

# İshalli Hastaların Dışkı Örneklerinde *Entamoeba histolytica*'nın Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Değerlendirilmesi

## Evaluation of the Methods Used for the Detection of *Entamoeba histolytica* in Stool Samples of Patients with Diarrhea

Sema TORTOP<sup>1</sup>(ID), Özlem KOYUNCU ÖZYURT<sup>2</sup>(ID), Gözde ÖNGÜT<sup>2</sup>(ID),  
Hatice YAZISIZ<sup>2</sup>(ID), Feryal ÖZTÜRK ERYİĞİT<sup>3</sup>(ID), Betil ÖZHAK<sup>2</sup>(ID),  
Levent DÖNMEZ<sup>2</sup>(ID), Ali Osman ŞEKERCİOĞLU<sup>4</sup>(ID), Dilara ÖĞÜNÇ<sup>2</sup>(ID)

<sup>1</sup> Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kütahya.

<sup>1</sup> Kütahya Health Sciences University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kütahya, Türkiye.

<sup>2</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>2</sup> Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Türkiye.

<sup>3</sup> Sağlık Bakanlığı Isparta Şehir Hastanesi, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı, Isparta.

<sup>3</sup> Ministry of Health Isparta City Hospital, Medical Parasitology Laboratory, Isparta, Türkiye.

<sup>4</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Antalya.

<sup>4</sup> University of Health Sciences Antalya Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Antalya, Türkiye.

\*Bu çalışma, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2016, Antalya)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur. Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2015-1141).

**Makale Atfı:** Tortop S, Koyuncu Özyurt Ö, Öngüt G, Yazısız H, Öztürk Eryiğit F, Özihak B ve ark. İshalli hastaların dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2022;56(4):682-691.

### ÖZ

Amipli dizanteri (amibiyaz), *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu paraziter bir enfeksiyondur. İnva-  
ziv amibiyaz tanısı geleneksel olarak dışkı örneklerinin direkt ve boyalı mikroskopik incelemesine dayanır.  
Dışkı mikroskopisinin duyarlılığının düşük olması ve *E.histolytica* kist ve trofozoitlerinin dışkıda bulunan  
lökosit, makrofaj gibi hücreler ve patojen olmayan *Entamoeba* türlerinden mikroskopi ile ayrımının zor  
olması nedeniyle, dışkıda *E.histolytica*'ya özgü antijen varlığını araştırma enzimle linked immunosorbent  
assay (ELISA) testleri ve polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] gibi daha duyarlı  
ve özgül tanı yöntemleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, ishali olan ve bağırsak  
amibiyazı ön/ayırıcı tanısı için *E.histolytica* araştırılması istenen hastaların dışkı örneklerinde, direkt ve ka-  
lıcı boyalı mikroskopik inceleme, dışkıda *E.histolytica* adezin antijeni ELISA ve gerçek zamanlı PCR temelli  
BD Max Enteric Parasite Panel (BD Max EPP) testlerinin çalışılması ve *E.histolytica*'nın saptanmasında bu  
testlerin tanı değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kanlı ve/veya mukuslu, şekilsiz toplam 546 dışkı  
örneği çalışmaya alınmıştır. Bu örneklerde direkt ve kalıcı boyalı mikroskopi, *E.histolytica* adezin antijeni  
ELISA ve BD Max EPP PCR ile *E.histolytica* varlığı araştırılmıştır. Direkt mikroskopik inceleme ile örneklerin  
%36.3'ünde şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüştür. Bu örneklerle trik-

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Gözde Öngüt, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 07070,  
Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 242 249 69 12, **E-posta (E-mail):** gongut@akdeniz.edu.tr

rom boyama yapılmış ve 49 örnek *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti varlığı açısından şüpheli bulunmuştur. Trikróm boyama yönteminin uygulanmasıyla direkt mikroskopi ile şüpheli bulunan örneklerin %75.2'sinde *E.histolytica* ve diğer *Entamoeba* türlerinin varlığı dışlanmıştır. Trikróm boyama ile şüpheli bulunan örneklerde BD Max EPP PCR ve *E.histolytica* adezin antijeni ELISA testleri çalışılmıştır. Örneklerin hiçbirinde *E.histolytica* adezin antijeni pozitifliği saptanmamıştır. PCR yöntemiyle 49 örnekten 44'ü negatif bulunmuş, beş örnekte geçersiz test sonucu elde edilmiştir. Çalışmada, hasta popülasyonunda *E.histolytica* saptanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, *E.histolytica*'nın saptanmasında yalnızca mikroskopik incelemenin yeterli olmadığını göstermektedir. Sonuç olarak, amibiyaz tanısında *E.histolytica*'ya özgü antijen aranması veya PCR gibi daha duyarlı ve özgül, aynı zamanda hızlı bir tanı testinin kullanılması gerektiği, sadece mikroskopik inceleme ile sonuç verilmesinin hatalı taniya ve gereksiz tedaviye neden olacağı düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Amibiyaz; BD Max Enteric Parasite Panel; *Entamoeba histolytica* adezin antijeni.

