
Dışkı Örneklerinde *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar*'ın Araştırılmasında Direkt Mikroskop ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması#

Selin NAR*, Efsun AKBAŞ*, Berrin ESEN*

* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

ÖZET

Araştırmamızda, intestinal amebiyazisin tanısında direkt mikroskopik inceleme ile paraziter antijenlerin gösterilmesi esasına dayalı "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" yöntemi karşılaştırılmıştır. Üç farklı gruptan toplanan dışkı örnekleri çalışma kapsamına alınmıştır. Birinci grup amebiyazis riski potansiyel olarak yüksek 142 mental retarde bireyden, ikinci grup parazitoloji laboratuvarımıza başvuran 77 bireyden, üçüncü grup ise herhangi bir risk grubuna girmeyen, semptomsuz 34 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Örnekler direkt mikroskop ve iki farklı ELISA kiti ile incelenmiştir. Birinci kit (CELISA Screen, Cellabs, AA) *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar*'ın ortak yüzey antijenlerine karşı monoklonal antikör (Mab) içeren bir kit olup tarama amaçlıdır. İkinci kit (CELISA Path, Cellabs, AA) ise *E. histolytica*'nın spesifik yüzey antijenlerine karşı Mab içeren bir kit olup, patojen *E. histolytica*'nın ayırıcı tanısı için tercih edilmiştir. Direkt mikroskopik inceleme ile; mental retarde grubun %13.3 (19/142)'ünde, poliklinik grubunun %9.1 (7/77)'inde *E. histolytica-dispar*'a ait kist ve/veya trofozoidler saptanmıştır. Ortak yüzey antijenlerine karşı Mab içeren kit ile mental retarde grubun %19.0 (27/142)'unda, ikinci grubun %20.7 (16/77)'inde *E. histolytica-E. dispar* pozitif bulunmuştur (her iki grup için sırasıyla duyarlılık %100, %100; özgüllük %93.4, %87.1). ELISA ile ortak yüzey antijeni pozitif bulunan mental retarde gruba ait 27 örneğin 1 (%3.7)'inde ve 16 parazitoloji laboratuvar örneğinin yine yalnızca 1 (%6.25)'inde *E. histolytica* spesifik yüzey antijeni varlığı gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerden oluşan üçüncü grupta yöntemlerin hiçbiri ile pozitif bulgu saptanmamıştır. Sonuç olarak, ülkemizde intestinal amebiyazis tanısında direkt mikroskopik incelemenin en yaygın kullanılan yöntem olduğu göz önüne alındığında, olguların önemli bir kısmında rapor edilen amip elemanlarının gerçekte nonpatojen-noninvaziv *E. dispar*'a ait olduğu ileri sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, Yüzey antijenleri, ELISA

SUMMARY

The Comparison of Direct Microscopy and Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Investigation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Stool Samples

In this study, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) based on demonstrating parasitic antigens had been compared with direct microscopic investigation. The stool samples collected from three different

groups had been included in the study. The first group consists of 142 mental retarded people who is at potentially high risk for amebiasis, the second group consists of 77 people who admitted to our parasitology laboratory and the third group consists of 34 healthy people who do not be participated in any risk group. Samples had been investigated by using direct microscopy and two different ELISA kits. The first kit (CELISA Screen, Cellabs, AA) for the purpose of screening contains monoclonal antibody (Mab) against common surface antigens for *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. The second kit (CELISA Path, Cellabs, AA) contains Mab directed against specific surface antigens of *E. histolytica*. It had been preferred for differential diagnosis of pathogenic *E. histolytica*. *E. histolytica* and *E. dispar* cysts and/trophozoits had been detected in 13.3% (19/142) of mental retarded group, 9.1% (7/77) of second group by direct microscopic examination. By using the CELISA Screen kit, positive results for *E. histolytica*-*E. dispar* common surface antigens had been found in 19.0% (27/142) of mental retarded and 20.7% (16/77) of second group (sensitivity and specificity of the assay for two groups were 100%, 100%; 93.4%, 87.1% respectively). *E. histolytica* specific antigen had been demonstrated on one of the 27 samples from mental retarded group (3.7%) and only one of the 16 samples taken from second group. It had not been found any positive findings in the third group composed of healthy people. When it is pointed out that the diagnosis of amebiasis based on direct microscopic investigation is as the most common method in our country, it can be put forward that the amebic elements detected by microscopy from the most cases are related to nonpathogenic and noninvasive *E. dispar*.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, Surface antigens, ELISA

Bu araştırma, XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (30 Eylül-5 Ekim 2002, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Mikrobiyolojideki teknolojik gelişmeler sayesinde eskiden beri var olan amebiyazise yeni bir yaklaşım tarzı gündemdedir. Biyokimyasal, immünolojik, genetik, klinik ve epidemiyolojik veriler *Entamoeba histolytica*'nın morfolojik olarak identik iki türü kapsadığı fikrini doğrulamaktadır. Birisi değişik derecelerde virülansa sahip, invaziv bir patojen olan *E. histolytica*, diğeri ise nonpatojen, noninvaziv tür *Entamoeba dispar*'dır^[1-3].

