

Ocak 2010-Haziran 2011 Tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Polikliniğinde Saptanan *E. histolytica/dispar* Olguları

Ayşegül ÜNVER *

Tuba OYUR **

Özgür KURT ***

Seray ÖZENSOY TÖZ *

Nevin TURGAY * 

* Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-35100 Bornova, İzmir - TÜRKİYE

** Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-45030 Manisa - TÜRKİYE

*** Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TR-45140 Manisa - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6214

Özet

Sağlık Bakanlığı, amipli dizanteri etkeni *Entamoeba histolytica*'nın (*E. histolytica*) kesin tanısının konabilmesi için, standart tanı protokollerinde Trichrome boyalı preparatlarda eritrosit fagosite etmiş trofozoit görülmesi ve/veya *E. histolytica* spesifik adhesin antijeninin ELISA testi ile pozitif tespit edilmesi şartlarını aramaktadır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniği'ne Ocak 2010 - Haziran 2011 tarihleri arasında başvuran ve direkt dışkı bakısında amebiasis şüphesi oluşan 51 hastanın, dışkı örnekleri Trichrome boyası ile boyanarak incelenmiş ve 49 örnekte *E. histolytica/dispar* tespit edilmiştir. Toplam 51 örnekten 33 dışkı örneğine *E. histolytica* adhesin antijeni aramaya yönelik ticari ELISA kiti (*Entamoeba* CELISA-Path; CeLLabs Pty. Ltd., Brookvale, Australia) uygulanmış ve 23 (%71.8) dışkı örneğinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Sonuçlarımıza göre geçmiş yıllarla karşılaştırıldığında son yıllarda olgu sayısında artış olduğu dikkati çekmektedir. *E. histolytica*'nın kesin tanısının konmasında Sağlık Bakanlığı'nın da önerdiği gibi farklı yöntemlerin bir arada uygulanmasının özellikle perifer laboratuvarların etkin sonuç vermesinde önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Entamoeba histolytica*, Tanı, Trichrome, ELISA, Türkiye

E. histolytica/dispar Cases Diagnosed in Ege University Medical Faculty Parasitology Outpatient Clinic Between January 2010 to June 2011

Summary

For definitive diagnosis of amoebiasis, The Ministry of Health requires the detection of *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) trophozoites that ingested red blood cells in Trichrome-stained smears or *E. histolytica*-specific adhesin antigen with ELISA. Stool samples of 51 patients admitted to the Outpatients Clinic of Ege University School of Medicine Department of Parasitology between January 2010 and June 2011 were suspected to have *E. histolytica/dispar* cysts or trophozoites in wet mount examinations and stained with Trichrome. Examination of these smears revealed that 49 samples were positive for *E. histolytica/dispar*. Thirty-three samples were tested for the positivity of *E. histolytica*-specific adhesin antigen with a commercial ELISA kit (*Entamoeba* CELISA-Path; CeLLabs Pty. Ltd., Brookvale, Australia) and 23 were found to be positive. Our results indicated an elevation of figures of amoebiasis cases in recent years. It is concluded that application of different methods for the diagnosis of *E. histolytica* infections as suggested by The Ministry of Health is essential for correct reports of peripheral laboratories.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, Diagnosis, Trichrome, ELISA, Turkey

GİRİŞ

Amebiasis gelişmekte olan ülkeler için önemli bir sağlık sorunu olup, *Entamoeba* cinsi içerisinde yer alan türlerden 6

tanesi (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli* ve



İletişim (Correspondence)



