

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSHALLİ HASTALARDA *ENTAMOEBİA*
HISTOLYTICA SIKLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI,
ELİSA VE PCR YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI

Dr. Alperen CEYLAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA 2025

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İSHALLİ HASTALARDA *ENTAMOEBİA*
HISTOLYTICA SIKLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI,
ELISA VE PCR YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Alperen CEYLAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman

Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 24TU18001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca hiçbir zaman kıymetli desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, kendileriyle çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT'e;

Bu süreçte engin bilgi ve tecrübelerinden yararlanma imkanı bulduğum Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Prof. Dr. Metin DOĞAN ve Dr. Öğr. Üyesi Selin UĞRAKLI hocalarıma;

Tezimi 24TU18001 no'lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Berber çalıştığım asistan arkadaşlarıma, istatistiksel analiz konusunda yapmış olduğu katkılardan ötürü Dr. Hakkı YILDIRIM'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Hakan SART, Hüseyin Safa ŞAKALAK ve Hüseyin ÜLKER beyler nezdinde tüm teknisyen ve personelimize teşekkür ederim.

İyi ve kötü günlerimizde manevi desteği ve sevgisiyle her zaman bana güç veren sevgili eşim Kübra'ya ve anne babasına, gözyaşlınlığımız canım kızım İnci'ye;

Kardeşlerim Bahadır, Rabia Betül, Metin Furkan'a ve esas olarak bugünlere ulaşmamda en büyük pay sahibi olan, üzerimdeki haklarımı asla ödeyemeyeceğim annem Gülten CEYLAN ve babam Uğur CEYLAN'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Alperen CEYLAN

2025

ÖZET

İSHALLİ HASTALARDA *ENTAMOEBİA HISTOLYTICA* SIKLIĞININ MİKROSKOBİK BAKI, ELISA VE PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Alperen CEYLAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA 2025

Amaç: *Entamoeba histolytica* derin konak doku hasarı yapma yeteneğine sahip bir ishal patojenidir. Benzer ancak patojen olmayan türlerin varlığından dolayı rutin tanıda önemli zorluklar bulunmaktadır. Çalışmamızda, ishalleri hastalardan seçilen dışkı örnekleri *E. histolytica* varlığı açısından direkt mikroskopi, trikrom boyama, ELISA ve multipleks real-time PCR ile analiz edilmiştir. Araştırma ile *E. histolytica* sıklığının tespit edilmesi ve kullanılan yöntemleri karşılaştırarak tanısal değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamıza Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne ishal şikayetiyle başvuran hastalardan seçilen 96 dışkı örneği dahil edilmiştir. Çeşitli servis ve polikliniklerden laboratuvarımıza gelen bu örneklerden intestinal amebiyazis şüphesiyle gönderilen, şekilsiz, sulu, kanlı ve/veya mukuslu olanlar dahil edilirken, sert ve şekilli olanlar çalışmaya alınmamıştır. Tüm örnekler; doymuş NaCl çözeltisiyle yoğunlaştırma sonrası direkt mikroskopi, Wheatley trikrom boyama, dışkıda *E. histolytica*'ya özgü adezin antijeni tespit eden ELISA ve multipleks real-time PCR yöntemleri uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmada araştırılan 96 örnekte 48'i erkek, 48'i kadın hastalara aittir. Yaş aralığı 0-86 olan hastaların yaş ortalaması 37,32 (standart sapma: ±24,10) olarak hesaplanmıştır. Çocuk yaş grubunda bulunan toplam 25 hastanın yaş ortalaması ise 6,8 (standart sapma: ±5,65) olarak bulunmuştur.

E. histolytica pozitiflik oranı PCR ile %22,9 (n=22), ELISA ile %20,8 (n=20) bulunmuştur. Trikrom boyama ile örneklerin %27,1'inde (n=26) *E. histolytica/dispar* tespit edilmiştir. Direkt mikroskobik bakıda %35,4 (n=34)'ünde şüpheli amip kist ve/veya trofozoitleri görülmüştür.

Multipleks PCR'da 6 paraziter etken araştırılmış ve en sık (%34,3) *B. hominis*, daha sonra sırasıyla *E. histolytica* (%22,9), *D. fragilis* (%5,2) ve *Cryptosporidium* spp. (%1,04) pozitifliği tespit edilmiştir. *Giardia intestinalis* ve *Cyclospora cayatanensis* ise tüm örnekler için negatif bulunmuştur. 5 örnekte (%5,2) *E. histolytica* ve *B. hominis* ve 3 örnekte (%3,1) *D. fragilis* ve *B. hominis* birlikte tespit edilmiştir.