## ABSTRACT

Amoebic dysentery (amebiasis) is a parasitic infection caused by *Entamoeba histolytica*. The diagnosis of invasive amebiasis has traditionally been based on direct and stained microscopic examination of stool samples. Stool microscopy exhibits low sensitivity and it is difficult to distinguish *E.histolytica* cysts and trophozoites from cells such as leukocytes, macrophages and non-pathogenic *Entamoeba* species in the stool by microscopy. Therefore more sensitive and specific diagnostic methods such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) tests which investigate the presence of *E.histolytica*-specific antigen in stool, and polymerase chain reaction (PCR) are being widely used. In this study it was aimed to study stool samples of the patients who applied with the clinical signs of amebiasis by using direct and permanent stained microscopy, *E.histolytica* adhesin antigen ELISA test and real-time PCR-based BD Max Enteric Parasite Panel (BD Max EPP) test and to evaluate the diagnostic values of these tests. A total of 546 faecal samples with blood and/or mucus were analyzed in the study. In these samples, the presence of *E.histolytica* was investigated by direct and permanent stained microscopy, *E.histolytica* adhesin antigen ELISA and BD Max EPP PCR. Of the samples 36.3% were suspected to contain *E.histolytica/dispar/moshkovskii* cyst and/or trophozoite by direct microscopic examination. Trichrome staining was performed on these samples and 49 samples were found suspicious for the presence of *E.histolytica/dispar/moshkovskii* cysts and/or trophozoites. The presence of *E.histolytica* and other *Entamoeba* species was not confirmed in 75.2% of the samples. BD Max EPP PCR and *E.histolytica* adhesin antigen ELISA tests were studied in 49 faecal samples that were suspected by trichrome staining. None of these samples were positive by ELISA. Forty-four samples were negative by PCR and invalid test results were obtained in five samples. In this study, *E.histolytica* was not detected in the patient population. The results of this study showed that microscopic examination alone is not sufficient for the detection of *E.histolytica*. It is concluded that it is necessary to use a more sensitive and specific also rapid diagnostic test such as *E.histolytica*-specific antigen detection test or PCR in the diagnosis of amebiasis to avoid misdiagnosis and unnecessary treatment of patients.

**Keywords:** Amebiasis; BD Max Enteric Parasite Panel, *Entamoeba histolytica* adhesin antigen.

## GİRİŞ

Amipli dizanteri (amibiyaz) *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu, tüm dünyada yaygın olarak görülen paraziter bir hastalıktır. Tropikal ve ılıman tüm bölgelerde endemik olmakla birlikte, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, sosyoekonomik durumu kötü, hijyen alışkanlıkları yetersiz kişilerde daha sık görülmektedir<sup>1</sup>. Gelişmiş ülkelerde ise amibiyaz genellikle endemik bölgelerden gelen göçmenlerde ve endemik bölgelere seyahat edenlerde görülür<sup>2</sup>.

Amipli dizanteri tanısında; mikroskopi, antijen aranması, moleküler testler ve seroloji dahil olmak üzere çeşitli tanı yöntemleri kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan tanı

