
Patojen ve Nonpatojen *Entamoeba histolytica* Zimodemlerinin Araştırılması

Nurettin ARDIÇ, Mehmet TANYÜKSEL, Levent DOĞANCI, Hüseyin GÜN

GATA, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Parazitoloji Bilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Amebiasisin etkeni olan *E. histolytica* ile dünya nüfusunun %10'u infekte durumdadır. Diğer parazitik hastalıklarda da olduğu gibi amebiazis, özellikle gelir durumunun düşük olduğu ve sanitasyon bozukluğu olan yerlerde daha sık gözlenmektedir. Epidemiyolojik çalışmalara bakıldığında, bu etkenle infekte kişilerin sadece %10'unda hastalık gelişmektedir. Ayrıca seroprevalans çalışmalarında düşük oranlara erişilmesi, infeksiyon gücünün düşük olduğunu göstermektedir. Bu durumun bir açıklaması, çoğu kişilerin nonpatojenik suşlarla infekte olmasıdır. İzoenzim elektroforezi ile yapılan çalışmalarda bugüne kadar 23 zimodem grubu saptanmış olup bunlardan 9'u konakta patojenlikle yakından ilişkilidir.

Bu çalışmada heksokinaz (HK), malik enzim (ME), fosfoglukomutaz (PGM) ve glukozfosfat izomeraz (GPI) izoenzimleri kullanılarak, yedi *E. histolytica* izolatu üzerinde yapılan poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) göç paternleri değerlendirilmiş ve zimodem analizleri yapılmıştır. İzolatlarımızın 4'ü Diyarbakır, 2'si İzmir, biri Ankara olmak üzere üç ayrı bölgeden alınmıştır.

Yapılan elektroforez çalışması sonucu, 4'ü semptomatik (3'ü Diyarbakır, biri İzmir bölgesi) ve biri asemptomatik hastadan (Diyarbakır bölgesi) elde edilen izolatlarda, HK enziminde, patojenite kriteri olarak hızlı göç eden çift band gözlenmiştir. PGM enziminde ise 3 izolatta (Diyarbakır bölgesi) β bandı gözlenirken, GPI enziminde 2 örnekte (Diyarbakır bölgesi), bir örnekte (Diyarbakır bölgesi) β bandı gözlenmiştir. ME'de ise band elde edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, Zimodem, İzoenzim

SUMMARY

Evaluation of Zymodemes of Pathogen and Nonpathogen *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica is the protozoan responsible for human amoebiasis. It infects 10% of the world population, causing 50 million cases of dysentery or liver abscesses and to death of 100.000 humans per year. As with other parasitic infections, amoebiasis is a consequence of poverty and bad sanitary conditions. According to epidemiological studies, only 10% of the effected people are infected with pathogenic strains. By enzyme electrophoresis, 23 zymodemes of *E. histolytica* have been identified. Of these, nine have been associated with pathology in the host. In this study, seven *E. histolytica* isolates were analyzed for their zymodeme patterns and the enzymes used to classify *E. histolytica* include glucosphosphate isomerase (GPI), he-

xokinase (HK), L-Malate (ME), and phosphoglucomutase (PGM) by observing the migration pattern of isoenzyme bands in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Our isolates were taken from different geographical parts; Diyarbakır (four isolates), İzmir (two isolates) and Ankara (one isolate) regions. HK enzyme is characterized by two fast-migrating bands in four isolates of symptomatic patients (three isolates from Diyarbakır region, and one isolate from İzmir region) and one isolate from an asymptomatic patient. PGM band were observed in three isolates (Diyarbakır region). GPI band was observed in two isolates (Diyarbakır region), whereas as a beta band in one isolate (Diyarbakır region). ME band is not found in any of the isolates.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, Zymodeme, İsoenzyme

Entamoeba histolytica'nın etken olduğu amebiazis tropikal ve subtropikal bölgelerde daha sık görülmekle birlikte, dünyada yaygın bir enfeksiyon olup, sıtma ve schistosomiasisten sonra ölüme en sık yol açan paraziter bir hastalık olduğu bildirilmektedir^[1].

Amebiasis asemptomatik taşıyıcılıktan fulminan kolite kadar değişik seyir göstermekte ve sözkonusu etkenin tanımlanmasında bugün ülkemizde ciddi bir sorun yaşanmaktadır^[2]. Tanıda sadece nativ baki kesinlikle yeterli olmamakta ve trichrome gibi bir boyama yöntemine gereksinim görülmektedir. Ayrıca etkenlerin içerdikleri izoenzimler açısından analizi gerekmektedir. Böylece tanı ve tedavi yönünden olduğu kadar, halk sağlığı açısından da önemli bilgiler elde edilecektir.

Bu çalışmada, *E. histolytica* enfeksiyonlarına hem doğru tanı konması, hem patojen olanlarla nonpatojen olanların ayrılması, hem de özellikle epidemiyolojik açıdan büyük önem arzeden zimodem modellerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Morfolojik olarak ayırdedilemeyen, ancak invaziv hastalıklı ve asemptomatik bireylerden kültüre edilen trofozoitler arasında belirli glikolitik enzimlerin (zimodem) elektroforetik göç paternleri arasındaki farklılıkla ortaya konan *E. histolytica*'nın iki ayrı tür olduğu belirtilmektedir. Bunlardan nonpatojenik zimodemlerin invaziv hastalıkla hiç ilişkisinin olmadığı, patojenik suşların ise her zaman olmamakla birlikte semptomatik invaziv hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu iki gruptan birincisi *E. dispar*, ikincisi ise *E. histolytica* olarak isimlendirilmektedir^[3].