PCR yöntemi referans alınarak yapılan istatistiksel analizde, direkt mikroskobinin duyarlılığı %31,8, özgüllüğü %63,5; Wheatley trikrom boyamanın duyarlılığı %40,9, özgüllüğü %77; ELISA yönteminin duyarlılığı %72,7 ve özgüllüğü %94,5 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: *E. histolytica*'nın etken olduğu amebiyazisin tanısında doğru, hızlı ve maliyet-etkin bir laboratuvar yaklaşımı kritik öneme sahiptir. Ancak patojen *E. histolytica*'nın, *E. dispar/moshkovskii* gibi apatojen türlerle morfolojik olarak identik olması gibi temel bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu durum mikroskobinin tanısal duyarlılığını ve özgüllüğünü büyük oranda azaltmaktadır. Bu nedenle oluşturulacak tanı algoritmalarında, ELISA ve/veya PCR gibi ikinci bir yöntemin mikroskopiye eşlik etmesi, sonuçların güvenilirliğini artıracaktır.

Anahtar kelimeler: *Entamoeba histolytica*, amebiyazis, ishal, ELISA, PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* FREQUENCY IN PATIENTS WITH DIARRHEA USING MICROSCOPY, ELISA AND PCR METHODS

Dr. Alperen CEYLAN

MEDICAL SPECIALTY THESIS

KONYA 2025

Objective: *Entamoeba histolytica* is a diarrheal pathogen capable of causing deep tissue damage. The presence of morphologically similar but non-pathogenic species poses significant challenges in routine diagnosis. In our study, stool samples selected from patients with diarrhea were analyzed for *E. histolytica* using direct microscopy, trichrome staining, ELISA and multiplex real-time PCR. The aim of this study was to determine the prevalence of *E. histolytica* and to assess the diagnostic value of the methods used by comparing them.

Materials and Methods: Our study included 96 stool samples selected from patients who presented to Necmettin Erbakan University Faculty of Medicine Hospital with complaints of diarrhea. Among these samples, those that were formless, watery, bloody and/or mucous were included in the study. Wheatley trichrome staining, direct microscopy after concentration with saturated NaCl solution, ELISA method to detect *E. histolytica*-specific adhesin antigen and multiplex real-time PCR were applied to all selected samples.

Results: Of the 96 samples analyzed in the study, 48 belonged to male and 48 to female patients. The ages of the patients ranged from 0 to 86 years, with a mean age of 37,32 (SD: $\pm 24,10$). The mean age of the 25 patients in the pediatric age group was found to be 6,8 (SD: $\pm 5,65$). The positivity rate of *E. histolytica* was found to be 22,9% (n=22) by PCR and 20,8% (n=20) by ELISA. Using trichrome staining, *E. histolytica/dispar* was detected in 27,1% (n=26) of the samples. Amoebic cysts and/or trophozoites were observed in 35,4% (n=34) of the samples by direct microscopic examination.

In the multiplex real-time PCR, six parasitic agents were investigated, and the most common was *B. hominis* (34,3%), followed by *E. histolytica* (22,9%), *D. fragilis* (5,2%), and *Cryptosporidium* spp. (1,04%). *G. intestinalis* and *C. cayetanensis* were found to be negative in all samples. *E. histolytica* and *B. hominis* were detected together in 5 samples (5,2%), *D. fragilis* and *B. hominis* were detected together in 3 samples (3,1%).

Based on statistical analysis using the PCR method as the reference standard, the sensitivity and specificity of direct microscopy were calculated as 31.8% and 63.5%, respectively; for Wheatley's trichrome staining, sensitivity was 40.9% and specificity was 77%; and for the ELISA method, sensitivity was 72.7% and specificity was 94.5%.