E. histolytica ve *E. dispar*'ın kolon mukozasına adezyonunda rol alan yüzey reseptörleri, galaktoz ve N-asetil-D-galaktozamin (Gal-Gal/Nac) ile inhibe edilebilen lektin yapısındadır. Heterodimerik yapıdaki bu glikoprotein 260 kDa ağırlığındadır. 170 kDa ve 35 kDa ağırlığında, disülfit bağıyla bağlanmış iki alt birimden oluşur. "Galactose-Inhibitable-Adherence-Protein (GIAP)" adı da verilen 170 kDa'lık alt birimin kolon mukusunu aşarak epitel hücrelerine ve konağın inflamasyon hücrelerine yapışmada, hedef memeli hücrelerin lizisinde ve kompleman lizisine dirençte esas rolü üstlendiği tespit edilmiştir^[4-6]. Patojen-invaziv tür *E. histolytica* ve nonpatojen-noninvaziv *E. dispar*'ın kolon mukozasına adezyonunda rol oynayan GIAP'nin farklı antijenik epitoplara sahip olduğu bilinmektedir^[7]. Bu iki tür arasındaki epitop özgüllüğü, ayırıcı tanı için monoklonal antikoların (Mab) kullanıldığı "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" tekniklerinin geliştirilmesinde önemli bir nokta olarak dikkat çekmektedir^[7-9].

Mikroskobik yöntemler ile eş morfolojik yapıya sahip *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ayırt edilememesi, rutin laboratuvarlarda pek çok olgunun invaziv amebiyazis gibi değerlendirilmesine yol açmakta ve böylece çoğu kez gereksiz antiparaziter tedavi uygulanmaktadır. Doğru ve güvenilir sonuca ulaşma isteği, giderek artan sayıda laboratuvarın alternatif tanı yöntemlerini kullanıma koymasında itici bir faktör olmuştur. Bu nedenle dışkıda parazitinin spesifik antijenik yapılarının gösterilmesine dayalı ELISA yönteminin rutin mikroskobik inceleme ile karşılaştırılması; çalışmamızın temel amacını oluşturmaktadır.

MATERYAL ve METOD

Örneklerin Seçimi ve Toplanması

Araştırmamızda Ocak 2000-Temmuz 2000 tarihleri arasında üç farklı gruptan toplanan dışkı örnekleri çalışma kapsamına alınmıştır. Birinci grup Ankara'da bir rehabilitasyon merkezinde yaşayan amebiyazis riski potansiyel olarak yüksek 142 mental retarde bireyden, ikinci grup paraziter hastalık ön tanısı almış, semptomatik veya tedavi sonrası kontrol için başvurmuş 77 bireyden, üçüncü grup ise herhangi bir risk grubuna girmeyen, semptomsuz 34 sağlıklı bireyden oluşmaktadır^[10-12]. Üç grupta da örnekler, araştırma koşullarını kabul eden bireyler arasından rastgele örnekleme yöntemi ile seçilmiştir. Araştırmanın başlangıcında amebiyazis olgu formu oluşturulmuş ve çalışma kapsamına alınan her bireyin demografik bilgileri, amebiyazise özgü semp-

tomların varlığı, altta yatan herhangi bir hastalık veya risk faktörü olup olmadığı sorgulanmıştır. Çalışma kapsamına alınan mental retarde grupta ve sağlıklı grupta yer alan bireylerin amibin morfolojik yapısını bozacak ilaçlar (baryum, kaolin, bizmut, antiasitler, geniş spektrumlu antibiyotikler ve antiprotozoal ilaçlar..) kullanmamış olmasına dikkat edilmiş, idrarla kontamine örnekler incelemeye alınmamıştır.

Örneklerin İncelenmesi

Mental retarde bireylerden alınan örnekler, rehabilitasyon merkezi laboratuvarında tarafımızca değerlendirilmiştir. Parazitoloji laboratuvarımıza başvuran hastaların ve sağlıklı grubun dışkı örnekleri ise parazitoloji laboratuvarımızda incelenmiştir. Her iki laboratuvar ortamında da tüm örnekler gaita pasajını takiben yaklaşık ilk 30 dakika içinde incelemeye alınmıştır. Bütün dışkı örnekleri öncelikle makroskopik olarak değerlendirilip kıvamı, rengi, kan ve mukus içerip içermediği kaydedilmiştir. Ardından pamuksuz eküvyon (tahta çubuk) yardımıyla herhangi bir koruyucu veya fiksatif içermeyen 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine bir miktar örnek konmuş ve ileride ELISA çalışmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Mikroskopik inceleme, serum fizyolojik, D'Antoni iyot ve Loeffler'in metilen mavisi kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan preparatlar X10 ve X40'lık objektiflerle incelenmiştir. Serum fizyolojik ile hazırlanmış preparatlarda lökosit, eritrosit ve hareketli trofozoidlerin varlığı araştırılmıştır. D'Antoni iyot ile *E. histolytica* kistleri tanımlanmış, Loeffler'in metilen mavisi ile lökosit/kist ayrımı yapılmıştır.