Amebiasisin, ülkemizin değişik bölgelerinde % 0.3-17.0 sıklığında görüldüğü, bu oranın Batı bölgelerimizden Doğu bölgelerimize doğru arttığı bildirilmektedir^[4,5]. Ancak son seroprevalans değerlendirmelerine göre Türkiye'deki patojen *E. histolytica* enfeksiyon sıklığının beklenenden daha düşük olduğu düşünülmektedir^[2,6].

Barsak amebiazisinin tanısı en yaygın şekilde dışkı örneklerinde *E. histolytica* trofozoitlerinin gösterilmesi ile konmaktadır. Doğru tanı laboratuvar personelinin yeteneğine bağlı olduğu gibi, materyalin uygun bir şekilde alınması, laboratuvara ulaştırılması süresi ve uygulanan işlemlerle de ilişkili olmaktadır^[2,7,8]. Eritrosit fagosite etmiş trofozoitin varlığı mikroskopik düzeyde *E. histolytica*'yı, *E. dispar*'dan ayırmakta, çünkü *E. dispar*'da fagosite edilmiş eritrosit bulunmamaktadır^[9]. Ancak fagosite edilmiş maya hücrelerinin, eritrosit ile karıştırılma olasılığını da gözardı etmemek gerekmektedir^[10]. Bazen diğer barsak parazitleri ve makrofaj gibi vücut hücrelerinde de eritrositler bulunduğu^[8], yine lökositlerin *E. histolytica* kistleri ile karıştırılabileceği bildirilmiştir^[7]. Lökositler *E. histolytica* tarafından parçalandığı için, bunların dışkıda bulunup bulunmaması tanı yönünden anlam taşımadığı ve ayrıca fagosite edilmemiş eritrositlerin birbirlerine yapışarak diziler halinde bulunmaları (Anderson olayı) ve Charcot-Leyden kristallerinin görülmesinin mikroskopik tanıya bize yardımcı olacağı açıklanmıştır^[4].

Amerikan Parazitoloji Derneği Alt Komitesi, 1977'de amiplerin saptanması için en az üç dışkı örneğinin alınması gerektiğini tavsiye etmiştir. Ancak Proctor; Montessori ve Bischoff tarafından yapılan çalışmaya dayanarak akut amipli dizanteri döneminde tek dışkı örneği ile %90'ın üzerinde tanı konulabileceğini bildirmiştir^[8]. Hiatt ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarda benzer sonuca ulaşmışlardır^[11]. Belirtisiz amebiaziste ve kronik amipli dizanterinin tanısında ise etkenin görülebilmesi daha zor olduğundan, aralıklı olarak 4-9 kez alınan dışkı örneğinde amip aranması gerektiği^[11,12], çoklaştırma yöntemleri ile pozitif dışkı örneklerinde *E. histolytica*'yı saptama şansının ise %84-92 olduğu bildirilmiştir^[11]. Ülkemizde bu yöntemlerin, sayısı kısıtlı laboratuvarların dışında kullanılmıyor olması, aşırı tanı hipotezimizi desteklemektedir^[2].

Kültürün mikroskopiye göre duyarlılığı daha az olmakla beraber Robinson besiyerinin mikroskopiye üstün olduğunu düşünenler de bulunmaktadır^[8]. Çünkü bu besiyerinin amipler açısından barsak ortamına yakın bir özellikte olduğu bildirilmiştir^[3,22].

Serolojik yöntemlerin özellikle invaziv intestinal ve ekstraintestinal olgularda güvenilir bir tanı aracı olarak uygulanmakta olduğu ifade edilmiş, çeşitli araştırmalarda karaciğer amip abse olgularında %85-98 oranında kanda dolaşan anti-amip antikorları gözlemlenmiştir. Amipli dizanteride ise bu oranın %50-80 olduğu^[1,3,8], asemptomatik olgularda ise negatif serolojik sonuç alındığı, ancak patojen zimodemli amiplerle olan infeksiyonlarla pozitif seroloji arasında yakın bir ilişki bulunduğu saptanmıştır^[7]. IHA ile alınan pozitif sonuçlara göre, özellikle endemik bölgelerde aktif ve geçirilmiş infeksiyon birbirinden ayırt edilememektedir. Çünkü infeksiyondan sonra da pozitifliğin yıllarca (2-11 yıl) sürdüğü bildirilmiştir^[3,7-9]. Oysa ki ELISA ve daha az duyarlı olmasına karşın gel diffusion precipitation (GDP) ve counter immunoelectrophoresis (CIE) teknikleri ile pozitifliğin sadece 6-12 ay sürmesi nedeniyle akut ve geçirilmiş infeksiyonu ayırt etmede daha yararlı yöntemler olduğu bildirilmiştir^[3,9].

Daha hızlı, daha doğru ve daha ucuz bir yöntem olarak fekal-antijen aranmasında ELISA, mikroskopiye alternatif olası bir tanı yöntemi olarak ifade edilmektedir^[8,13]. ELISA ile yapılan monoklonal antikor çalışmalarında amipli dizanteride %100 duyarlılık ve özgüllük elde edilebileceği bildirilmiştir. Ayrıca *E. histolytica* ile *E. dispar* ayırımı yapmak da mümkün olmaktadır. Yine ELISA ile amibik kolit ve karaciğer abse tedavisinden yedi gün sonra galaktoz adezinin hem serum, hem de dışkıda negatifleşeceği iddia edilmektedir^[14]. Son çalışmalar ELISA'nın potansiyel bir tanı aracı olduğunu, belki de mikroskopik değerlendirmeye tam bağımlılığı ortadan kaldır-

cağını ortaya koymaktadır^[8]. *E. histolytica* ile *E. dispar*'ı ayırt etmede bir diğer yöntemin, dışkıda antijen saptama olabileceği ve bununla izoenzim yöntemleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmediği bildirilmiştir^[15]. DNA probrarı ile analiz son zamanlarda patojenik ve nonpatojenik *E. histolytica* izolatlarını ayırmada yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır^[9,7, 8,3,16,17]. Yöntem oldukça basit, hızlı ve duyarlıdır. Kültür aşamasına gerek kalmadan *E. histolytica* ile *E. dispar* bu yöntemle birbirinden ayrılabilir. Tüm ekstraksiyon basamakları oda ısısında gerçekleştirilebilmekte ve işlemin tamamı bir günde tamamlanabilmektedir^[18].