Conclusion: An accurate, fast and cost-effective laboratory approach is critical in the diagnosis of amebiasis. However, a major challenge is that the pathogenic *E. histolytica* is morphologically identical to non-pathogenic species such as *E. dispar* and *E. moshkovskii*. This significantly limits the diagnostic sensitivity and specificity of microscopy. Therefore, in diagnostic algorithms to be established, the use of a second method such as ELISA and/or PCR alongside microscopy will increase the reliability of the results.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, amebiasis, diarrhea, ELISA, PCR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Taksonomi	5
2.3. Parazit Morfolojisi	5
2.3.1. Trofozoit	5
2.3.1.1. Bağırsak boşluğu tipi	6
2.3.1.2. Doku tipi	6
2.3.2. Prekist	7
2.3.3. Kist	7
2.3.4. Metakist	7
2.3.5. Metakistik trofozoit	7
2.4. Yaşam Döngüsü	8
2.5. Epidemiyoloji	9
2.6. Patogenez.....	10
2.7. Klinik.....	13
2.7.1. Aseptomatik kolonizasyon.....	13
2.7.2. Amebik kolit ve dizanteri	14
2.7.3. Ekstraintestinal amebiyazis	14
2.8. İmmünoloji	15
2.9. Laboratuvar Tanı.....	17
2.9.1. Mikroskopik inceleme	17
2.9.2. Kültür ve izoenzim analizi	19
2.9.3. Antikor saptama yöntemleri	21
2.9.4. Antijen saptama yöntemleri	22

2.9.5. Moleküler tanı yöntemleri	23
2.10. Ayırıcı Tanı.....	24
2.11. Tedavi.....	25
2.12. Korunma	27
2.13. Aşı Çalışmaları	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Etik Kurul ve Proje Desteği Bilgileri	29
3.2. Hasta Seçimi	29
3.3. Laboratuvar Çalışma Basamakları	29
3.3.1. Mikroskopik inceleme	30
3.3.1.1. Direkt mikroskopik inceleme	30
3.3.1.2. Wheatley trikrom boyama yöntemi	31
3.3.2. ELISA.....	32
3.3.3. PCR	36
3.3.3.1. Nükleik asit ekstraksiyonu	36
3.3.3.2. Multipleks real-time PCR	38
3.4. İstatistiksel Analiz.....	41
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
6.1. Sonuç	59
6.2. Öneriler.....	60
KAYNAKLAR.....	61

TABLolar

Sayfa No

Tablo 3.1. PCR için kullanılan thermal cycler protokolü.....	40
Tablo 4.1. Trikrom boyama ve direkt mikroskopi sonuçlarının karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.2. ELISA ve direkt mikroskopi sonuçlarının karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.3. ELISA ve trikrom boyama sonuçlarının karşılaştırılması	47
Tablo 4.4. Multipleks real-time PCR sonuçları	48
Tablo 4.5. Yaş gruplarına göre PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.6. Cinsiyete göre PCR sonuçlarının karşılaştırılması	49
Tablo 4.7. PCR ve direkt mikroskopi sonuçlarının karşılaştırılması	50
Tablo 4.8. PCR ve trikrom boyama sonuçlarının karşılaştırılması	50
Tablo 4.9. PCR ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması	51

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 3.1. Para-set float parazitolojik tanı amaçlı yüzdürme seti	30
Şekil 3.2. Wheatley trikrom boyama için hazırlanan şaleler ve reaktifler	31
Şekil 3.3. ELISA kit içeriği.....	33
Şekil 3.4. Otomatize ELISA mikrolaka yıkama cihazı.....	35
Şekil 3.5. ELISA mikrolaka okuma cihazı.....	35
Şekil 3.6. QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Almanya)	36
Şekil 3.7. Bio-Speedy Gastroenterit qPCR MX-6T Parazitik Panel Kiti	39
Şekil 3.8. LightCycler 96 cihazı (Roche, İsviçre)	41
Şekil 4.1. Direkt mikroskobide görülen şüpheli amip kistleri.....	42
Şekil 4.2. Direkt mikroskobide görülen şüpheli amip kisti ve lökosit kümeleri	43
Şekil 4.3. Wheatley trikrom boyama ile görülen <i>E. histolytica/dispar</i> trofozoiti	43
Şekil 4.4. Wheatley trikrom ile görülen <i>E. histolytica/dispar</i> trofozoiti ve siyah okla işaretlenen <i>B. hominis</i> kisti.....	44
Şekil 4.5. Wheatley trikrom boyama ile görülen <i>E. histolytica/dispar</i> kistleri ve eritrositler	44
Şekil 4.6. Trikrom boyama ile görülen <i>B. hominis</i> kisti	45
Şekil 4.7. Trikrom boyama ile görülen Charcot-Leyden kristalleri	45
Şekil 4.8. ELISA çalışması sonucu pozitif kontrol, negatif kontrol ve hasta örneklerine ait kuyucukların görünümü	46
Şekil 4.9. Direkt mikroskopi, trikrom boyama ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması....	47
Şekil 4.10. <i>E. histolytica</i> pozitif örneklere ait PCR grafikleri	48
Şekil 4.11. Trikrom boyama, ELISA ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	51