yöntemi geleneksel direkt ve boyalı mikroskopik incelemeler<sup>3</sup>. İleri biyokimyasal, immünolojik ve genetik bilgilerin elde edilmesiyle, *E.histolytica*'dan morfolojik olarak ayırt edilemeyen *E.dispar*, *E.moshkovskii* ve *E.bangladeshi* adlı türlerin varlığı ortaya çıkmıştır. Bu türlerden *E.moshkovskii* ishale neden olabilirken diğer türler patojen kabul edilmemektedir. Günümüzde, *E.histolytica*'nın diğer *Entamoeba* türlerinden ayırımında yetersiz kalması nedeniyle, tanıda mikroskopinin özellikle diğer tanı yöntemlerine erişme olanağının varlığında, tek başına kullanılmaması önerilmektedir<sup>4,5</sup>. Dışkıda *E.histolytica* antijeni saptanmasına yönelik olarak geliştirilen ticari enzim immünoassay testleri, uygulanması kolay, hızlı sonuç veren testler olmakla birlikte, özellikle endemik olmayan bölgelerde düşük duyarlılığa sahiptir. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT), mikroskopi ve kültür temelli yöntemlerden daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları sebebiyle son yıllarda yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar. *E.histolytica*'nın genetik materyalini tespit eden polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)], yüksek duyarlılığı nedeniyle amibiyaz tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. PCR testleri, kısa sürede sonuç verme, otomatize sistemlerin kullanılmasına bağlı olarak laboratuvar iş yükü ve kontaminasyon riskinin azalması gibi avantajlarının yanında, birden fazla enterik patojeni aynı anda tespit eden, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi [U.S. Food and Drug Administration (FDA)] onaylı hazır ticari gastrointestinal panellerin kullanıma sunulması ile kolay erişilebilir hale gelmiştir. PCR kullanımı aynı zamanda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından da desteklenmektedir ancak teknik uzmanlık gereksinimi ve yüksek maliyeti, sınırlı kaynakları olan laboratuvarlarda kullanımını kısıtlamaktadır<sup>5</sup>. Antikor saptanmasına yönelik serolojik testler, amibiyaz tanısında dışkı incelemesine ek olarak, özellikle bağırsak dışı amibiyaz tanısında yardımcı testlerdir. Tedavi sonrası antikor yanıtının uzun yıllar saptanabilir olması nedeniyle serolojik testlerin, özellikle endemik bölgelerde, aktif enfeksiyonun geçirilmiş enfeksiyondan güvenilir olarak ayırt edilmesinde yararı sınırlıdır<sup>6,7</sup>. Ülkemizde *E.histolytica/dispar* sıklığı kullanılan yöntemlere ve coğrafi bölgelere göre değişmek üzere, 0 ile %29.5 arasında bildirilmektedir<sup>8-13</sup>.

Bu çalışmada ishali olan ve bağırsak amibiyazı ön/ayırıcı tanısı için *E.histolytica* araştırılması istenen hastaların dışkı örneklerinde, direkt ve kalıcı boyalı mikroskopik inceleme, dışkıda *E.histolytica* adezin antijeni saptanmasına yönelik enzyme linked immüno-sorbent assay (ELISA) testi, *Entamoeba* CELISA Path (Cellabs, Avustralya) ve gerçek zamanlı PCR temelli BD Max Enteric Parasite Panel (BD Max EPP) testlerinin çalışılması ve *E.histolytica*'nın saptanmasında bu testlerin tanı değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 09.09.2015 ve Karar No: 191).

Çalışma sürecinde ishal şikayeti ile başvuran ve bağırsak amibiyazı ön/ayırıcı tanısı için *E.histolytica* araştırılması istenen hastalarda, literatür verilerine göre bilinen pozitiflik oranı %7 olarak kabul edildiğinde, çalışmada %4-10 arasında bir orana ulaşılacağı düşünüülerek, %95 güvenilirlik ile 630 örnek alınması planlandı. Olanaklar dahilinde, Akdeniz Üniversitesi Hastanesinde çeşitli servis ve polikliniklerde izlenen, ishali olan hastalardan

*E.histolytica* araştırılması istemi ile laboratuvara gönderilen kanlı ve/veya mukuslu, şekilsiz toplam 546 dışkı örneği çalışmaya alındı.

Bu örneklerde direkt ve kalıcı boyalı mikroskopi, *E.histolytica* adezin antijeni ELISA ve BD Max EPP PCR ile *E.histolytica* varlığı araştırıldı.

### **Direkt ve Kalıcı Boyalı Mikroskopik İnceleme**

Laboratuvara ulaşan dışkı örneklerinden mikroskopik değerlendirme için iki adet lama yayma hazırlandı. Bir lam örneği serum fizyolojik ile diğeri lugol ile hazırlanarak x400 büyütmede incelendi. Şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist/trofozoiti görülen dışkı örneklerinden yayma preparat hazırlanarak Wheatley'in trikrom boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda x1000 büyütmede incelendi.

### **Dışkıda *E.histolytica* Adezin Antijeni Saptamaya Yönelik ELISA Testi**

Trikrom boyama sonucunda şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist/trofozoiti görülen dışkı örneklerinde *E.histolytica* antijeni araştırılması için *Entamoeba* CELISA Path (Cellabs, Avustralya) ticari kiti kullanıldı. *Entamoeba* CELISA Path, dışkı örneklerinde *E.histolytica*'ya özgü adezin antijenini tespit eden bir enzim immünoassay kitidir. Test üretici firmanın önerilerine uygun şekilde çalışıldı.