İzoenzimler aynı biyokimyasal olayı katalizleyen, fakat farklı olan enzimler olarak bildirilmektedir^[19]. *E. histolytica*, bulundurduğu izoenzimlere göre "zimodem" gruplarına ayrılmıştır. Zimodem (Z), benzer popülasyonlarda elektroforetik mobiliteleri farklı olan spesifik enzimleri taşıyan popülasyonlar olarak tanımlanmaktadır^[7]. Amip zimodemlerini belirlemede kullanılan enzimler glukoz fosfat izomeraz (GPI) (E.C.5.3.1.9), heksokinaz (HK) (E.C.2.7.1.1), malik enzim (ME) (E.C.1.1.1.40) (L. malate NADP oksidoreduktaz), fosfoglukomutaz (PGM) (E.C.2.7.5.1) olarak sayılabilmektedir^[1,20,21]. Patojenite değerlendirilmesi, klinik ve serolojik bulgular temel alınarak yapılmıştır. Bruckner; Sargeant ve arkadaşlarının 6000'den fazla patojen-nonpatojen izolatın izoenzim analizlerini çıkartarak, izolatların elde edildiği kişilerin klinik durumları ile serolojik profilleri arasında ilişki bulunduğunu gösterdiklerini belirtmektedir^[7].

İzoenzimler virulans faktörleri olmayıp, önemli patojenite göstergeleri olarak kabul edilmektedir^[22]. Tablo 1'de belirtildiği gibi patojenite kriterleri, HK'da hızlı göç eden bir çift bandla, PGM'de β bandının varlığı ve α bandının yokluğu olarak ifade edilmektedir^[7, 21,32,16].

Tablo 1. Patojen ve nonpatojen zimodemlerin izoenzimlere göre özellikleri

İzoenzim grubu	Nonpatojenik izolatlar	Patojenik izolatlar
HK	Yavaş göç	Hızlı göç
PGM	α bandı varlığı	β bandı varlığı
ME	Özellik yok	Özellik yok
GPI	Özellik yok	Özellik yok
Zimodem grupları	I, III, III α , IV, V, VIII, IX, X, XV, XVI, XVII, XVIII, XXI**	II, II δ , VI, VII, XI, XII, XIII*, XIV, XIX, XX

* Zimodem XIII patojen, ancak hızlı HK bandı yoktur.

** Zimodem XXI nonpatojen, ancak hızlı göç eden HK bandına sahiptir.

Bugün bilinen 23 zimodemden 9'u patojenik olup, dışkıdan izole edilen ve eritrosit içeren trofozoitlerle, intestinal ülser ve karaciğerden soyutlanan izolatlarda belirlenmiştir. Diğer 13 zimodem ise asemptomatik kist taşıyıcılarından elde edilen izolatlarda saptanmıştır^[7]. Bir zimodem ise (Z XX), iki farklı zimodeme ait (Z II ve Z XIV) amiplerin hibridleşmesi sonucunda bulunmuştur^[23].

Dünyada en yaygın zimodem grupların Z I ve Z III olduğu bilinmektedir^[24]. En yaygın patojen zimodem grubu ise Z II'dir^[24]. Z II asıl olarak Batı, Z XIV ise Doğu ülkelerinde bulunmaktadır^[21,24].

Zimodem çalışmaları için, dışkı, eksuda, karaciğer aspiratı veya diğer şüpheli materyallerden amiplerin aksenik olmayan kültürleri yapılmaktadır. Bu amaçla en sık Robinson ve Jones besiyerleri kullanılmaktadır^[7]. Elektroforez amacıyla yeterli sayıda mikroorganizma elde edebilmek için iki günde bir olmak üzere, 3-9 pasaj yapılması gerekmekte, ksenik olan bu besiyerleri bir çok bakteriyi de içermesine karşın, bakteri izoenzimlerinin amiplere göre daha hızlı göç paternleri sergiledikleri gözlenmektedir. Bununla beraber, izoenzim çalışmalarının amip kontrolleri olmadığı zaman, mutlaka bakteri kontrolleri ile birlikte yapılmasını gerektirdiği, yine nadiren gözlenirse de hızlı göç eden amibik bandlarla, yavaş göç eden bakteriyel bandların ayırt edilmesi gerektiği bildirilmiştir^[25].

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda dışkı örnekleri rutin olarak serum fizyolojik ve lugolde mikroskopik olarak incelenmiş, şüpheli görülen dışkılar hem kalıcılığı sağlamak, hem de daha doğru bir tanı koyabilmek amacıyla trichrome yöntemi ile boyanarak tekrar değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda *E. histolytica* bulunduğu düşünülen dışkılar tekniğine uygun olarak Robinson besiyerine ekilmiştir^[26]. Besiyerinde elektroforez için yeterli çoğunlukta üreme olduğu gözlenen örneklerden (48 saatte bir pasajlanarak, ortalama 3-9 pasajda) li-zatlar hazırlanmış ve -70°C'de saklanmıştır.

