVALETİN YERİ: Evin İçinde Evin Dışında

TUVALET KAĞIDI KULLANIMI: Evet Hayır

TUVALET SONRASI EL YIKAMA ALIŞKANLIĞI: Evet Hayır

YEMEK ÖNCESİ EL YIKAMA ALIŞKANLIĞI: Evet Hayır

ÇİĞ ET YEME ALIŞKANLIĞI: Evet Hayır

TOPRAK YEME ALIŞKANLIĞI: Evet Hayır

ORTAK ÇAMAŞIR KULLANMA DURUMU: Evet Hayır

HAYVANLARLA TEMAS DURUMU: Evet Hayır