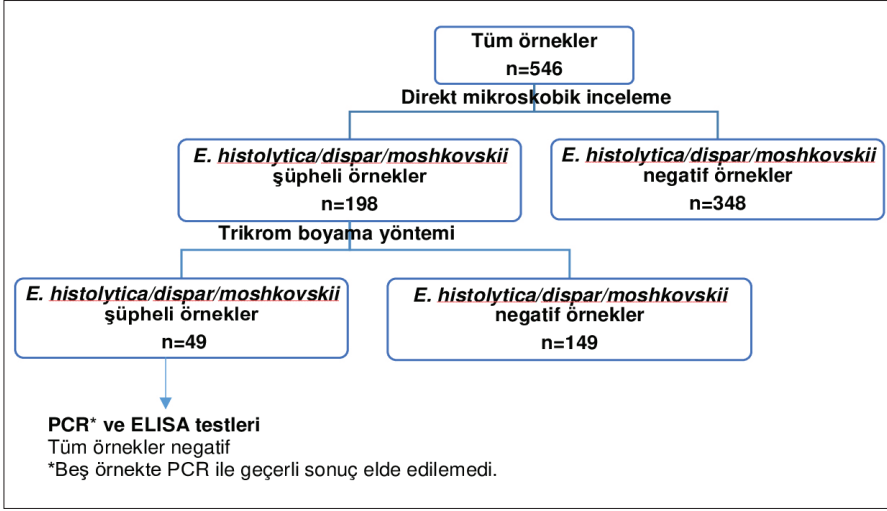
### **PCR-BD Max EPP**

Trikrom boyama sonucunda şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist/trofozoiti görülen dışkı örnekleri BD Max EPP (Becton Dickinson, ABD) ile çalışıldı. Bu test ile taze veya formalin ile fikse edilmiş dışkı örneklerinde direkt ve kalitatif olarak üç farklı enterik parazitin genetik materyali (*Giardia lamblia*-SSU rRNA, *Entamoeba histolytica*-SSU rRNA, *Cryptosporidium hominis* ve *Cryptosporidium parvum*-*Cryptosporidium*-özümlü DNA parçacığı) gerçek zamanlı PCR [real-time PCR (Rt-PCR)] kullanılarak saptanmaktadır. Testler üretici firmanın önerilerine uygun şekilde çalışıldı; çalışma sonunda, BD MAX sistemi yazılım programı tarafından hedef ve internal kontrol amplifikasyonu temel alınarak otomatik olarak yorumlanan ve negatif, pozitif ve geçersiz sonuç şeklinde elde edilen test sonuçları değerlendirildi.

### **BULGULAR**

Çalışmaya alınan örneklerin 257 (%47)'sinin kadın, 289 (%53)'ünün erkek hastalar olduğu saptanmıştır. Hastaların yaş ortalaması  $23.77 \pm 24.05$  olarak bulunmuştur. En küçük hasta 0, en büyük hasta 92 yaşında belirlenmiştir. Hastaların %53'ünü çocuk yaş grubu oluşturmuştur. Çocuk hastaların yaş ortalaması  $4.62 \pm 4.63$  olarak bulunmuştur.

Direkt mikroskopik inceleme ile örneklerin 198 (%36.3)'inde şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüş ve bu örnekler trikrom boyama yapılarak incelenmiştir. Trikrom boyama yapılan 198 örneğin 49 (%24.7)'unda şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti, üç örnekte *Blastocystis* spp. kistleri, iki örnekte *Entamoeba coli* kistleri, bir örnekte *Entamoeba hartmanni* kistleri, bir örnekte de *Blastocystis* spp. ve *E.coli* kistleri bir arada görülmüştür.



Şekil 1. Test akış ve sonuç şeması.

Trikrom boyama yöntemi ile *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti açısından şüpheli bulunan 49 örnekte BD Max EPP PCR ve dışkıda *E. histolytica*'ya özgü adezin antijeni varlığını araştıran ELISA testi çalışılmıştır. BD Max EPP ile örneklerin 44'ü negatif bulunmuştur. Üç örnekte PCR inhibitörü nedeniyle, iki örnekte ise sistem hatasına bağlı olarak geçerli sonuç elde edilememiştir. Örneklerin hiçbirinde *E. histolytica* adezin antijeni pozitifliği saptanmamıştır. Çalışmaya ait test akış ve sonuç şeması Şekil 1'de gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada PCR ve antijen pozitiflik oranı %4-10 olarak öngörülmesine rağmen, PCR ve antijen testi ile pozitif örnek saptanmadığı için geçerlilik analizi yapılmamıştır.