Yeterince üreme olduğu düşünülen besiyerlerinin sıvı kısmı karıştırılarak Thoma lamininin her iki sayma kamarasına birer damla konulup, üzerine lamel kapatılmış, her iki sayma kamarasında da büyük alanlarda en az beş amip trofozoiti görülen kültürler çalışmaya alınmıştır^[27]. Elektroforez için geçerli 5×10^4 /mL amip varlığı saptanan kültür tüplerindeki amipler nişasta ile birlikte toplanıp 350 g'de, oda ısısında 15 dakika santrifüj edilmiştir. Enzimleri stabilize etmek ve proteazları inhibe etmek için üst sıvı uzaklaştırılıp, geriye kalan çökelti üzerine eşit mik-

tarda birer mM ditiotritol, EDTA ve ϵ -aminokaproik asid içeren distile su ile yeniden süspanse edilmiş, bu süspanسیون önce -25°C'de dondurulup, sonra 37°C'lik su banyosunda çözündürülmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra 30000 g'de, +4°C'de 30 dakika süre ile santrifüj edilmiş, elde edilen üst sıvılar 20-50 μ L'lik hacimler halinde ependorflara konulup elektroforez yapılmaya kadar -70°C'de saklanmıştır^[25].

Bakteri kontrolü için, amip içermeyen Robinson besiyerinde 48 saatlik *E. coli* kültürü yapıp, diğer örnekler gibi lizat hazırlanmıştır^[28].

Elektroforez işlemi için Laemmli yönteminin^[29] modifikasyonu ile Mathews yöntemi^[25] çalışılmış, enzim bandlarının Laemmli yöntemi modifikasyonunda daha iyi gözlenmesi üzerine, çalışmamız bu yöntem üzerinde yoğunlaştırılmış ve %6'lık jel solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon, 10x7 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlıkta olacak şekilde iki cam levha arasına vertikal olarak döküldükten sonra plastik tarak yerleştirilerek oda ısısında donmaya bırakılmıştır. Daha sonra plastik taraklar çıkarılmış ve +4°C'de çalışma buffer ortamına yerleştirilmiştir. Jeller, 40 dakika süreyle 50 mA'da preelektroforez işleminden geçirildikten sonra 10-20 μ L miktarlarında örnekler yüklenmiş ve HK enzimi için 30 volt (V)'ta 6 saat; ME, PGM ve GPI enzimleri için ise 70 V'de 10 saatlik elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, her bir jel cam destekleyicilerinden alınıp plastik kaplara konulmuş ve her enzim için Tablo 2'de belirtilen uygun boyama solüsyonuna daldırıldıktan sonra 20-45 dakika süreyle 37°C'lik etüv ortamında, rotatorla çevrilerek inkübe edilmiştir. Zaman zaman kontrol edilerek boyama işlemi tamamlandıktan sonra boyama solüsyonundan alınan jeller, distile suyla yıkanarak, %7'lik asetik asitle tespit edilmiş ve işlem sonunda örneklerin fotoğrafları çekilmiştir.

Burchard (Almanya)'dan temin edilen ve zimodem paterni bilinen HM1:IMSS patojenik suşu (Z II) kontrol örnek olarak ve ayrıca her bir jel için bakteri kontrolleri kullanılmıştır. Her izoenzimde elde edilen bandların merkezi ile başlangıç yarığı arasındaki uzaklık ölçülerek standart suşlarla karşılaştırılarak band paternleri değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda Ankara bölgesinden bir (A-1), Diyarbakır bölgesinden birisi asemptomatik olgu olmak üzere dört (D-1, D-2, D-3, D-4) ve İzmir bölgesinden iki (İ-1, İ-2) örnek üzerinden çalışma yapılmıştır. Örnekler, Laemmli yöntemine^[29] göre mo-

Tablo 2. Enzimleri belirlemede kullanılan maddeler ve miktarları^a

Enzim	Buffer pH	Koenzim (NADP) (mg)	Substrat	Bağlayıcı enzim (G-6-P DH) (U)	MgCl ₂	MTT	PMS ^b	ATP
ME	7.4	20	3 mM maleik asit (pH: 7.0) ile NaOH (0.1 M stoktan 0.3 mL)	-	0.1 M stoktan 10 mL	20	4	-
HK	7.4	24	Glukoz (190 mg)	96	0.1 M stoktan 7.6 mL	24	4	72
PGM	7.4	10	Na-Glu-1-PO ₄ (200 mg)	40	0.1 M stoktan 10 mL	20	4	-
GPI	8.0	10	Fru-6- PO ₄ (36 mg)	20	0.1 M stoktan 10 mL	10	4	-

^a: Her biri 100 mL olan boyama solüsyonu
MTT: Metil tiazolil tetrazolium
ATP: Adenozin trifosfat
Na-Glu-1-PO₄: Sodyum glukoz-1- fosfat

^b: Buffer 0.1 mL tris-hidrokloriddir (1.0 M stoktan 10 mL)
PMS: Fenazin metosülfat
NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Fru-6- PO₄: Fruktoz-6-fosfat

difiye ettiğimiz elektroforez işlemi uygulanmıştır. Şekil 1'de HK enzim elektroforezinde elde ettiğimiz bandların fotoğrafı, Şekil 2'de ise bunun şematik çizimi gösterilmekte, semptomatik hastadan elde edilen dört örnekte (D-1, D-2, D-3 ve İ-1) belirgin, asemptomatik bireyden elde ettiğimiz tek örnekte (D-4) ise zayıf ileri çift band izlenmektedir. Şekil 3'de fotoğrafı, Şekil 4'de ise şematik resmi görülen PGM enziminde; bir örnekte (D-1) zayıf olmak üzere, toplam üç örnekte (D-1, D-2 ve D-3) β bandına uygun tek bandların oluştuğu görülmektedir. Benzer şekilde Şekil 5'de GPI enzim elektroforezinde görülen bandlar ve Şekil 6'da bunların şematik resmi görülmektedir. İki (D-1, D-4) α, birisi (D-2) β bandına uygun