Çalışmamızda intestinal amebiyazis tanısında dışkının konvansiyonel mikroskopik incelemesine alternatif olarak, dışkıda antijen saptamaya dayalı ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla iki ayrı ELISA kiti seçilmiştir. Birinci kit (*Entamoeba* CELISA-Screen, Cellabs, AA) *E. histolytica* ve *E. dispar* türlerinde ortak yüzey antijenlerine karşı geliştirilen Mab'lar ile hazırlanmış bir kit olup tarama amaçlıdır. İkinci kit (*Entamoeba* CELISA-Path, Cellabs, AA) ise *E. histolytica* spesifik yüzey adhezinlerine karşı Mab'lar kullanılarak hazırlanmış bir kit olup, morfolojik olarak identik iki türden patojen *E. histolytica* kökenlerinin ayrımı tanısında tercih edilmiştir.

Entamoeba CELISA-Screen (Cellabs, AA) kiti içindeki dilüent %0.02 timerosol ile tamponlanmış bir protein solüsyonudur ve örnekteki adhezini stabilize edecek ve degradasyonu minimize edecek şekilde formüle edilmiştir. Konjugat ise *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın ortak yüzey adhezini için spesifik, "horse-radish peroxidase" ile işaretli Mab'lar içer-

mektedir. Kiti tanımlama bilgilerine göre *Entamoeba* CELISA-Screen ile her çukurda yaklaşık 30 nanogram *E. histolytica*-*E. dispar* adhezinini saptamak mümkündür.

ELISA testi uygulanacağı zaman örnekler -20°C'den çıkarılmış ve oda ısısında bekletilerek çözümleri sağlanmıştır. 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine 400'er µL dilüent konmuştur. Örnek katı ise pamuksuz eküvyonla farklı bölgelerden alınan örnek Eppendorf tüpü içindeki dilüente iyice ezilerek karıştırılmıştır. Sıvı ise süspanse edildikten sonra 400 µL alınarak Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnek tüpleri 10 saniye vortekslenmiştir.

ELISA striplerinin poliklonal antikolar ile kaplanmış çukurlarına birer damla konjugat damlatılmıştır. Birinci çukura 50 µL pozitif kontrol, ikinci çukura 50 µL negatif kontrol (dilüent) diğer çukurlara ise 100 µL dilüe edilmiş örnek konmuştur. Çukurlardaki süspanسیونların tam olarak karışmaları için vibrasyon uygulanmış ve üstleri kapatılarak iki saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda stripler, hazırlanan yıkama solüsyonu ile dört kez yıkanmıştır. Çukurlara önce bir damla substrat A, sonra bir damla substrat B damlatılıp, beş dakika mikropate mikserde karıştırılmıştır. Oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra her çukura bir damla durdurma solüsyonu eklenmiş, takip eden 10 dakika içinde görsel ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrolün renksiz, pozitif kontrolün sarı renkte olması testin doğru çalıştığını göstermiştir. Test örneklerinde değişik tonlarda sarı renk oluşması pozitif sonuç, renksiz olması ise negatif sonuç olarak yorumlanmıştır.

Spektrofotometrik değerlendirme 450 nm dalga boyunda yapılmıştır. Öncelikle negatif kontrolün absorpsiyon değeri belirlenmiştir. Bu değer 0.15 veya altında değilse test geçerli kabul edilmemiş ve yıkama işlemine özen gösterilerek test tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol değerinden, negatif kontrol değeri çıkarıldığında sonuç 0.50 veya üstünde değil ise test yine geçersiz kabul edilip tekrarlanmıştır.

Kitin değerlendirme kriterlerine göre negatif kontrol değeri test örneğinin değerinden çıkarıldığında 0.05 veya üstünde bir sonuç elde ediliyorsa sonuç pozitif kabul edilmiştir. Hesaplanan değer 0.05'in altında ise örnekte *E. histolytica*-*E. dispar* adhezini bulunmadığına karar verilmiştir. *Entamoeba* CELISA-Screen test ile *E. histolytica*-*E. dispar* adhezine sahip olduğu belirlenen örneklerde *E. histolytica*'ya spesifik adhezinlerin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla *Entamoeba* CELISA-Path (Cellabs, AA) kiti kullanılmıştır. Kit içinde konjugat ola-

rak *E. histolytica* adhezine özgül Mab'lar vardır. *Entamoeba* CELISA-Path testinin uygulanışı *Entamoeba* CELISA-Screen teste oldukça benzemektedir. Testin değerlendirilişi, görsel ve spektrofotometrik yorumu da *Entamoeba* CELISA-Screen testte olduğu gibi yapılmıştır.

BULGULAR

Yaş grupları dağılımı incelendiğinde, örneklerin önemli bir yüzdesinin 0-19 yaş arasında (birinci grupta %64.1, ikinci grupta %66.2, üçüncü grupta %79.4) toplandığı görülmektedir (Tablo 1).