## TARTIŞMA

Geçmişteki prevalans çalışmalarının dışkı mikroskopisine dayalı olması, bağırsak amibi-yazının gerçek prevalansının belirlenmesini güçleştirmektedir. Dışkı mikroskopisinin düşük duyarlılığı, *E. histolytica* kist ve trofozoitlerinin dışkıda bulunan lökositler, makrofajlar ve diğer *Entamoeba* türleri ile morfolojik benzerliği göz önüne alındığında, mikroskopik incelemeye dayalı tanı, enfeksiyon oranlarının olduğundan eksik ya da fazla olarak bildirilmesine yol açmaktadır<sup>14</sup>. *E. histolytica* ile morfolojik olarak benzer olan *Entamoeba* türlerinin tanımlanmasından sonra, daha duyarlı ve özgül tanı yöntemleri kullanılarak *E. histolytica* enfeksiyonlarının gerçek sıklığının araştırılması mümkün olmaktadır<sup>15,16</sup>.

Ülkemizde farklı hasta gruplarını içeren çalışmalarda, direkt ve/veya kalıcı boyalı mikroskopik inceleme ile *E. histolytica/dispar* sıklığı %0-26.4 olarak bildirilmiştir<sup>8-13</sup>. Çalışmada örneklerin %36.3'ünde direkt mikroskopik inceleme ile şüpheli *E. histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülmüştür. Trikróm boyama yönteminin uygulanma-

siyla direkt mikroskopi ile şüpheli bulunan örneklerin %75.2'sinde *E.histolytica* ve diğer *Entamoeba* türlerinin varlığı dışlanmıştır. Direkt mikroskopinin duyarlılığı örnek alınımının uygunluğu, örnek sayısı ve incelemeyi yapan kişinin deneyiminden etkilenmektedir. Haque ve arkadaşları<sup>17</sup>, direkt mikroskopinin duyarlılığını %60, özgüllüğünü %79 olarak bulmuşlardır. Brezilya'da amibiyaz prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, direkt mikroskopi ile *E.histolytica/E.dispar* ELISA testi karşılaştırılmış, mikroskopinin duyarlılığı %20, özgüllüğü %97 olarak bildirilmiştir<sup>15</sup>. Araştırmacılar mikroskopinin duyarlılığının düşük olmasının, çalışmaya alınan kişilerden tek bir dışkı örneği toplanmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmada trikrom boyama yöntemi ile şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülen örneklerde ELISA testi ile *E.histolytica* adezin antijeni araştırılmış ve tümü negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara benzer şekilde, Brezilya'da yapılan bir çalışmada, iki ile 10 yaş arası çocuklardan alınan toplam 1195 dışkı örneğinin %46.3'ünde direkt mikroskopi ile *E.histolytica/dispar* görülürken, hiçbirinde ELISA ile *E.histolytica* antijeni saptanmamıştır<sup>18</sup>. Araştırmacılar sonuçlarını, Techlab *E.histolytica* II ELISA testinin yüksek özgüllük ve duyarlılığına dayanarak, araştırılan popülasyonda *E.histolytica*'nın bulunmadığı, *E.dispar*'ın baskın tür olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Hindistan'da Mohanty ve arkadaşları<sup>19</sup>, mikroskopi ile *E.histolytica/E.dispar/E.moshkovskii* kompleks kist ve/veya trofozoiti saptanan 15 örnekten sadece dokuzunun *E.histolytica*-II ELISA ile pozitif olduğunu, mikroskopi ile negatif bulunan 152 örnekten 10'unda ise ELISA testi ile *E.histolytica* pozitifliği saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar sadece mikroskopi sonuçlarının dikkate alınması durumunda, pozitif bildirilen 15 hastadan altısının gereksiz tedavi göreceğini, sonucu negatif olarak bildirilen on hastanın ise gerekli tedaviyi alamamış olacağını belirterek, *E.histolytica*'yı patojen olmayan türlerden ayırt etmek için özgül tanı yöntemlerinin kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır. Çalışmada, örnekleri incelenen hastaların tedavi bilgileri değerlendirilmemiştir. Ancak laboratuvarında akut diyareli 0-6 yaş grubu çocuklarda enterik bakteriyel patojenlerin araştırıldığı bir çalışmada enterik bakteriyel PCR sonucu pozitif olan 100 hastadan 26'sına paraziter etken saptanmamış olmasına rağmen ampirik olarak metronidazol tedavisi verildiği, tıbbi kayıtlarından tespit edilmiştir<sup>20</sup>. Bu durum hekimlerin bakteriyel ve paraziter enfeksiyonları sadece klinik semptomlarla ayırt edemediğini düşündürmektedir.