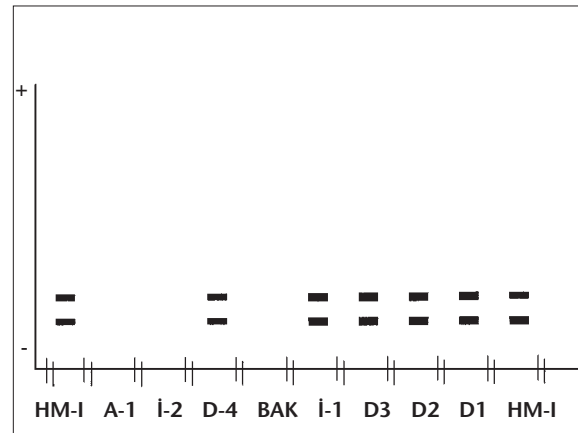
toplam üç örnekte band oluştuğu görülmektedir. ME'de gerek kontrol, gerekse örnek suşlarda band oluşmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

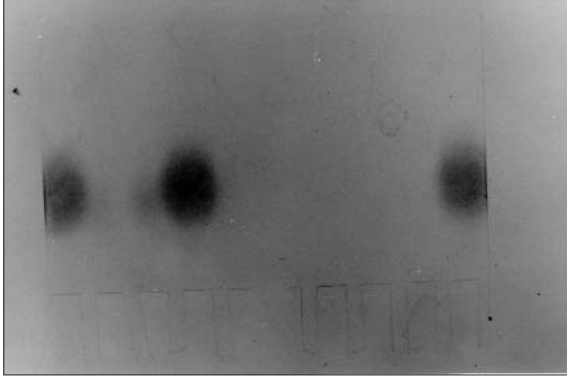
Dünyada *E. histolytica* veya *E. dispar* ile enfekte 500 milyon civarında insan bulunduğu tahmin edilmektedir^[3,30]. Yani dünya nüfusunun yaklaşık %10'u amiplerle enfekte olup, geri kalmış bölgelerde bu oran %50'lere, hatta Güneydoğu Meksika'da %96'ya varmaktadır^[4,30]. Ancak *E. dispar* ile olan enfeksiyon *E. histolytica* enfeksiyonundan yaklaşık on kat daha fazla olarak tahmin edilmektedir^[3,30]. *E. histolytica* ile enfekte kişilerin 40-50 milyon kada-



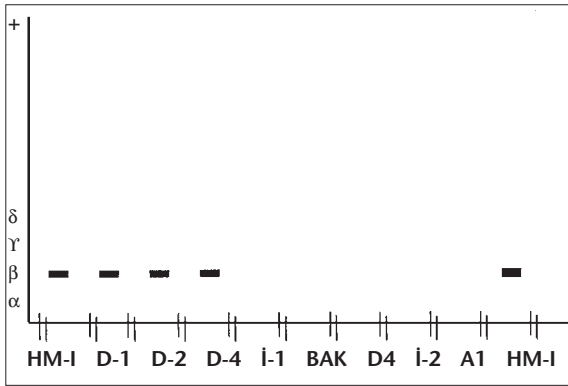
Şekil 1. İzolatlarımızdan elde ettiğimiz HK enzim bandlarının fotoğrafı



Şekil 2. İzolatlarımızdan elde ettiğimiz HK enzim bandlarının şematik resmi



Şekil 3. İzolatlarımızdan elde ettiğimiz PGM enzim bandlarının fotoğrafı



Şekil 4. İzolatlarımızdan elde ettiğimiz PGM enzim bandlarının şematik resmi

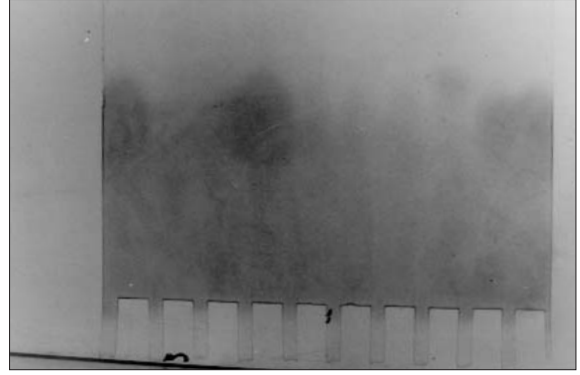
rında kolit veya barsak dışı hastalık gelişmekte, bunların da her yıl 40-100 bin kadarı ölümlerine sebep olmaktadır^[3,9,30]. İnfekte kişilerin ancak %10'unun semptomatik olması, hatta homoseksüel ve AIDS'li-lerde bile belirtisiz enfeksiyona rastlanması, iki olasılığı akla getirmektedir^[22]:

1. *E. histolytica*, tek türdür. Konak savunması ve bağırsak flora değişiklikleri gibi tetikleyici durumlarda invaziv şekle gelmekte, diğer durumlarda sessiz olarak bulunmaktadır.

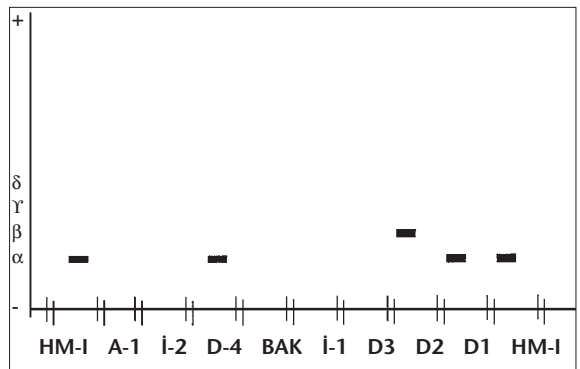
2. Biri invazyon yapabilen, diğeri ise yapamayan iki tür bulunmaktadır.