Direkt mikroskopik inceleme ile; mental retarde grubun %13.3 (19/142)'ünde, poliklinik grubunun %9.1 (7/77)'inde *E. histolytica*-*E. dispar*'a ait kist ve/veya trofozoidler saptanmıştır (Tablo 2).

Örneklerin *E. histolytica*-*E. dispar* ortak yüzey antijenlerine özgül Mab içeren kit ile test edilmesi sonucu; mental retarde grubun %19.0 (27/142)'unda, poliklinik grubunun %20.7 (16/77)'sinde *E. histolytica*-*E. dispar* pozitif bulunmuştur (her iki grup için sırasıyla duyarlılık %100, %100; özgüllük ise %93.4, %87.1).

ELISA ile ortak yüzey antijeni pozitif bulunan 27 mental retarde grup örneğinin 1 (%3.7)'inde ve 16 parazitoloji laboratuvarı örneğinin yine yalnızca 1 (%6.25)'inde *E. histolytica* spesifik yüzey antijeni varlığı gösterilebilmiştir (Tablo 2).

Sağlıklı bireylerden oluşan grupta yöntemlerin hiçbirisi ile pozitif bulgu saptanmamıştır. Her üç çalışma grubunda mikroskopik inceleme ile diğer parazitler etkenlere ait kist veya yumurtalar da saptanmış olup, dağılımları Tablo 3'te özetlenmiştir.

Diğer parazitler etkenlere ait kist veya yumurtaların tanımlandığı örneklerin hiçbirinde ELISA tarama testi ile *E. histolytica*-*E. dispar* ortak yüzey antijen pozitifliği saptanmamıştır.

Mental retarde grupta yalnızca beş yaşında bir kız çocuğunda amebiyazis ile ilişkilendirilebilecek karın ağrısı, bulantı, kusma, subfebril ateş ve mukuslu dışkılama ile karakterli ishal semptomları kaydedilmiştir. Diğer bireylerin hiçbirinde spesifik semptomlar gözlenmemiştir.

Çalışma kapsamına alınan 77 parazitoloji laboratuvarı olgusunun 45'i asemptomatik iken, 32'sinde

Tablo 1. Mikroskopi ve/veya *Entamoeba* CELISA-Screen test ile *E. histolytica*/*E. dispar* pozitifliği saptanan olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grubu	Mental retarde olgu grubu			Parazitoloji laboratuvarı olgu grubu			Sağlıklı grup		
	n	D.M	ELISA	n	D.M	ELISA	n	D.M	ELISA
• 0-4	1	0	0	3	0	0	2	0	0
• 5-9	16	2	5	11	1	2	6	0	0
• 10-14	28	4	5	12	3	6	9	0	0
• 15-19	46	6	9	25	2	4	10	0	0
• 20-24	35	6	6	8	0	2	5	0	0
• 25-29	13	1	2	7	1	2	2	0	0
• > 30	3	0	0	11	0	0	0	0	0
• Toplam (n)	142	19	27	77	7	16	34	0	0

D.M: Direkt mikroskopi

Tablo 2. Kullanılan yöntemlere göre amip kist ve/veya trofozoidleri ile ortak ve/veya spesifik yüzey antijeni saptanan örneklerin olgu gruplarına göre dağılımları

	Mikroskopi		ELISA-Screen*		ELISA-Path#	
	n	%	n	%	n	%
• Mental retarde grup (n= 142)	19	13.3	27	19.0	1	0.7
• Parazitoloji laboratuvar grubu (n= 77)	7	9.1	16	20.7	1	1.3
• Sağlıklı grup (n= 34)	0	0.0	0	0.0	0	0.0

* Ortak yüzey antijeni,

Spesifik yüzey antijeni

Tablo 3. Mikroskopik incelemede *E. histolytica*/*E. dispar* dışında saptanan diğer parazitler mikroorganizmaların dağılımı

Parazit	Mental retarde olgu grubu (n= 142)	Parazitoloji olgu grubu (n= 77)	Sağlıklı grup (n= 34)
• <i>Entamoeba coli</i>	7	4	2
• <i>Giardia intestinalis</i>	3	3	0
• <i>Enterobius vermicularis</i>	1	1	0
• <i>Taenia saginata</i>	1	1	0
• <i>Blastocystis hominis</i>	1	2	0
• <i>Chilomastix mesneli</i>	0	1	0
• Toplam	13	12	2

çeşitli semptomlar izlenmiştir. Klinik belirtiler nonspesifik olmakla birlikte bu olguların 24'ünde karın ağrısı, 13'ünde ishal, birinde kanlı-mukuslu dışkılama, sekizinde iştahsızlık-halsizlik, yedisinde hazımsızlık, beşinde bulantı, üçünde kilo kaybı kaydedilmiştir.