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
sn	: Saniye
%	: Yüzde
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
NF-kB	: Nükleer Faktör kB
NET	: Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları
NO	: Nitrik Oksit
ELISA	: Enzim Linked Immunosorbent Assay
Ct	: Cycle Threshold
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
IgM	: İmmunglobulin M
IgG	: İmmunglobulin G
IgA	: İmmunglobulin A
IL	: İnterlökin
HSBP	: Heparin Sülfat Bağlayan Protein
CBP30	: 30 kDa Kollajen Bağlayan Protein
Gal/GalNAc	: Galaktoz/N-asetil-D-Galaktozamin Lektin
EhCP	: <i>Entamoeba histolytica</i> Sistein Proteaz
SAPLIP	: Saposin Benzeri Protein
LPPG	: Lipofosfopeptidoglikan
TLR	: Toll-like Reseptör
IFN	: İnterferon
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
IFA	: İndirekt İmmüno Floresan Antikor Testi
IHA	: İndirekt Hemaglütinasyon Testi
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
LAMP	: Loop-Mediated Isothermal Amplification

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Entamoeba cinsi, insan bağırsağında yaşayabilen *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. coli*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. polecki*, *E. bangladeshi* ve ağız boşluğunda bulunabilen *E. gingivalis* gibi türleri içermektedir (Ali, 2015; Taşbent & Boran, 2020). Amebiyazisten sorumlu olan patojenik tür *Entamoeba histolytica*'dır (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

1986 yılından bu yana *E. histolytica*'nın neden olduğu enfeksiyon ve hastalık sıklığına ilişkin yayınlanan veriler, dünya nüfusunun %10-20'sinin bu parazit ile enfekte olduğunu ancak bunlardan yalnızca %1'inde hastalığın invaziv formunun geliştiğini göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre *Entamoeba histolytica*, dünya çapında yaklaşık 500 milyon insanı etkilemektedir. 50 milyon civarında semptomatik hastalığa sebep olmakta ve her yıl 100.000 vaka ölümle neticelenmektedir. (Ben Ayed & Sabbahi, 2017). Bu bakımdan amebiyazis, en sık ölüme neden olan protozoal enfeksiyonlar arasında üçüncü sırada yer almaktadır (Nasrallah vd., 2022)

Enfeksiyon, *E. histolytica* kistleri içeren dışkı ile kontamine olmuş su ve gıdaların oral yolla alınması ile bulaşmaktadır. Bu parazit, intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilmekle beraber birçok kişinin bağırsağında asemptomatik olarak da bulunabilmektedir (Stanley, 2003). Hastaların çoğu, *E. histolytica* kistleri içeren dışkıyla kirlenmiş su veya yiyeceklerin alınmasıyla enfekte olur; ancak oral-anal cinsel ilişki ve kirlenmiş lavman aparatları gibi daha alışılmadık bulaş yolları da mümkündür (Istre vd., 1982).

İntestinal amebiyazis tanısı, mikroskopik olarak incelenen dışkıda parazitin kist ve/veya trofozoit formlarının görülmesi ile konulabilir. Ancak bir kez yapılan incelemede parazitin kist ve/veya trofozoitlerinin görülme oranı %33-50 civarında iken, farklı zamanlarda alınan üç farklı dışkı örneğinin incelenmesi sonucu ise bu oranın %75'lere yükseldiği ifade edilmektedir (Tuncay vd., 2007).

E. histolytica, *E. dispar* ve *E. moshkovskii* morfolojik olarak tamamen aynı görünümündedirler, dolayısıyla mikroskopik incelemeyle ayırt edilemezler. Bu nedenle *E. histolytica* tespit edilme oranları, endemik bölgeler için yapılan çeşitli epidemiyolojik araştırmalarda %50'nin üzerinde bulunmuştur. Tespit edilen vakaların çoğunluğunun yanlış pozitif vakalar olduğu düşünülmektedir (Ouattara vd., 2010; Tengku & Norhayati, 2011). DNA analiz yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte bu sorun aşılmaktadır. Bu nedenle *E. histolytica* sıklığının azalması beklenmektedir (Nguı vd., 2012).