Son zamanlardaki görüş ikinci seçeneği doğrulamaktadır.

Li ve Stanley; Brumpt'un *E. histolytica*'nın morfolojik olarak ayırtedilemeyen iki ayrı türe sahip olduğunu, bunlardan birisinin hastalık yapma yeteneğindeki *E. histolytica* olup *E. dysenteriae*, diğeri zararsız bir kommensal olup *E. dispar* olarak adlandırıldığını bildirmişlerdir^[3]. Sargeant ve Williams, 50 yıldan daha uzun bir süre sonra invaziv hastalıklı ve asemptomatik bireylerden kültüre ettiği trofozoitler



Şekil 5. İzolatlarımızdan elde ettiğimiz GPI enzim bandlarının fotoğrafı



Şekil 6. İzolatlarımızdan elde ettiğimiz GPI enzim bandlarının şematik resmi

HM-I : Z II'ye sahip HM-I-IMSS kontrol suşu
A-1 : GATA Mik. ve Kl. Mik. ABD'den elde edilen izolat
D-1, D-2, D3, D4 : Diyarbakır bölgesinden elde edilen izolatlar
İ-1, İ-2 : Ege Ün. Parazitoloji ABD'den elde edilen izolatlar
BAK : Bakteri kontrol

arasında belirli glikolitik enzimlerin elektroforetik göç paternleri arasındaki farklılığı göstermekle (zimodem) de Brumpt'un hipotezini desteklemişlerdir^[28]. Daha sonraki çalışmalarda nonpatojenik zimodem grubundaki amiplerin invaziv hastalıkla hiç ilişkisinin olmadığı, patojenik suşların ise her zaman olmamakla birlikte semptomatik invaziv hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. *E. histolytica* ile *E. dispar*'ın farklı oldukları, antijenik, genomik DNA, ribozomal RNA ve klinik epidemiyolojik çalışmalarla da doğrulanmıştır^[14]. Semptom olsun veya olmasın *E. histolytica*'nın serolojik yanıt oluşumundan sorumlu olduğu gözlenirken, *E. dispar*'ın ise serolojik yanıtı yol açmadığı, bu özelliğin mikroskopi ile kombine kullanıldığında patojenik ve nonpatojenik türlerin ayırımında yararlı, kısmen hızlı bir tanı aracı olduğu ve endemik bir bölgede serumda anti-*E. histolytica* antikorları, varolan veya geçirilmiş bir *E. histolytica* enfeksiyonunu gösterirken; aynı durumun endemik ol-

mayan bölgede varolan infeksiyon için yüksek tanısal özgüllüğe sahip olduğunu ifade etmektedir^[14]. Nonpatojen zimodeme ait grubun, patojen bir suşun dönüşümünü bildiren çalışmalar bulunmakta ise de, genetik analizler bu dönüşümün laboratuvar suşları ile kontaminasyona bağlı olabileceğini düşündürmektedir^[3,9]. Bu nedenle *E. histolytica* tekrar iki ayrı tür olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre nonpatojen zimodem taşıyanlar şimdi *E. dispar* olarak sınıflandırılmış, patojen zimodem taşıyanlar ise *E. histolytica* olarak kalmıştır^[3,9,14]. Aslında *E. dispar*, nonpatojen *E. histolytica* ile sinonim olarak kullanılmakta ise de, *E. dispar* için nonpatojenik terimini kullanmak yanlış olabilmektedir. Çünkü yavru kedi, gerbil ve kobay gibi hayvanlarda yapılan çalışmalarda fokal bağırsak lezyonları oluşturabildiği deneysel olarak gösterilmiştir. İnsan barsağında da invaziv olmakla birlikte, patolojik değişiklikler ortaya çıkardığı saptanmıştır^[31].

Tüm dünyada halen geçerliliğini koruyan ve laboratuvarlar tarafından rutin uygulamada yaygın olarak kullanılan mikroskopik tanı yöntemiyle olguların en az 2/3'ünün gözden kaçabildiği bildirilmiştir^[6]. Ayrıca *E. histolytica*'yı *E. dispar*'dan ve diğer bağırsak protozoonlarından ayırtmak da gerekmektedir, bunların yanında özellikle lökositleri kistlerle, makrofajları trofozoitlerle karıştırma olasılığı yazarlar tarafından bildirilmektedir^[2,9,10]. Nitekim çalışmamızda Ankara ve Diyarbakır'da iletişim kurduğumuz laboratuvarlardan elde ettiğimiz ve amebiazis ön tanısı konmuş 127 dışkı örneğinden sadece yedisinde *E. histolytica*'ya rastlanmıştır. Bu örneklerde lökosit, makrofaj, *Blastocystis hominis* ve *E. coli*'ye rastlanmamız, literatürlerde belirtilen yanlış tanı fenomeniyle uygunluk gösterirken^[7,9]; ayrıca tekrar incelenen örneklerde *Giardia intestinalis*, *Trichomo-*

nas hominis ve *T. saginata*'yı da saptamamız şaşırtıcı olmuştur.

Zimodem analizi ince tabaka nişasta jel^[28], agaroz jel^[32], gradient jel^[33], sellüloz asetat jel^[34] veya PAGE^[25] gibi elektroforez yöntemleri ile yapılabilmektedir. PAGE'nin yüksek rezolüsyon gücüne sahip olması^[35], GPI enzim bandlarının da daha iyi belirlenmesi^[1], çalışmamızda bu yöntemin tercih edilmesini gerektirmiştir.