Entamoeba-CELISA Path testi ile patojen *E. histolytica* infeksiyonu saptanan iki olgudan mental retarde gruptaki bireyin (22 yaşında, erkek) anamnezinde bir özellik bulunmamaktadır; dışkı örneğinin mikroskopik incelemesinde *E. histolytica* kistleri izlenmiştir. Parazitoloji laboratuvar grubunda saptanan olgu ise (29 yaşında, erkek) karın ağrısı, ishal, kanlı-mukuslu dışkılama öyküsü ile başvurmuş olup, dışkı örneğinin mikroskopik değerlendirmesinde *E. histolytica* kist ve trofozoidleri, eritrositler, eritrosit fagosite etmiş trofozoidler ve Charcot-Leyden kristalleri gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Amebiyazisin tanısı genellikle dışkının mikroskopik incelemesinde *E. histolytica*'nın kist ve/veya trofozoid şekillerinin görülmesiyle konulmaktadır. Bugün gelinen noktada intestinal amebiyazisin tanısında iki temel sorun bulunmaktadır: Birincisi, mikroskopik incelemede amip kist ve/veya trofozoidlerinin dışkıdaki lökosit ve makrofajlardan ayırt edilmesindeki güçlüklerdir. İkincisi ise morfolojik olarak identik iki türden klinik açıdan önemli, invaziv patojen tür olan *E. histolytica*'nın, daha yaygın görülen ancak nonpatojen, noninvaziv tür *E. dispar*'dan konvansiyonel yöntemlerle ayırt edilememesidir^[2,3]. Bu nedenler ile pek çok olguya yanlış tanı konmakta ve gereksiz bir şekilde antiparaziter tedavi uygulanmaktadır. Bu durum olguda, ilaca bağlı çok sayıda yan etki oluşması, gereksiz tedavi maliyeti, ilaç rezistansı veya altta yatan başka bir hastalığın atlanması gibi sonuçlar doğurabilmektedir^[2,3].

Mikroskopik incelemedeki duyarlılık sorununun tümü ile aşılabilmesi nedeniyle dışkıda *E. histolytica*'nın antijenlerini belirlemeye yönelik ELISA yöntemlerinin geliştirilmesi tanıda önemli bir adım olarak değerlendirilebilir. Nitekim 1980'li yılların ortalarından bu yana pek çok çalışmada farklı antijenik determinantlara karşı kullanılan Mab'lar ile duyarlılığın ve özgüllüğün %100'e kadar çıkabildiğinin anlaşılması ELISA'nın mikroskopiye alternatif olarak daha güçlü bir şekilde önerilmesine yol açmıştır^[13-23] (Tablo 4). Zaman içinde, mevcut ELISA testleri ile *E. histolytica* ve *E. dispar* ayırımının yapılamaması ve bu nedenle klinik kullanımlarının kısıtlı olduğunun anlaşılması; araştırmacıları spesifik epitoplara arayışına yönlendirmiştir. *E. histolytica* spesifik antijenleri için fare Mab'larının üretilmesi ve GIAP'nin epitop haritasının çıkarılması ile geliştirilen ELISA testleri kullanıma girmiştir^[9].

İlk çalışmalardan biri Haque ve arkadaşlarına ait olup; patojen *E. histolytica*'nın spesifik epitoplara uygun Mab'ların kullanıldığı ELISA kiti ile 74 hastanın dışkı örneğinde direkt mikroskopi, kültür ve ELISA karşılaştırılmış; ELISA'nın duyarlılığı %100, özgüllüğü %97 olarak bulunmuştur^[13].

Tarama amaçlı ELISA kitinin ve patojen kökenler için spesifik antijenik determinantları saptayan bir diğer ELISA kitinin ardışık kullanıldığı bir çalışmada ise Haque ve arkadaşları diyareli 202 olguya ait dışkı örneklerinde mikroskopik inceleme, kültür ve zimodem analizinin ELISA ile karşılaştırılmasını sağlamışlardır^[24]. Çalışmanın sonunda mikroskopik incelemenin kültüre göre duyarlılığı %60, özgüllüğü %79 bulunmuşken, ortak antijenleri saptayan tarama amaçlı ELISA kiti kültürle kıyaslandığında duyarlılığı %95, özgüllüğü %99 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada *E. histolytica* ve *E. dispar* infeksiyonları

Tablo 4. 1985'ten 2000'e uzanan zaman diliminde yapılan çeşitli araştırmalarda, dışkıda amip antijenlerini veya enzimlerini saptayan ELISA yöntemlerinin direkt mikroskopik incelemeye göre duyarlılığı ve özgüllüğü

Referans	Örnek (n)	Yöntemler	ELISA kiti	Kullanılan ELISA kitinin özelliği	ELISA'nın mikroskopiye göre	
					D (%)	Ö (%)
• Ungar 1985 ^[14]	186	M, ELISA	in-house	Mab, Pab	82.0	98.0
• Kabil 1990 ^[15]	40	M, ELISA	veri yok	Mab, Pab	90.0	85.0
• Merino 1990 ^[16]	150	M, ELISA	in-house	Mab, Pab	99.0	100.0
• Luaces 1992 ^[17]	200	M, ELISA	in-house	CP-anti-histolysain Ab	87.5	100.0
• Haque 1993 ^[13]	74	M, kültür, ELISA	in-house	GIAP-Mab, Pab	100.0	97.0
• Haque 1994 ^[18]	82	M, kültür, ELISA	in-house	GIAP-epitop3-4 Mab, Pab	96.0	93.0
• Sharma 1994 ^[19]	150	M, ELISA	in-house	14-21kDa Ag-Mab	100.0	93.0
• Urdenata 1996 ^[20]	177	M, FEK, ELISA	in-house	96 kDa Ag-Mab	94.4	98.3
• Bhaskar 1996 ^[21]	151	M, FEK, ELISA	in-house	14 kDa Ag-AC55 Mab	97.6	92.6
• Jelinak 1996 ^[22]	577	M, FEK, ELISA	Prospect Alexon, USA	HK-9 izolati-Mab	90.3	97.7
• Büyükbaba 1997 ^[23]	74	M, FEK, ELISA	Alexon, USA	GIAP-Mab	100.0	79.0
• Bu çalışma 2000	142	M, ELISA	CELISA-Screen Cellabs, AA	<i>E. histolytica-dispar</i> ortak Ag-Mab	100.0	93.4