*E.histolytica*'nın yüksek oranda endemik olduğu bölgelerde yürütülen bazı çalışmalarda TechLab *E.histolytica* II testi için yüksek duyarlılık oranları bildirilirken, Kuzey Ekvador'da yüksek endemik bir bölgede yapılan bir çalışmada, TechLab antijen testinin duyarlılığı kültür ve zimodem analizi ile karşılaştırıldığında %14.3 olarak bulunmuştur<sup>21,22</sup>. Araştırmacılar, ELISA kitlerinin düşük performansının; incelenen örneklerin çoğunun ishali olmayan kişilere ait, kistik formlar bulunduran yarı katı ve katı örnekler olması ve testin yalnızca, ishali dışkı örneklerinde bulunan vejetatif formların yüzeyindeki özgül antijenleri tanımaya bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Enfeksiyonun düşük endemik olduğu bölgede yapılan bir çalışmada; Visser ve arkadaşları<sup>23</sup>, TechLab ELISA kitinin, Rt-PCR ile karşılaştırıldığında düşük duyarlılığa sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Stark ve arkadaşları<sup>24</sup>, *E.histolytica* enfeksiyonu tanısında iki dışkı antijen kitini, referans standart olarak PCR ile karşılaştırmışlar, bu çalışmada kullanılan *Entamoeba* CELISA Path ve Techlab ELISA kitlerinin 1000 ila 10 000 kat daha az duyarlı olduğunu ve parazitin endemik olmadığı coğrafi bölgelerde *E.histolytica*'nın saptanmasında yararlı olmadığını bildirmişlerdir.

Dışkı örneklerinde *E.histolytica*'nın saptanması ve diğer *Entamoeba* türlerinden ayrımında kullanılan PCR gibi NAAT, mikroskobik incelemeden daha duyarlı ve özgül, antijen saptama yöntemiyle benzer duyarlılıkta yöntemlerdir. Çalışmada trikrom boyama yöntemiyle şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovski* kist ve/veya trofozoiti görülen 49 örnekten 44'ü PCR yöntemiyle negatif bulunmuş, beş örnekte geçersiz test sonucu elde edilmiştir. Dışkı örneklerinde PCR inhibitörlerinin bulunma olasılığı yüksektir, bu durum test sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle dışkı örnekleri için kullanılacak PCR testlerinin amplifikasyon kontrolü içermesi önerilmektedir. Kullanılan BD Max EPP PCR kiti, ekstraksiyon aşamasından itibaren işlem adımlarına eklenmiş internal kontrol içerdiğinden, geçerli sonuç elde edilen örneklerde PCR inhibitörü olma olasılığı bulunmamaktadır. PCR inhibitörü veya sistem hatası nedeniyle geçersiz PCR sonucu elde edilen örneklerde testin tekrar çalışılması önerilmektedir. Ancak çalışmanın önemli bir kısıtlılığı olarak; örnekler test tekrarı için üretici firma tarafından önerilen zaman diliminde saklanamadığından, tekrar çalışılamamıştır.

BD Max EPP PCR testinin performansı ile ilgili, Batra ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>25</sup>, 275 dışkı örneğinin 17'sinde mikroskopi ile *E.histolytica/dispar* saptanmış, bu örneklerin ikisi BD Max EPP ve referans laboratuvar PCR testi ile de pozitif bulunmuştur. BD Max EPP ile negatif bulunan kalan 15 örnekte, referans laboratuvar PCR test sonucu negatif bulunmuş ve bu örneklerde *E.dispar* varlığı düşünülmüş ancak doğrulanmamıştır. Çalışmada mikroskopi ile negatif bulunan 258 örnekten 257'si BD Max EPP ile de negatif bulunmuş, kalan bir örnekte BD Max EPP ile saptanan PCR pozitifliği referans laboratuvar PCR testi ile de doğrulanmıştır. BD Max EPP'nin değerlendirildiği başka bir çalışmada<sup>26</sup>, mikroskopi ile *E.histolytica/dispar* olarak tanımlanan 12 örnekte BD Max EPP ve laboratuvar tasarımı PCR ile negatif sonuç elde edilmiş, bu örneklerde laboratuvar tasarımı PCR ile *E.dispar* pozitif olarak saptanmıştır. Buna benzer şekilde, bu çalışmada da trikrom boyama yöntemi ile şüpheli *E.histolytica/dispar/moshkovskii* kist ve/veya trofozoiti görülen 49 örnekten 44'ünde BD Max EPP ile negatif sonuç bulunmuş ancak bu örnekler *E.dispar* ve *E.moshkovskii* açısından araştırılmamıştır. Adıyaman'da gastrointestinal şikayetleri olan 362 hastadan alınan dışkı örneklerinin %6.1'inde direkt mikroskobik inceleme ile *E.histolytica/E.dispar/E.moshkovskii* saptanmışken, BD Max EPP ile örneklerin %1.4'ü pozitif bulunmuş, iki örnekte ise geçerli sonuç elde edilmemiştir<sup>27</sup>. Araştırmacılar BD Max EPP'nin amibiyaz tanısında mikroskobik incelemenin yerini alamayacağını belirtmişler ancak belirli hasta gruplarında BD Max EPP gibi, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip NAAT'nin kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır. Madison-Antenucci ve arkadaşları tarafından yapılan çok merkezli çalışmada<sup>28</sup>, parazit enfeksiyonu şüphesi olan yetişkin ve pediyatrik hastalara ait dışkı örneklerinde BD Max EPP alternatif PCR ve dizi analizi