Kesin bir zimodem grubu belirlenmesi için Z I, Z II ve Z XIV grubuna ait suşların kontrol olarak kullanılması gerektiği belirtilmektedir^[27]. Çalışmamızda ise Tablo 3'te de belirtildiği gibi sadece Z II'ye ait kontrol suşun kullanılması kesin bir zimodem belirlenmesini yapmamızı engellemiştir. Ancak bu kontrol suşa dayanarak bir örneğin Z II'ye ait olması olasıdır. Ayrıca örneklerden üçünde hem HK hızlı çift bandı, hem de PGM'de β bandı gözlenmesi, iki örnekte ise PGM β bandı gözlenmemesine karşın HK hızlı çift bandlarının gözlenmesi, band oluştuğunu gözlediğimiz tüm örneklerin patojen olduğunu düşündürmektedir. Buradan çıkardığımız bir sonuç da, asemptomatik kişiden elde edilen izolata patojen olabileceği, dolayısıyla ülkemizde sessiz infeksiyonlu portörler aracılığı ile *E. histolytica*'nın yayılabileceğidir.

Blanc ve Sargeant, üreme ortamında bulunan nişasta miktarının zimodem paternini etkileyebileceğini göstermişlerdir. Kültür ortamında nişasta yoğunluğu arttıkça PGM ve GPI'da μ ve δ bandlarının daha sık gözlendiği, α ve β bandında ise değişiklik olmadığı bildirilmektedir^[20]. PGM ve GPI'da γ ve δ bandları normalde gözlenmeyebilirse de, çalışmamızda hiç bir örnekte bu enzimlere ait γ veya δ bandı oluşmaması, belki de kültürde nişasta miktarının yoğun olarak kullanılmayışımıza bağlıdır.

Tablo 3. Örneklerimizde saptanan enzim bandları, olası zimodem grubu ve patojenite durumları

İzolot	HK	PGM	GPI	ME	Olası zimodem grubu	Patojenite
A-1	-	-	-	-		
D-1	Hızlı	β	α	-	II	Patojen
D-2	Hızlı	β	β	-	XIV	Patojen
D-3	Hızlı	β	-	-	?	Patojen
D-4	Hızlı	-	α	-	?	Patojen
İ-1	Hızlı	-	-	-	?	Patojen
İ-2	-	-	-	-		
HM-I	Hızlı	β	α	-	II	Patojen

Zimodem gruplarıyla ilgili bilgiler, dünyanın değişik bölgelerinden elde edilen izolatlar üzerinde yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. Bruckner; Sargeaunt ve arkadaşlarının, ilk izolasyondan sonra dokuz yıl geçmesine karşın, izolatların zimodem gruplarında herhangi bir değişiklik saptayamadıklarını belirtmektedir^[7].

Zimodem gruplarının genotipik veya fenotipik özelliklerle ilgisi olup olmadığı gösterilememiştir. Sargeaunt'ın, patojen ve nonpatojen amip izolatlarının farklı alt türleri gösterdiğini ve zimodem paterninin sabit bir özellik olduğunu ileri sürerken, Mirelman ve arkadaşları ile bir kısım araştırmacıların ise zimodem fenotipik özelliği gösterdiğini ve farklı çevre şartlarında değişikliklerin olabileceğini, dolayısıyla izoenzim özelliğinin değişken olduğunu ileri sürdükleri ifade edilmektedir^[7,36]. Eğer ikinci görüş doğru ise klinik ve epidemiyolojik açıdan, sadece semptomatik veya serolojik pozitif olguların tedavisinin asemptomatik kist taşıyıcıların rezervuar olma tehlikesini devam ettirebileceği bildirilmiştir^[7].

Mirelman ve arkadaşları, Sargeaunt'un zimodem değişikliği gözleyememesini, pasajlarını ksenik ortamlarda sürdürmelerine bağlamışlardır^[36]. Zimodem değişikliği ile ilgili moleküler düzeyde çok az şey bilinmektedir. Bununla ilgili iki olasılığın bulunduğu açıklanmıştır^[32]. Birincisi, patojen suşların kültür sırasında nonpatojen olanlara göre daha hızlı ürediği ve baskın duruma geçtikleri bildirilmiştir. Diğer olasılık ise gen mutasyonu olarak açıklanmaktadır.

Bugüne kadar ülkemizde *E. histolytica* zimodem grupları ile ilgili yapılmış olan iki çalışma bulunmaktadır^[27,37]. Demirel ve arkadaşlarının çalışmasında da, bütün örneklerde çalışmamızdaki gibi ME bantları görülmemiştir^[27].