+90 232 3904716



nevin.turgay@ege.edu.tr

Entamoeba hartmanni) bağırsak boşluğunda yerleşebilmektedirler. Bunların içerisinde *E. histolytica*, amebiasis etkeni olup dünyada ölümlere de neden olabilen önemli bir parazit olarak kabul edilmektedir. Patojen *E. histolytica* doku yayılımı göstererek başta karaciğer olmak üzere çeşitli organlarda abselere neden olurken, apatojen olarak kabul edilen *E. dispar* bağırsakta sınırlı kalıp doku invazyonu göstermemektedir^{1,4}. Her yıl amebiasis ile dünyada ortalama 50 milyon kişinin enfekte olduğu ve yaklaşık 100.000 kişinin bu hastalık nedeniyle öldüğü bildirilmektedir^{1,5}. Sosyo-ekonomik seviyesi düşük toplumlarda, okul, cezaevi, hastane ve çocuk bakım yuvalarında kişisel hijyene bağlı olarak enfeksiyon oranının arttığı görülmektedir^{1,6}. Ülkemizde yapılan çeşitli koproparazitolojik araştırmalarla bağırsak parazitlerinin dağılımında *E. histolytica* insidansının %0.3-17.4 arasında değiştiği saptanmıştır⁶.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) son zamanlarda gelişmekte olan ülkelere, uygun teknikler yoluyla *E. histolytica*'nın spesifik tanısını koymayı önermektedir⁷. Sağlık Bakanlığı, amipli dizanteri etkeni *E. histolytica*'nın kesin tanısı için, standart tanı protokollerinde Trichrome boyalı preparatlarda eritrosit fagosite etmiş trofozoit görülmesi ve/veya *E. histolytica*-spesifik adhesin antijeninin ELISA testi ile pozitif bulunması şartlarını aramaktadır. Günümüzde ayırıcı tanı için dışkıda *E. histolytica*'ya spesifik antijen arama yöntemleri yüksek özgüllük ve duyarlılık gösterdiğinden kabul görmektedir⁸.

Amebiasisin hızlı ve kesin tanısı, enfeksiyonunun tedavisinin erken dönemde yapılması açısından önemlidir. Çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Poliklinik laboratuvarına Ocak 2010 - Haziran 2011 tarihleri arasında gelen hastalardan direkt bakısında amebiasis şüphesi oluşan 51 hastanın dışkı örnekleri Trichrome boyası ile boyanarak incelenmiş olup, bu örneklerin 33 adedinde aynı zamanda *E. histolytica* adhesin antijeni de araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Poli-

linik laboratuvarına Ocak 2010 -Haziran 2011 tarihleri arasında başvuran ve direkt dışkı bakısında amebiasis şüphesi oluşan 51 hastanın örnekleri incelenmiştir.

Parazitoloji Poliklinik laboratuvarına gelen dışkı örnekleri ilk olarak makroskobik olarak incelenmiş, mikroskobik incelemede ise yaklaşık 2 mg dışkı örneği salin solusyonu ve Lugol boyası ile boyanmıştır. Rutin uygulanan etil asetat çöktürme yöntemi ile elde edilen çökeltilerden hazırlanan preparatlar tekrar salin solusyonu ve Lugol boyası ile boyanarak x20 ve x40'lik objektiflerle incelenmiştir. Ayrıca çoklaştırma işlemi sonucunda elde edilen çökeltilerden hazırlanan yaymalar Modifiye Kinyoun asit - fast boyasıyla boyanarak x100'lik objektifle incelenmiştir. Mikroskobik incelenmesinde kistik yapılardan şüphelenilen tüm örneklerle ve tüm ishali dışkı örneklerine Trichrome boyama yöntemi uygulanmıştır. Boyalı preparatlar en az 2 deneyimli uzman tarafından preparat başına ortalama 15 dk süreyle incelenmiştir. Toplam 51 örnekten 33 dışkı örneğine *E. histolytica/dispar* tür ayrımı için dışkıda antijen saptamaya yönelik ELISA yöntemi (*Entamoeba* CELISA-Path; CeLLabs Pty. Ltd., Brookvale, Australia) uygulanmıştır.

BULGULAR

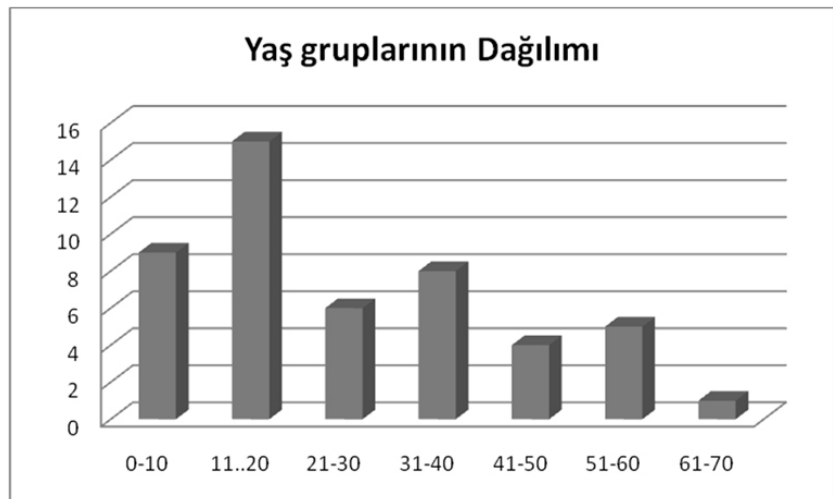
Çalışmaya alınan 51 hastanın 25'i kadın 26'si erkek olup yaşlarının ortalaması 29.48 (2-79) arasındadır (*Şekil 1*).