M: Mikroskopi, FEK: Formol eter konsantrasyon, GIAP: "Galactose-Inhibitible-Adherence-Protein", Mab: Monoklonal antikor, Pab: Poliklonal antikor, CP: "Cysteine proteinase", Ag: Antijen, Ab: Antikor, D: Duyarlılık, Ö: Özgüllük.

nın ayrımı için, GIAP-patojen epitoplarna spesifik ELISA testi kullanılmış; sonuçlar zimodem analizi ile kıyaslandığında duyarlılık %95, özgüllük %93 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar *E. histolytica*-*E. dispar* ortak antijenlerini saptayan ELISA kitinin mikroskopik incelemeden daha duyarlı ve özgül, spesifik *E. histolytica* antijenlerini saptayan ELISA kitinin ise zimodem analizi kadar güvenilir, daha hızlı ve kolay uygulanabilir olduğu sonucuna varmışlardır^[24].

Bizim çalışmamızda; mikroskopik inceleme ile amip kist ve/veya trofozoidleri gözlenen örneklerin tümünde aynı zamanda *Entamoeba* CELISA-Screen test ile ortak yüzey antijenleri pozitif bulunmuştur. Ayrıca mikroskopik incelemede amip elemanları gözlenmeyen bazı örneklerde de *Entamoeba* CELISA-Screen test ile ortak yüzey antijenleri saptanmıştır (Tablo 1). İlk akla gelen olasılık; dışkıda kist ve/veya trofozoidlerin az sayıda olduğu durumlarda mikroskopik incelemede rastlanmayan amip elemanlarının ELISA ile saptanmış olabileceğidir. Öte yandan, mikroskopik incelemede amibin karakteristik morfolojik yapısı gözlenmese bile çözünür antijenik yapıların dışkıda belli bir süre atılabildiği bilinmektedir. Ayrıca yanlış pozitiflik olasılığı da göz önüne alınabilir. Çünkü her ne kadar üretici firma (Cellabs, AA) refe-

rans gösterdiği araştırmalarda kitin diğer parazitler etkenler ile çapraz reaksiyon vermediğini belirtiyorsa da bakteriyel ajanlar ve konak hücreleri ile oluşabilecek çapraz reaksiyonlar hakkında ayrıntılı bilgiye ulaşamamıştır.

Ortak yüzey antijenlerini içeren (*Entamoeba* CELISA-Screen test pozitif) olgulardan hangilerinin patojen, invaziv köken *E. histolytica*'ya ait olduğunu anlamak için uygulanan *Entamoeba* CELISA-Path testi sonucunda hem mental retarde olgu grubunda hem de parazitoloji laboratuvarı grubunda birer olguda (sırasıyla 1/27 ve 1/16) pozitiflik saptanmıştır (Tablo 2). Kitin tanıtım bilgilerine göre *Entamoeba* CELISA-Path testi ile her çukurda yaklaşık 10 nanogram kadar küçük miktarlardaki *E. histolytica* spesifik adhezini saptanmıştır. Patojen *E. histolytica* infeksiyonu saptanan iki olgudan mental retarde gruptaki bireyin (22 yaşında, erkek) anamnezinde bir özellik bulunmamaktadır, ancak dışkı örneğinin mikroskopik incelemesinde *E. histolytica* kistleri izlenmiştir. Amebiyazise yönelik herhangi bir semptomun olmayışı bu olgunun asemptomatik kist taşıyıcısı olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda da asemptomatik bireylerde %1 oranında patojen *E. histolytica* gözlenmiştir^[25]. *E. histolytica* infeksiyonları yönünden potan-

siyel bir rezervuar olan bu bireyin her gün binlerce hatta milyonlarca dört nükleuslu olgun kist çıkarabileceği ve toplu yaşanan birimi infekte edebileceği hatırlanarak, kurum doktorları uyarılmış ve spesifik antiparaziter tedavi önerilmiştir. Çünkü yapılan pek çok çalışmada *E. histolytica*'nın patojen zimodemleri ile infekte asemptomatik kist taşıyıcılarının tedavisinin, invaziv amebiyazisli hastaların tedavisi kadar önemli ve gerekli olduğu vurgulanmış, patojen zimodem taşıyıcıları ve invaziv amebiyazisliyle ilişki içinde olanların en az altı ay süre ile izleme alınması tavsiye edilmiştir^[26].