Direkt mikroskopik inceleme, ekonomik ve basit olması dolayısıyla yaygın olarak kullanılır ancak, tek başına tanısal değeri düşüktür. Özellikle direkt bakıda parazit kistinin çekirdekleri çok net seçilemez. Bu nedenle lugol gibi iyot içeren çeşitli çözeltilerle ya da kalıcı boyalarla çekirdekler daha iyi görünür hale getirilebilir (Tanyuksel & Petri, 2003). Bununla birlikte parazitin görülme ihtimalini artırmak üzere ZnSO₄, doymuş NaCl yöntemi gibi yüzdürme; Ritchie formalin-ether ve basit çöktürme gibi çeşitli yoğunlaştırma yöntemlerinden de yararlanılmaktadır (Çöplü vd., 2007).

Tüm bu ilave işlemlere rağmen dışkıının direkt bakısında parazit formlarının lökosit, epitel hücresi gibi yapılarla karıştırılabilmesi, hasta dışkısında bu parazitin devamlı atılmaması ve trofozoit formunun dış çevre koşullarında hızla bozulması (yaklaşık 30 dakika), eş morfolojiye sahip *E. dispar*'dan ayırt edilememesi gibi sebeplerle amebiyazis tanısında daha güvenilir yöntemlere ihtiyaç doğmuştur. Bu nedenle trikrom boyama, kültür, ELISA ve PCR gibi tanı araçları parazitin laboratuvar tanısı için kullanıma girmiştir (Tuncay vd., 2007).

Bu çalışmada amacımız; direkt mikroskopi, trikrom boyama, ELISA ve PCR gibi yöntemlerin *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasındaki performanslarını ve birbirleriyle olan uyumluluk düzeylerini değerlendirmektir.

Bu amaçla 01.11.2024 ile 01.03.2025 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı parazitoloji laboratuvarına intestinal amebiyazis şüphesiyle gönderilen ishalleri dışkı örnekleri seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm örneklerle öncelikle taze iken trikrom boyama, doymuş NaCl ile yüzdürme sonrası direkt mikroskopik inceleme yapılmıştır. Ardından örnekler ELISA ve PCR çalışmalarıyla araştırılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Tüm örneklerle ELISA ve PCR testleri uygulanmıştır. Böylece tüm bu yöntemlerle dışkı örneklerinde *E. histolytica* varlığı araştırılarak patojen olmayan türlerden ayırımı noktasında duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmiş, yöntemlerin tanısal değerleri analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Dizanteri, milattan önce 6. yüzyılda Asur ve Babil medeniyetlerine ait belgelerde ve milattan önce 1550’de Mısır Ebers Papirüsü’nde bahsedilen en eski hastalıklardan biridir. İlk olarak Hipokrat (M.Ö. 460-377) ardından gelen dönemlerde Galen amebik karaciğer apsesinden söz etmişlerdir. Milattan sonra farklı dönemlerde Aurelanus, Aretaeus, Archigenes ve İbni-Sina da eserlerinde karaciğer apsesi ve kanlı ishal arasındaki bağlantıya dikkat çekmişlerdir. Ortaçağ’da hastalık artış göstermesine rağmen sınırlı bir bölgede iken coğrafi keşiflerle birlikte tüm dünyaya yayılmaya başlamıştır (Christy & Petri, 2011; Cox, 2002; Kataria vd., 2024).

1822 yılında Georges Bory bu paraziti için Yunanca’da “değişme” anlamına gelen “Amoibe” kelimesinden türemiş olan *Amibe diffluens* ismini, Ehrenberg ise 1830’da Ameobida takımını önermiştir (Udalov, 2022; Unat, 1985).

1875 yılında Fedor Aleksandrovich Lösch yapmış olduğu araştırmalarda hasta dışkıında amipleri gözlemlemiş ve amipli dizanteri hastalığını birçok yönüyle tarif etmiştir. Lösch’ün ortaya koyduğu bu bilgiler, hastalığı günümüzdeki haliyle kavramamamıza öncülük etmiştir. Ayrıca köpekler üzerinde yaptığı bir çalışma sonucu gözlediği bu parazite *Amoeba coli* adını vermiştir (Bajaj, 2020; Unat, 1985).

Councilman ve Lafleur, 1890’da gerçekleştirdikleri bir çalışmada amipli dizanteri ve amipli karaciğer apsesi tanımlamalarını kullanmışlardır. Hastalığı etyolojik ve klinik anlamda irdelemişler ve hastalığa sebep olan ve olmayan iki farklı amip olabileceğini belirtmişlerdir. Hastalık yapan türe *Amoeba dysenteriae* adını vermişlerdir (Unat, 1985; Yakut & Özden, 2008).