Toplam 51 dışkı örneğinin tamamı Trichrome boyama yöntemi ile incelenmiş olup 49 (%96.07) dışkı örneği pozitif, 2 (%3.9) dışkı örneği ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Dışkı örneklerinin 33 tanesinde ELISA yöntemi ile *E. histolytica*'ya özgü adhesin antijeni aranmış, 33 örnekten 23'ü (%69.7) pozitif, 10'u (%30.3) ise negatif bulunmuştur (*Tablo 1*).

Trichrome boya yöntemi ile *E. histolytica/dispar* kist ve/veya trofozoitleri saptanan 49 dışkı örneğinden ELISA yöntemi uygulanan 31'inden 23'ünde pozitif 8'inde negatif sonuç alınmıştır (*Tablo 1*). Trichrome ile negatif tespit edilen

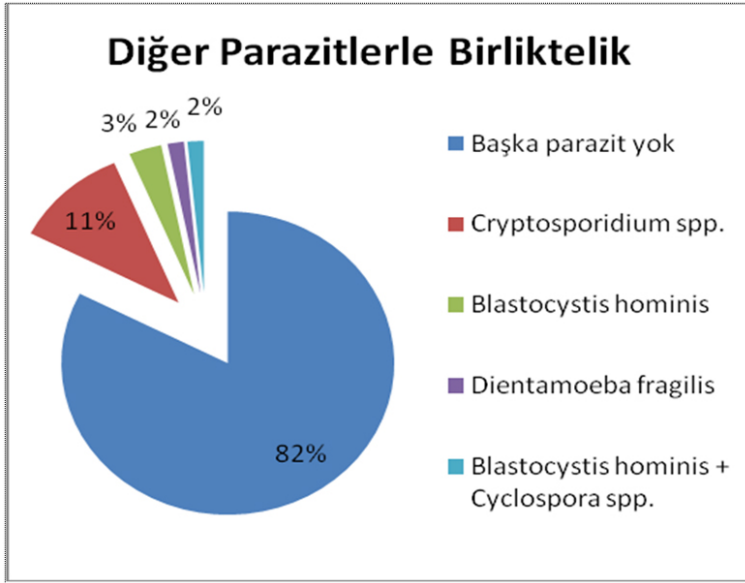
Şekil 1. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Fig 1. Age groups of the patients



Tablo 1. Trichrome boyama yöntemi ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması
Table 1. The comparison of Trichrome staining and ELISA results

| Boyama Yöntemi | | ELISA | | | |
|----------------|---------|---------|---------|-------------|--------|
| | | Pozitif | Negatif | Uygulanmadı | Toplam |
| Trichrome | Pozitif | 23 | 8 | 18 | 49 |
| | Negatif | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | Toplam | 23 | 10 | 18 | 51 |



Şekil 2. Hastalarda *E. histolytica/dispar*'ın dışında saptanan diğer bağırsak parazitleri

Fig 2. Parasites other than *E. histolytica/dispar* detected in the patients

2 örnek ELISA ile de negatif bulunmuştur. ELISA ile pozitif bulunup Trichrome boyasının negatif olduğu herhangi bir örnek bulunmamaktadır. Çalışmamızda direkt bakıda uygulanan Trichrome boya yöntemi altın standart olarak kabul edilmiştir.

Çalışma grubumuzdaki hastalar diğer parazitler açısından değerlendirildiğinde, 7 hastada *Cryptosporidium spp.*, 2 hastada *Blastocystis spp.*, 1 hastada *Dientamoeba fragilis* ve 1 hastada ise *Blastocystis spp.* ve *Cyclospora spp.* koenfeksiyonu saptanmıştır. Sonuç olarak, toplam 11 (%21.56) hastanın bir veya birden fazla bağırsak paraziti ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

TARTIŞMA ve SONUÇ

E. histolytica enfeksiyonu dünyada tropikal ve subtropikal birçok bölgede ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir sağlık problemidir. Her yıl tüm dünyada 100 binin üzerinde kişinin amebiasis nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmektedir ¹.

