

Polymerase chain reaction analizi ile Entamoeba histolytica ve Entamoeba dispar sıklığı (epidemiyolojik çalışma)

An epidemiological study of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infection using polymerase chain reaction

Dr. Vedat GÖRAL¹, Dr. Alexander JETTER², Dr. Brigitte WALDERISH²,
Dr. Gerd-Dieter BURCHARD³, Dr. John ACKERS⁴, Dawn BRITTEN⁴

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı¹, Diyarbakır,
Tübingen Üniversitesi, Tropikal Hastalıklar Enstitüsü², Tübingen, Almanya
Bernhard-Nocht Enstitüsü, Tropikal Hastalıklar Bölümü³, Hamburg, Almanya
Hijyen ve Tropikal Hastalıklar Hastanesi, Parazitoloji Bölümü⁴, Londra, İngiltere

ÖZET: Son zamanlarda keşfedilen Entamoeba dispar (E.dispar), Entamoeba histolytica'dan (E.histolytica) morfolojik olarak ayrılamayan, nonpatojen olan bir parazittir. Bu çalışmadaki E.histolytica / E.dispar sıklığı köylerde yapıldı. Amip varlığı taze dışkıdan mikroskopik inceleme ile araştırıldı. Ayrıca "polymerase chain reaction" (PCR) çalışması ve E.histolytica / E.dispar'a karşı antikor varlığı için ELISA testi kullanıldı. E.histolytica / E.dispar sıklığı, dışkının mikroskopik incelenmesi ile A köyünde % 35, B köyünde % 28 bulundu. Ancak PCR sonuçlarına göre bu iki köyde E.histolytica bulunamazken, E.dispar sıklığı A köyünde % 21, B köyünde % 18 oranında bulundu. Antikor seviyeleri ile dışkıda E.histolytica / E.dispar sıklığı arasında korelasyon yoktu. Ancak, E.histolytica / E.dispar antijenlerine karşı antikor cevabı açısından önemli bir ilişki saptandı (p=0.001).

Çalışma sonuçlarımıza göre, yöremizde E.histolytica sıklığı oldukça düşüktür. Seroloji, endemik bölgelerdeki asemptomatik kist taşıyanlarda E.histolytica ve E.dispar ayırımında yol gösterici değildir.

Anahtar sözcükler: Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, diagnosis, epidemiyoloji, kolorimetrik PCR

SUMMARY: The recent discovery of the existence of Entamoeba dispar (E.dispar) as an amoeba that is constitutively nonpathogenic but morphologically indistinguishable from Entamoeba histolytica (E.histolytica), has raised the question of the validity of most epidemiological studies on amoebiasis. This study was conducted in two villages. The presence of amoeba was determined by microscopic examination of fresh stools and formalin-ether-concentrated specimens. An improved colorimetric "polymerase chain reaction" (PCR) method was used and ELISA assay was used to detect anti-E.histolytica antibodies in the serum samples. The combined frequencies of E.histolytica / E.dispar according to stool microscopy were 35% in village A, and 28% in village B. According to PCR results, E.histolytica was not detected and E.dispar was found in 21% and 18% of stool samples in A and B villages respectively. Thirty-five percent (92/260) of the sera reacted with E.histolytica antigen and 28% (72/260) of the sera reacted with E.dispar antigen. A correlation between antibody levels and the presence of E.histolytica / E.dispar in stool microscopy could not be detected. A significant correlation was found between antibody responses to E.dispar and E.histolytica antigen (p=0.001).

According to our results, the prevalence of E.histolytica in our area seems to be very low. Serology is not helpful in distinguishing E.histolytica from E.dispar in asymptomatic cyst passers in an endemic area.

Key words: Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, tanı, epidemiyoloji, colorimetric PCR

Entamoeba histolytica (E.histolytica) özellikle gelişmemiş yörelerde sık bulunan ve önemli sağlık sorunlarına neden olan bir parazittir(1). Entamoeba dispar (E.dispar) ise son zamanlarda keşfedilen nonpatojen bir parazit olup, E.histolytica'ya benzemekte ve mikroskopik olarak E.histolytica'dan morfolojik açıdan ayrılması oldukça güçtür (2). Tesbit edildiği takdirde tedavi edilme-

si gerekmez. Sadece birkaç çalışmada izoenzim patterni veya gen problemleri kullanılarak ayırım yapılabilmektedir (3). Özellikle E.histolytica'nın tanısında seroloji, feçes muayenesinden daha değerlidir. Ülkemizde E.histolytica'nın tanısında dışkının mikroskopik tetkiki daha sık kullanılmakta olup, serolojik çalışmalar henüz daha rutin hale gelmemiştir. Bu çalışma, ülkemizde E.histolytica ve E.dispar sıklığı hakkında, PCR analizi ve seroloji ile yapılan ilk çalışma

Tablo 1. Çalışmamızda elde edilen dışkıının mikroskopik incelenmesi, PCR ve serolojik sonuçlar

	sıklık	
	A köyü (%)	B köyü (%)
<i>Dışkı mikroskopisi</i>		
E.histolytica+E.dispar (kist formu)	35	28
<i>P C R</i>	(34 kişide)	(45 kişide)
E.histolytica	0	0
E.dispar	21	18
<i>Seroloji</i>		
anti-E.histolytica	34	35
anti-E.dispar	29	25

olup, amacımız yöremizde *E.histolytica* ile *E.dispar* sıklığını araştırmaktır.