Teşekkür: Bu çalışmada lizat temininde yardımları için Ege Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Mucide AK, Dr. Hande DAĞCI ve Bio. Aylin BABAOĞLU'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Walsh JA. Problem in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8(2):228-38.
- Doğanç L, Tanyüksel M, Gün H. Overdiagnosis of intestinal amoebiasis in Turkey. *Lancet* 1997;350(9078):670.
- Li E, Stanley SL. Parasitic Disease of The Liver and Intestines-Protozoa-Amebiasis. *Gastroenterol Clin N Am* 1996;25(3):471-93.
- Ak MA, Kıracı D. Amoebiasis. Güneydoğu Anadolu Projesini Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. Editör: Özcel MA. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 1995:75-95.
- Kuman A, Altıntaş N. Protozoon Hastalıkları. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 1996;8:17-35.
- Doğanç L. Amebiasis. *İnfek Bül* 1996;2:70-3.
- Bruckner DA. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5(4):356-69.
- Proctor EM. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Lab Med* 1991;11(4):829-59.
- Ravdin JI. Amebiasis. *Clin Infect Dis* 1995;20:1453-66.
- Orhan V, Yaşarol Ş. Amiplerin Morfolojisi, Fizyolojisi ve Evrimi. *Amöbiyazlar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları* 1985;4:14-48.
- Hiatt RA, Markell EK, Ernest NG. How Many Stool Examination are Necessary to Detect Pathogenic Intestinal Protozoa? *Am J Trop Med Hyg* 1995;53(1):36-9.
- Budak S, Sermet İ. Amöbiyazların Laboratuvar Tanısı. *Amöbiyazlar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları* 1985;4:123-42.
- Hohenschild S. Diagnosing amoebiasis. *Lancet* 1997;350:1034.
- Jackson TFHG, Ravdin JI. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Infections. *Parasitol Today* 1996;12(10):406-9.
- Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lysterly DM, Petri WA. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Infection in Children in Bangladesh. *J Infect Dis* 1997;175:734-6.
- Tanyüksel M, Ardıç N, Gün H. Farklı veya Aynı tür: *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) ve *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925). *T Parazitol Derg (Baskıda)*.
- Aguire A, Warhurst DC, Chul F, Frame IA. Polymerase Chain Reaction Solution Hybridization Enzyme-Linked Immunoassay (PCR-SHELA) to Differential Diagnosis of Pathogenic and Non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995;89:187-8.
- Katzwinkel WS, Loscher T, Rinder H. Direct Amplification and Differentiation of Pathogenic and Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from Stool Specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1994;5(1):115-8.
- Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Beşinci Baskı, İstanbul: Doyuran Matbaası 1995;511-40.
- Blanch D, Sargeaunt PG. *Entamoeba histolytica* Zymodemes: Exhibition of Gamma and Delta Bands Only of Glucose Phosphate Isomerase and Phosphoglucosmutase may be Influenced by Starch Content in the Medium. *Exper Parasitol* 1991;72(1):87-90.
- Sargeaunt PG, Baveja UK, Nanda R, Anand BS. Influence of Geographical in the Distribution of Pathogenic Zymodemes of *Entamoeba histolytica*: Identification of Zymodeme XIV in India. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1984;78:96-101.
- Reed SL. New Concepts Regarding The Pathogenesis of Amebiasis. *Clin Infect Dis* 1995;21(Suppl 2):182-5.
- Sargeaunt PG, Jackson TF, Bhojani R. Biological Evidence of Genetic Exchange in *E. histolytica*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988;82:862-7.
- Gathiram V, Jackson TFGH. Frequency Distribution of *E. histolytica* Zymodemes in a Rural South African Population. *Lancet* 1985;30:719-21.

25. Mathews HM, Moss DM, Healy GR, Visvesvara GS. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Isoenzyme from *Entamoeba* Species. *J Clin Microbiol* 1983;17(6):1009-12.
26. Robinson GL. The Laboratory Diagnosis of Human Parasitic Amoebae. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1968; 62(2):285-94.
27. Demirel M. Semptomatik ve Asemptomatik Olgulardan İzole Edilen *Entamoeba histolytica* Suşlarında Patojenite Kriterlerinden İzozim Paternlerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1997.
28. Sargeant PG, Williams JE. Electrophoretic Isoenzyme Patterns of the Pathogenic and Nonpathogenic Intestinal Amoeba of Man. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1979; 73(2):225-7.
29. Laemmli UK. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Heat of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
30. Ravdin JI, Petri WA. *Entamoeba histolytica* (Amebiasis). In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, (Eds). *Principle and Practice Infectious Disease*. Fourth Ed, New York: Churchill Livingstone 1995; 2395-415.
31. Diamond LS, Clark CG. A Redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Euk Microbiol* 1993;40(3):340-4.
32. Cheng X, Huang M, Mirelman D. Effect of Hamster Liver Passage on the Isoenzyme Pattern of *Entamoeba histolytica*. *Chinese Med J* 1992;105(11):918-22.
33. Meza I, Garza M, Meraz MA, Gallegos B, Torre M, Tanimoto M, Palomo AM. Isoenzyme Patterns of *Entamoeba histolytica* Isolates From Asymptomatic Carriers: Use of Gradient Acrylamide Gels. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35 (6):1134-9.
34. Haque R, Hall A, Tzipori S. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* in Dhaka, Bangladesh. *Ann Trop Med Parasitol* 1990;84(6):629-32.
35. Dunn MJ. Electrophoretic Analysis Methods. Protein Purification Methods; A Practical Approach. In: Harris ELV, Angal S (Eds). Oxford: IRL Press 1993:18-40.
36. Mirelman D, Bracha R, Chagen A. *E. histolytica*: Effect of Growth Conditions and Bacterial Associates on Isoenzyme Patterns and Virulence. *Exper Parasitol* 1986; 62:142-8.
37. Kırdar S. Klinik Yakınlı Olgulardan İzole Edilen *Entamoeba histolytica* Suşlarının Zimodem Paternleri. Doktora Tezi, İzmir: DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1996.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Mehmet TANYÜKSEL
GATA Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Parazitoloji Bilim Dalı
Etlik-ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 15.12.1997 Kabul Tarihi: 09.05.1998

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ 17. GEVHER NESİBE TIP GÜNLERİ HASTANE İNFEKSİYONLARI SİMPOZYUMU 20-22 Nisan 1999 - KAYSERİ

Müracaat: Doç. Dr. Bülent SÜMERKAN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Laboratuvarı

38039 - KAYSERİ

Tel: 0352. 437 49 01 / 2472 • Faks: 0352. 437 85 52