Parazitoloji laboratuvarı grubunda *Entamoeba* CELISA-Path testi ile patojen *E. histolytica* infeksiyonu saptanan olgu ise (29 yaşında, erkek); karın ağrısı, ishal, kanlı-mukuslu dışkılama öyküsü ile başvurmuş olup dışkı örneğinin mikroskopik incelemesinde *E. histolytica* kist ve trofozoidleri, eritrositler, eritrosit fagosite etmiş trofozoidler ve Charcot-Leyden kristalleri kaydedilmiştir. Klinik rutin laboratuvarlarda amipli dizanterinin tanısında en güvenilir bulgu mikroskopik olarak eritrofagositik trofozoidleri görmektir. Gonzalez-Ruiz ve arkadaşları klinik laboratuvarlarda amipli dizanterinin erken tanısında en güvenilir yöntemin mikroskopik olarak eritrofagositik trofozoidleri görmek olduğunu, bunun duyarlılığının %96 ve özgüllüğünün %100 olduğunu belirtmişlerdir^[25].

Bizim çalışmamızda; semptomatik bireylerin oluşturduğu parazitoloji laboratuvar grubunda *Entamoeba* CELISA-Path testi ile invaziv infeksiyon oranının yalnızca %1.3 olduğu anlaşılmıştır. Buna karşın aynı grupta amebiyazis prevalansı mikroskopik inceleme ile %9.1, *Entamoeba* CELISA-Screen test ile %20.7 olarak değerlendirilmiştir. Asemptomatik, ancak amebiyazis için potansiyel bir risk grubu olan mental retarde bireylerde ise, patojen ve nonpatojen köken ayrımının yapılmadığı yöntemlerle (mikroskopik inceleme ve *Entamoeba* CELISA-Screen) amebiyazis prevalansı sırası ile %13.3 ve %19.0 olarak saptanmışken, bu oranlar patojen *E. histolytica* için spesifik *Entamoeba* CELISA-Path testi ile %0.7 olarak bulunmuştur. Mental retarde bireyler ve psikiyatrik hastalar üzerinde yapılan benzer epidemiyolojik çalışmalarda da *E. histolytica*-*E. dispar*'la infeksiyon prevalansının %7-30 arasında değiştiği gözlenmektedir^[10-12]. Sargeant ve arkadaşlarının 174 psikiyatrik hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada amebiyazis prevalansı %7 olarak bulunmuştur. Ancak izoenzim analizi ile bunların hepsinin nonpatojen zimodemli izolatlar olduğu gözlenmiştir^[27].

Özet olarak bu çalışmada; intestinal amebiyazis etkenlerinin saptanmasında mikroskopik inceleme ve ELISA yöntemleri karşılaştırılmıştır. Mikroskopik inceleme ile değişik gruplardaki örneklerin %9.1-13.3'ünde amip elemanları gözlenirken, bu oranın ortak amip yüzey antijenlerini saptayan ELISA ile %19.0-20.7'ye yükseldiği dikkati çekmektedir. Buna göre *E. histolytica*-*E. dispar* paraziter komponentlerinin tespit edilmesinde ELISA'nın duyarlılığının çok yüksek olduğu (%100) görülmektedir. Ancak gerek mikroskopide gerekse tarama amaçlı ELISA'da olguların ne kadarının patojen-invaziv köken *E. histolytica*'ya ait komponentleri taşıdığı söylenemediğinden, spesifik tanı için diğer bir ELISA kiti ile örnekler incelendiğinde gerçek prevalansın %0.7-1.3 kadar (yaklaşık 15-30 kez) düşük olduğu anlaşılmıştır. Bu verilerin rutin laboratuvar çalışmalarımıza projeksiyonu yapılacak olursa; her yıl parazitöz semptomları ile laboratuvarımıza başvuran yaklaşık 2000 olgudan en az 180 kadarının mikroskopide amebiyazis olarak tanı alması beklenir. Ancak bunun yalnızca 20-25'inin gerçek invaziv *E. histolytica* infeksiyonu olma olasılığı vardır. Dolayısı ile muhtemelen pek çok rutin laboratuvar da olduğu gibi her 2000 olgudan 160 kadarı yanlış tanı almakta ve tedavi görmektedir. Bu tahmini değerlendirme bile spesifik etken tanısının ne derece önemli olduğuna yeterince işaret edebilir.