MATERYAL VE METOD

Çalışma Diyarbakır ilinde merkeze bağlı 2 köyde (A: Yuvacık, B: Ceylanköy) yapıldı. Çalışma öncesi köyde yaşayanlara çalışmanın amacı anlatıldı. Çalışmaya alınacak kişilere akşamdan itibaren dışkı kapları verildi. Ertesi sabah taze dışkı ile beraber, aynı kişilerden 1 ml kan örneği alındı. Çalışmaya A köyünden 136 kişi, B köyünden 95 kişi katıldı. Alınan taze dışkı örnekleri, buz aküleri arasında muhafaza edilerek, 30 dak. içinde fakültemiz parazitoloji bölümüne getirilerek amip (*E.histolytica*) varlığı için muhafazaya alındı ve amip araştırıldı. PCR çalışması için alınan dışkı örnekleri uygun koşullar altında (buz aküleri arasında özel kutularda) Londra'ya (Hijyen ve Tropikal Hastalıklar Hastanesi, Parazitoloji Bölümü) gönderildi (expres kargo ile, 24 saat içinde). PCR için, türe spesifik, 25 kD rDNA epizom içeren ve tekrarlayan element dizilerine (sekans) dayalı primerler kullanıldı. İn vitro amip kültürü ayırımında (riboprinting PCR), Clark ve Diamond primerleri (NP-rDNA-1(5) 197, NP-rDNA-2 (5) 1073, P-rDNA-2 (5) 1076 ve PCR ürünü 150 bp) kullanıldı (4,5). Reaksiyonun sonunda, *E. histolytica*'ya spesifik bir DNA probu (digoxigenin ile işaretli) ve *E.dispar*'a spesifik bir DNA probu (fluorescein ile işaretli) ilave edildi. Yöntemin kullanıldığı merkezde aynı seansda pozitif kontroller de kullanıldı. Alınan serum örneklerinde *E. histolytica* ve *E.dispar*'a karşı serum antikorları, ELISA yön-

temi ile Tübingen'de (Tübingen Üniversitesi, Tropikal Hastalıklar Enstitüsü) çalışıldı. *E.histolytica* için antijen olarak, axenic *E.histolytica* HMI-IMSS zinciri kullanıldı. *E.dispar* için de bir antijen kullanıldı. Bu antijen TYI-S-33 besiyerinden elde edilmiş (*Crithidia* aracılığı ile) bir *E.dispar* zinciri idi.

BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterildi. Her 2 köydeki çalışma grubu asemptomatik kişilerden oluşmakta idi. *E.histolytica* ve *E.dispar* sıklığı A köyünde %35, B köyünde %28 oranında bulundu. PCR çalışması A köyünde 34 kişide, B köyünde 45 kişide çalışıldı ve bu grupta *E.histolytica* bulunamazken, *E.dispar* A köyünde %21 ve B köyünde %18 oranında bulundu. Anti-*E.histolytica* antikorları A köyünde %34, B köyünde %35 iken, anti-*E.dispar* antikorları A köyünde %29, B köyünde %25 oranında bulundu. Antikor seviyesi ile *E.histolytica* ve *E.dispar* varlığı arasında bir ilişki bulunmadı. *E.dispar* ve *E.histolytica*'ya karşı antikor cevabı arasında önemli bir ilişki mevcuttu ($p=0.001$).

TARTIŞMA

E.histolytica, uzun zamandan beri bilinen ve başta amipli dizanteri, amibik rektokolitis, amibik karaciğer absesi ve diğer bazı hastalıklara neden olan önemli bir ajandır. Bazen de asemptomatik bir seyir göstermekte, genelde alt yapı ve sosyoekonomik durumun bozuk olduğu bölgelerde daha fazla hastalık yapmaktadır (1). *E. dispar* son zamanlarda keşfedilen bir parazit olup, nonpatojendir ve morfolojik olarak *E.histolytica*'dan ayrılması (dışkıının mikroskopik incelenmesi ile) oldukça güçtür. Nonpatojen olduğundan dolayı dışkıda saptanması durumunda tedavi gerekmez. *E.histolytica* ile morfolojik olarak benzerliğinden dolayı, yanlışlıkla *E.histolytica* tanısı konulmakta ve bazen de lüzumsuz yere tedavi yapılmaktadır. Bu nedenle, gelişmiş ülkelerde *E.histolytica* ile *E.dispar*'ın ayrıcı tanısında PCR ve seroloji kullanılmakta, toplumlardaki *E.histolytica* ve *E.dispar* sıklığı hakkında daha kesin bilgiler edinilmektedir (2,3,6).