ile karşılaştırılmış, *E.histolytica* saptanmasında testin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. BD Max EPP ile birlikte iki farklı multipleks PCR testinin karşılaştırıldığı bir çalışmada Autier ve arkadaşları<sup>29</sup>, mikroskopi ile *E.histolytica/dispar* için pozitif olan bir hastadan alınan bir örnekte, *E.histolytica*'nın üç farklı PCR testi ile de saptandığını belirtmişlerdir.

Belçika'da yapılan bir çalışmada, enterik paraziter patojenler açısından değerlendirilen 631 dışkı örneğinin hiçbirinde gerçek zamanlı multipleks PCR ile *E.histolytica* saptanmadığı ve gelişmiş ülkelerde *E.histolytica* enfeksiyonlarının endemik bölgelere seyahat öyküsüyle ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>30</sup>.

PCR yönteminin özgül antijen testine göre pahalı olması dezavantajken, örneklerin biriktirilmeden çalışılabilmesi ve hızlı sonuç vermesi avantaj oluşturmaktadır. Her laboratuvar *E.histolytica*'nın doğru tanımlanması ve rapor edilmesi için koşullarına uygun, maliyet etkin tanı algoritması oluşturmaktadır.

Çalışmada ishallerde hastalarda *E.histolytica* pozitifliği saptanmamıştır. *E.histolytica* özgül antijen ve BD Max EPP çalıştığımız örneklerin tümü uygun koşullarda saklanmıştır. Örnek sayısının fazlalığı nedeniyle konsantrasyon işleminin uygulanamamış olması ve çalışma bütçesinin sınırlı olması nedeniyle örneklerin tamamında ELISA ve PCR çalışılmaması çalışmanın kısıtlılıklarını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, çalışılan örneklerde *E.histolytica* pozitifliğinin bulunmaması, laboratuvarda geçmiş dönemlerde rutin *E.histolytica* adezin antijeni test sonuçlarında saptanan düşük pozitiflik ile birlikte değerlendirildiğinde, bölgenin sanitasyon koşullarının iyi olduğunu ve çalışmaya alınan hasta popülasyonunun sosyo-ekonomik kültürel düzeyinin gelişmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmanın sonuçları, *E.histolytica*'nın tanımlanmasında mikroskopik incelemenin yeterli olmadığını göstermektedir. İshallerde hastalarda amibiyaz tanısının doğru olarak konması ve anti-amibik ajanların kullanılmasına karar vermek için *E.histolytica*'ya özgül antijen aranması veya PCR gibi daha duyarlı ve özgül, aynı zamanda hızlı bir tanı testinin kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 09.09.2015 ve Karar No: 191).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, et al. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg 1994; 50(4): 412-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.412>



2. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. N Engl J Med 2003; 348(16): 1565. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022710>
3. Dođancı L, Tanyüksel M, Gün H. Overdiagnosis of intestinal amoebiasis in Turkey. Lancet 1997; 350(9078): 670. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)63371-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63371-5)
4. Novak-Weekly S, Leber EL. Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates, pp: 2497-525. In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2019, 12<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Shirley DAT, Farr L, Watanabe K, Moonah S. A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. Open Forum Infect Dis 2018; 5(7): ofy161. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>
6. Saidin S, Othman N, Noordin R. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019; 38(1): 15-38. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3379-3>
7. Carrero JC, Reyes-López M, Serrano-Luna J, Shibayama M, Unzueta J, León-Sicaños N, et al. Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. Int J Med Microbiol 2020; 310(1): 15135. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>
8. Delialiođlu N, Aslan G, Öztürk C, Bayer M, Emekdaş G. Mersin ilinde ilkokul çocuklarında *Entamoeba histolytica* antikorlarının araştırılması. Türkiye Parazitol Derg 2004; 28(4): 185-8.
9. Bayram Y, Parlak M, Çıkman A. Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde *Giardia intestinalis* ve *Entamoeba histolytica/dispar* prevalansı: Dört yıllık izlem. Dicle Med J 2013; 40(1): 40-4. <https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2013.01.0221>
10. Ekşi F, Dođan Y, Özdemir G, Zer Y, Bayram A, Karslığıl T. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde bir yıllık sürede gaita örneklerinde saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Fırat Med J 2013; 18(4): 235-8.
11. Yıldız Zeyrek F, Özbilge H, Yüksel FM, Zeyrek CD, Sırmatel F. Şanlıurfa'da parazit faunası ve ELISA yöntemi ile dışkıda *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* sıklığı. Türkiye Parazitol Derg 2006; 30(2): 95-8.
12. Tüzemen NÜ, Dođan N. *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 114-22. <https://doi.org/10.5578/mb.6795>
13. Delialiođlu N, Aslan G, Sözen M, Babür C, Kanık A, Emekdaş G. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme linked immunosorbent assay. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(7): 769-72. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700019>
14. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev 2007; 20(3): 511-32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00004-07>
15. Pereira VV, Conceição AS, Maximiano LH, Belligoli LQG, Silva ES. Laboratory diagnosis of amebiasis in a sample of students from southeastern Brazil and a comparison of microscope-linked immunosorbent assay for screening of infections with *Entamoeba* sp. Rev Soc Bras Med Trop 2014; 47(2): 52-6. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0214-2013>
16. Soares NM, Azevedo HC, Pacheco FTF, Souza JN, Del-Rei RP, Teixeira MCA, et al. A cross-sectional study of *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* complex in Salvador, Bahia, Brazil. BioMed Res Int 2019; 7523670. <https://doi.org/10.1155/2019/7523670>
17. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. J Clin Microbiol 1995; 33(10): 2558-61. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.10.2558-2561.1995>
18. Silva MTN, Santana JV, Bragagnoli G, Marinho AM, Malagueño E. Prevalence of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in the city of Campina Grande, in northeastern Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2014; 56(5): 451-4. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000500015>
19. Mohanty S, Sharma N, Deb M. Microscopy versus enzyme linked immunosorbent assay test for detection of *Entamoeba histolytica* infection in stool samples. Trop Parasitol 2014; 4(2): 136-8. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.138547>
20. Koyuncu Özyurt Ö, Bertocco AL, Pereira LA, Jimenes L, Yazısız H, Özhak B, et al. Detection of Salmonella, Campylobacter, Shiga toxin-producing *E.coli* and Shigella/EIEC by culture and a multiplex PCR panel in pediatric patients with acute diarrheal illness. J Lab Med 2019; 43(4): 211-5. <https://doi.org/10.1515/labmed-2019-0037>

21. Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lyerly D, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis* 1997; 175(3): 734-6. <https://doi.org/10.1093/infdis/175.3.734>
22. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, et al. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: A study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(1): 123-7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.123>
23. Visser LG, Verweij JJ, Esbroeck MV, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: Performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(6): 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.03.001>
24. Stark D, Van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J, et al. Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1678-81. <https://doi.org/10.1128/JCM.02261-07>
25. Batra R, Judd E, Eling J, Newsholme W, Goldenberg SD. Molecular detection of common intestinal parasites: A performance evaluation of the BD Max™ Enteric Parasite Panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35(11): 1753-7. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2722-9>
26. Mölling P, Nilsson P, Ennefors T, Ögren J, Floren K, Thulin Hedberg S, et al. Evaluation of the BD Max enteric parasite panel for clinical diagnostics. *J Clin Microbiol* 2016; 54(2): 443-4. <https://doi.org/10.1128/JCM.02100-15>
27. Akgün S, Çelik T. Evaluation of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium hominis*/*Cryptosporidium parvum* in human stool samples by the BD MAX Enteric Parasite Panel. *Folia Parasitologica* 2020; 67: 020. <https://doi.org/10.14411/fp.2020.020>
28. Madison-Antenucci S, Relich RF, Doyle L, Espina N, Fuller D, Karchmer T, et al. Multicenter evaluation of BD max enteric parasite real-time PCR assay for detection of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 2016; 54(11): 2681-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.00765-16>
29. Autier B, Belaz S, Razakandrainibe R, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the diagnosis of intestinal protozoa. *Parasite* 2018; 25: 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018049>
30. Van Lint P, Rossen JW, Vermeiren S, Ver Elst K, Weekx S, Van Schaeren J, et al. Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in clinical stool samples by using multiplex real-time PCR after automated DNA isolation. *Acta Clinica Belgica* 2013; 68(3): 188-92. <https://doi.org/10.2143/ACB.3170>