Amebiasisin etkensel tanısında nativ-lugol yöntemi ucuzluğu ve kolay uygulanabilmesi nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir. Bununla birlikte nativ-lugol yönteminin duyarlılığının %10-60 arasında değişmesi, amiplerin dışkı örneğindeki makrofajlarla karışabilmesi veya dışkı örneğinde morfolojik olarak ayırım yapılamayan ancak apatojen ka-

bul edilen *E. dispar* ve *E. moshkovskii* gibi amip türlerinin bulunabilmesi nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar alınabilmektedir ¹¹. Ayrıca nativ-lugol yönteminde bazı preparatlarda *Entamoeba* türlerine ait çekirdek yapısının tam olarak ayırt edilememesi nedeniyle son yıllarda bu yöntemin yanı sıra çekirdek yapısının ayrıntılı incelenebildiği Trichrome boyama yöntemi de uygulanmakta olup, morfolojik görünümün aynı olduğu apatojen türlerin ayırıcı tanısında ise dışkıda *E. histolytica* antijeni aranması gibi ileri yöntemlere başvurulabilmektedir ^{2,9,10}.

E. histolytica ve *E. dispar* için en güvenilir ayırt edici tanı yöntemleri olarak spesifik antijenlerin değişik yöntemlerle gösterilmesi ve özgün DNA bölgelerinin saptanması bildirilmektedir. Gelişmiş yöntemlerle yapılan değerlendirmede, insanlarda mikroskopik olarak tespit edilen amebiasis olgularından yaklaşık %90'ının *E. dispar*, %10'unun *E. histolytica* olduğu rapor edilmiştir ^{2,6}.

Türkiye'de bugüne dek farklı bölgelerde bu konuda çeşitli çalışmalar yayınlamıştır. Zeyrek ve arkadaşları ¹ yaptıkları çalışmada nativ-lugol yöntemi ile direkt bakıda şüpheli bulunan 87 dışkı örneğinin ELISA testi ile 19'unda (%21.7) *E. histolytica*'ya spesifik antijeni pozitif bulunurken, Trichrome boyama yöntemiyle 23 (%26.4) olgunun dışkı örneğinde *E. histolytica/dispar* saptamışlardır ¹. Benzer şekilde, Zonguldak'ta yapılan bir başka çalışmada da, direkt mikroskopi ile incelenen 1720 dışkı örneğinin 44'ünde

(%0.37) amip kistleri görülmüştür. Kist görülen 44 örneğin sadece 26'sında ELISA ile (%59.1) spesifik antijen varlığı saptanabilmiştir². Sivas'ta yapılan başka bir çalışmada ise 1449 dışkı örneğinin direkt mikroskopik (nativ-lugol ve Trichrome) olarak incelenmiştir. *E. histolytica/dispar* kisti saptanan 22 (%1.5) dışkı örneği ELISA ile *E. histolytica* varlığı yönünden araştırılmış ve 14 hasta pozitif olarak bulunmuştur¹¹. Tanyüksel ve ark.¹² yaptıkları çalışmada 380 hastanın 91'inde (%24) Trichrome yöntemiyle *E. histolytica/dispar* saptanmış olup, bu 380 hastaya ELISA uygulanmış 51'inde (%13) *E. histolytica* antijeni pozitif olarak değerlendirilmiştir¹². İzmir'de yapılan bir diğer çalışmada ise, 9378 hastanın 654'ünde trichrome boyama yöntemi uygulanmış olup 24 (%3.67) hastada *E. histolytica/dispar* bildirilmiştir. Öte yandan, ELISA yöntemiyle spesifik antijen aranan 677 dışkı örneğinin ise 18'inde (%2.66) *E. histolytica* varlığı tespit edilmiştir⁹. Ayrıca Van'da üniversite öğrencilerinde yapılan bir taramada sadece Trichrome boyası uygulandığında *E. histolytica* oranının %13.63 tespit edildiği gözlenmiştir¹³.