Dışkıının mikroskopik incelenmesi ile *E.histolytica*'nın yüksek olduğu düşünülen ülkelerde PCR analizi yapıldığında, durumun böyle olmadığı ve *E.histolytica*'nın oldukça düşük oranlarda olduğu bulunmuştur. Bu oldukça ilginç bir sonuçtur. Dünya ülkelerinde *E.histolytica* sıklığı ülkeden

ülkeye göre değişmektedir. Bazen de aynı ülkenin farklı bölgelerinde farklı oranlarda bulunmak-tadır. Dışkıda PCR analizi ile yapılan çalışmalarda, Meksika'nın kırsal kesimlerinde *E.histolytica* sıklığı % 11.4, Brezilya'da % 3, Güney Afrika'da % 1, Seyşel adalarında % 2.6 oranında bulunmuştur (6,7). Bu farklı sonuçlar, kullanılan metodolojik farklılıklara ve yöreye göre değişmektedir. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda *E.histolytica*+*E.dispar* kist formunun (birlikte) sıklığı, Sivas'taki öğrencilerin bir kısmında % 1.2 ve kırsal alandaki çocuklarda % 4, Elazığ'da çocuk yetiştirme yurdunda % 1.2 oranında pozitif bulunmuştur (9,10). Ancak, bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre *E.histolytica*+*E.dispar* kist formu sıklığı oldukça yüksektir (% 28 ve % 35). Ancak bu vakalarda dışkının PCR analizi yapıldığında, vakaların tümünün *E.dispar*'a bağlı olduğu ve *E.histolytica*'nın bulunmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmamızda elde ettiğimiz önemli bir sonuçtur. Çalışmamızda mikroskopisi negatif olan 5 vakada PCR ile *E.histolytica* saptandı. Mikroskopisi pozitif olan 10 vakada da PCR ile *E.dispar* bulunamadı. PCR altın standart olarak alındığında dışkı mikroskopisi, % 66 oranında sensitif, % 84 oranında spesifik bulundu. Serolojik çalışmalar da, *E.histolytica* ve *E.dispar* prevalansı hakkında

bilgi vermiştir. Seroloji, *E.histolytica* enfeksiyonu daima antikor cevabı oluşturduğundan, *E.histolytica* enfeksiyonunu belirlemede faydalı bir metodur. Oysa, *E.dispar* enfeksiyonunda bu durum görülmez. Ancak, dışkıda *E.histolytica* ve *E.dispar* varlığı ile, serum antikor seviyeleri arasında korelasyon bulunamadı. Fakat, *E.histolytica* ve *E.dispar* antijenlerine antikor cevapları açısından önemli bir ilişki mevcuttu ($p=0.001$). Bu bize çapraz immünitenin varlığını göstermektedir. Bu nedenle, asemptomatik kist bulunanlarda, seroloji, *E. histolytica*'nın *E.dispar*dan ayırımında faydalı değildir. Bu ayırimda PCR daha iyi sonuç vermektedir.

Sonuç olarak, çalışma grubumuzdaki asemptomatik kişilerde ışık mikroskopisi ile *E.histolytica* saptanan kişilerde *E.histolytica* bulunmazken, vakaların çoğunda nonpatojen olan *E.dispar* bulunmuştur. Bunun pratikteki önemi şudur; asemptomatik kişilerde dışkı mikroskopisinde *E.histolytica* saptandığında bunun gerçekten *E.histolytica* olmadığı ve buna çok benzeyen nonpatojen *E.dispar* olabileceğini düşünmektir. Böylece lüzumsuz yere amip tedavisi de yapılmamış olacaktır. Bu çalışma, ülkemizde *E.histolytica* ve *E.dispar* sıklığı hakkında PCR ile yapılmış ilk çalışma olması yönüyle de oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Healy G.R. Serology. In Ravdin, J.J. (ed). Amebiasis-human infection by *Entamoeba histolytica*. New York. John Wiley&Sons. 1988; 650-63.
2. Acuna-Soto R, Samuelson J, de Girolami P, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 58-70.
3. Jackson TFHG, Gathiram V, Simjee AE. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. Lancet 1985; I: 716-9.
4. Clark CG, Dimond LS. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol Biochem Parasitol 1991; 49: 297-302.
5. Romero M, et al. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. Arch Med Res 1992; 23: 277-9.
6. Knobloch J, Mannweiler E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 727-32.
7. Gathiram V, Jackson TFHG. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. Lancet 1985; 719-21.
8. Sergeant PG. A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahe, the Seychelles. Arch Med Res 1992; 23: 265-7.
9. Saygı G, Özçelik S, Poyraz Ö. A survey of intestinal parasites in students of adult educational center in Sivas, Turkey. J Egypt Soc Parasitol 1995; 25: 303-10.
10. Aşçı Z, Yücel AY, Doymaz MZ, Yılmaz M. Parasitological investigations on 13-18 age group children at Harput orphanage. 8.International Congress of Parasitology. İzmir, Turkey. 1994: 30.