Sonuç olarak, günümüzde intestinal amebiyazis tanısında laboratuvar, klinik öykü ve epidemiyolojik profili destekleyici oldukça önemli bir role sahiptir. Direkt mikroskopik inceleme, dışkıda paraziter antijenleri saptayan ELISA yöntemlerine göre çok daha ucuz olmasına karşın yetersiz bir yöntemdir; subjektif olması ve eş morfolojik yapıdaki patojen ve nonpatojen tür ayrımını yapamaması nedeniyle artık güvenilirliğini kaybetmektedir. Yüksek düzeyde duyarlı ve özgül bir diagnostik teste acilen ihtiyaç duyulduğu açıktır. Öyle ki bu test; gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak kullanılabilir, hızlı, patojen-nonpatojen tür ayrımı yapabilen, akut ve geçirilmiş infeksiyonu ayırt edebilen, tedavinin monitörizasyonunda yararlanılabilecek, detaylı mikroskopik incelemeye ihtiyaç duymayan, subjektif değerlendirmelerden doğacak hataları minimize edebilen, deneyimli bir mikrobiyolog/parazitolog gerektirmeyen, geniş kitle taramalarında etkili bir şekilde kullanılabilir bir yöntem olsun. Şu anki teknolojik gelişmeler ile bu yöntemin dışkıda *E. histolytica*'nın antijenlerini saptamaya yönelik spesifik Mab'ların kullanıldığı ELISA olduğu söylenilebilir.

KAYNAKLAR

1. McKerrrow JH. Amebiasis: A new focus on an old infection. *Parasitol Today* 1994;10:165-6.
2. Petri WA. Recent advances in amebiasis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:1-37.
3. Li E, Stanley SL. Protozoa. *Gastro Clin North Am* 1996;25:471-93.
4. Ravdin JI. *Entamoeba histolytica*: From adherence to enteropathy. *J Infect Dis* 1989;159:420-9.
5. Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:318-31.
6. Petri WA, Chapman MD, Snodgrass T, Mann B, Broman J, Ravdin JI. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamin-inhibitable adherence lectin of *E. histolytica*. *J Biol Chem* 1989;264:3007-12.
7. Petri WA, Jackson TFGH, Gathiram V. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990;58:1802-6.
8. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1913) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Euk Microbiol* 1993;40:340-4.
9. Jackson TFGH, Ravdin JI. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections. *Parasitology Today* 1996;12:406-9.
10. Cheng HS, Wang LC. Amebiasis among institutionalized psychiatric patients in Taiwan. *Epidemiol Infect* 1999;122:317-22.
11. Thacker SB, Simpson S, Gordon TJ, Wolfe M, Kimball AM. Parasitic diseases control in a residential facility for the mentally retarded. *Am J Public Health* 1979;69:1279-81.
12. Sexton DJ, Krogstad DJ, Spencer HC, et al. Amebiasis in a mental institution: Serologic and epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 1974;100:414-23.
13. Haque R, Kress K, Wood S, et al. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J Infect Dis* 1993;167:247-9.
14. Ungar B, Yolken RH, Quinn TC. Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:465-72.
15. Kabil SM, Hassan MM, Atta M, Gysha O. ELISA in detection of *Entamoeba histolytica* antigens in stools. *J Egypt Soc Parasitol* 1990;20:673-6.
16. Merino E, Glender W, Muro R, Ortiz LO. Evaluation of the ELISA test for detection of *E. histolytica* feces. *J Clinical Lab Analysis* 1990;4:39-42.
17. Luaces AL, Pico T, Barrett AJ. The enzyme test: Detection of intestinal *E. histolytica* infection by immunoenzymatic detection of histolysain. *Parasitology* 1992;105:203-5.
18. Haque R, Neville LM, Wood S, Petri WA. Short report: Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* directly in stool. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:595-6.
19. Sharma M, Reed SL, Singh S, Talwar GP, Ghos S. Characterization of monoclonal antibodies to conserved antigens of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and development of a stool ELISA. *Hybridoma* 1994;13:123-30.
20. Urdenata H, Rangel A, Martins MS, Munoz JF, Hernandez M. *Entamoeba histolytica*: Fecal antigen capture immunoassay for the diagnosis of enteric amebiasis by monoclonal antibody. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996;38:39-44.
21. Bhaskar S, Singh S, Sharma M. A single step immunochromatographic test for the detection of *E. histolytica* antigens in stool samples. *J Immunological Methods* 1996;196:193-8.
22. Jelinek T, Peyerl G, Löscher T, Nothdurf D. Evaluation of an antigen capture enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:752-5.
23. Büyükbaba Ö, Babaoğlu G, Katrancı H, Uyar A, Kırkonyun H, Büget E. Dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica* "galactose-inhibitable-adherence protein" antijeninin ELISA ile aranması ve sonuçların mikroskopi ile karşılaştırılması. *Klinik Dergisi* 1997;10:57-9.
24. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA. Rapid diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 1995;33:2558-61.
25. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Aguirre A. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J Clin Pathol* 1994;47:236-9.
26. Gathiram V, Jackson TFGH. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 1987;72:669-72.
27. Sargeant PG, Williams JE. A study of intestinal protozoa including non-pathogenic *Entamoeba histolytica* from patients in a group of mental hospitals. *Am J Public Health* 1982;72:178-80.

Yazışma Adresi:

Uzm. Dr. Selin NAR

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı

Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü

AB Blok

06100, Sıhhiye-ANKARA

e-mail: selinnar@hotmail.com

rssalgin@saglik.gov.tr

Makalenin Geliş Tarihi: 28.11.2002

Kabul Tarihi: 05.05.2003