Çalışmamızda direkt bakıda nativ-lugol yöntemi ile *E. histolytica/dispar* ile enfekte olduğundan şüphe edilen 51 dışkı örneğinin 49'unda (%96.07) Trichrome boya yöntemi incelemesinde nükleus yapısı ayırt edilebildiğinden *E. histolytica/dispar* pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sağlık Bakanlığı'nın yeni SUT uygulaması kapsamında ayakta gelen poliklinik hastalarının limit sınırlamaları nedeniyle tüm hastalara ELISA yönteminin uygulanması mümkün olamamaktadır. Çalışmamızda da bu nedenle 51 hastanın dışkı örneklerinden 33 tanesine Trichrome boya yönteminin yanısıra ELISA testi de uygulanabilmiştir. Trichrome boyası ve ELISA yönteminin birlikte uygulanabildiği 33 hastadan 23'ünde (%71.8) adhesin antijeni de pozitif saptanırken 10 hastada ELISA testi negatif tespit edilmiştir. Trichrome boya yöntemi ile pozitif tespit edilen toplam 31 olgudan 8'i (%25.8) ELISA yöntemi ile negatif bulunmuştur. Bu 8 hastanın *E. dispar* olabileceği gibi yanlış negatif olma olasılığı da göz ardı edilmemelidir. Referans laboratuvarlarında ileri moleküler yöntemler ile tanının desteklenmesinin bu belirsizliği netleştireceği düşünülmektedir.

Rutin parazitolojik tanıda yaygın olarak kullanılan nativ-lugol yöntemiyle mikroskopik bakıda *E. histolytica* tanısı konulamamaktadır. Ayrıca mikroskopikle tanı konulan olguların yaklaşık %90'ının *E. histolytica* ile morfolojik olarak

ayırt edilemeyen apatojen *E. dispar* taşıdığı bildirilmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, çoğu hastanın gereksiz yere anti-amibik ilaç tedavisi aldığı ve bunun gerek insan sağlığı gerek ülke ekonomisi için olumsuz sonuçlar doğurduğu düşünülmektedir. Deneyimli personel tarafından uygulandığında altın standart özelliğini koruyan Trichrome boya yönteminin yanısıra ELISA gibi *E. histolytica/dispar* ayrımı yapabilen ileri tanı yöntemlerinin kullanılması, amebiasis şüphesi taşıyan hastalara mutlaka uygulanmalı ve hastaların kesin tanısı bu şekilde konulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Zeyrek F, Özbilge H, Yüksel MF, Zeyrek CD, Sırmatel F:** Şanlıurfa'da parazit faunası ve ELISA yöntemi ile dışkıda *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* sıklığı. *Türkiye Parazit Derg*, 30 (2): 95-96, 2006.
- Mengeloğlu FZ, Aktaş E, Külah C, Cömert FB:** Dışkı örneklerinde ELISA yöntemi ile *Entamoeba histolytica*'nın saptanması. *Türkiye Parazit Derg*, 33 (1): 1-3, 2009.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J:** Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev*, 20 (3): 511-532, 2007.
- Tanyüksel M, Petri WA:** Laboratory diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16 (4): 713-729, 2003.
- Pierce KK, Kirkpatrick BD:** Update on human infections caused by intestinal protozoa. *Curr Opin Gastro*, 25, 12-17, 2008.
- Ak M, Tanyüksel M, Dağcı H:** Tıbbi Parazit Hastalıkları, Amebiasis. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları*. No: 22, s. 279-307.
- World Health Organization (WHO):** Amoebiasis. *Weekly Epidemiol Rec*, 72, 97-100, 1997.
- Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi.** Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Ankara. s. 129, 2004.
- 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 Parazit Derg*, 31 (3): 188-193, 2007.
- Üstün Ş, Aksoy Ü, Üner A:** Gastrointestinal yakınmalı hastalarda Amoebiasis sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazit Derg*, 23 (4): 367-371, 1999.
- Malatyalı E, Özçelik S, Çeliksöz A:** The investigation of *Entamoeba histolytica* prevalence in some villages of Sivas by ELISA method. *Türkiye Parazit Derg*, 35, 6-9, 2011.
- Tanyüksel M, Yılmaz H, Ulukanlıgil M, Araz E, Cicek M, Kuru O, Tas Z, William A. Petri Jr:** Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of Amebiasis. *Exp Parasitol*, 110, 322-326, 2005.
- Yetkin A, Değer S, Özdal N:** Intestinal parasites in the students of Van Health High School and Faculty of Veterinary Medicine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (1): 81-84, 2010.