Fritz Schaudinn, 1903 yılında bu parazitin farklı biçimlerini tariflemiş; hastalık yapan amip türüne *Entamoeba histolytica* adını vermiştir (Altıntaş, 2002). Yine 1903’te Rogers parazitin karaciğere vena porta aracılığıyla ulaştığını savunmuştur. 1909 yılında Vincent hastalığın taşıyıcılarla bulaştığını belirtmiştir (Akgun & Celik, 2020; Unat, 1985).

1925'te Dobell, *E. histolytica*'nın yaşam döngüsünü izah etmiştir. Brumpt ise *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın morfolojik olarak aynı olduğunu ancak yalnızca *E. histolytica*'nın insanlar için patojen olduğunu öne sürmüştür. Diamond'ın 1961'de *E. histolytica*'nın ilk aksenik kültürü yapması, *E. histolytica*'nın hücre biyolojisi ve biyokimyasını anlamada önemli bir dönüm noktası olmuştur. 1978'de Sargeant ve arkadaşları, *E. histolytica* ve *E. dispar* türlerinin zimodem analizi kullanılarak ayırt edilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca dışkı örneklerinde morfolojik açıdan aynı ancak genetik olarak farklı türler tanımlamak üzere antijen saptama yöntemleri ve PCR gibi metodları kullanmışlardır (Tanyuksel & Petri, 2003; Yakut & Özden, 2008).

E. histolytica ve *E. dispar*'a benzeyen *E. moshkovskii* türü ilk olarak 1941 yılında Tshalaia tarafından Moskova'nın kanalizasyon atıklarından izole edilerek tanımlanmıştır. Başlangıçta çevrede serbest yaşayan bir tür olduğu düşünülmüştür. 1961 yılında Laredo, Teksas'ta yaşayan bir hastadan *E. histolytica*-benzeri bir suş izole edilmiş ve *E. moshkovskii* ile birçok biyolojik özelliği benzer olan bu suşa *E. histolytica* Laredo suşu adı verilmiştir. 1991 yılında Clark ve Diamond, *E. histolytica*'nın patojen olmayan Laredo suşunun, *E. moshkovskii* ile identik olduğunu moleküler yöntemlerle ortaya koymuşlardır (Clark & Diamond, 1991; Fotedar vd., 2008; Sardar vd., 2023).

Ülkemizde bu konudaki ilk bilimsel makale ise Dycke ve Reşat Rıza (Kor)'nın 1904'te paraziti mikroskopik yöntemlerle incelemesiyle ortaya çıkmıştır (Unat vd., 1995).

Amebiyazis tedavisinde asırlardır çok çeşitli ilaçlar kullanılmıştır. Brezilya'da İpeka'nın amipli dizanteride kullanımı daha sonraları Avrupa'ya taşınmıştır. Bu bitkiden izole edilen emetinden ise yine karaciğer ve bağırsak amebiyazisinin tedavisinde faydalanılmaya çalışılmıştır. Conan 1948 yılında klorokini karaciğer amebiyazisinde kullanmış ve olumlu sonuçlar bildirmiştir. Powell ve arkadaşları 1962 yılında toksisite açısından emetinden daha iyi bir profile sahip dihidroemetini önermişlerdir. 1950'lerin sonunda Cosar ve Julou metronidazol molekülünü sentezlemeyi başarmışlar ve 1961'de trikomonyazis ve amebik karaciğer apsesi tedavisindeki deneyimlerini bildirmişlerdir. Powell ve arkadaşları 1966'da yaptıkları bir çalışmayla ilacın yararlılığını doğrulamışlar ve bu tarihten itibaren metronidazol amebiyazis ve amebik karaciğer apsesinin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Arellano-Aguilar vd., 2017; Unat, 1985).

2.2. Taksonomi

Entamoeba spp. sınıflandırması aşağıdaki şekildedir (Ben Ayed & Sabbahi, 2017).

Üst Alem: Eukarya

Alem: Protista

Şube: Sarcomastigophora

Alt şube: Sarcodina

Sınıf: Rhizopoda

Alt sınıf: Lobosea

Takım: Ameobida

Aile: Endamoebidae

Cins: *Entamoeba*

Tür: *E. histolytica*

E. dispar

E. moshkovskii

E. coli

E. hartmanni

E. polecki

E. gingivalis

E. bangladeshi

2.3. Parazit Morfolojisi

Entamoeba histolytica; trofozoit, prekist, kist, metakist ve metakistik trofozoit formlarında görülür (El-Dib, 2017).

2.3.1. Trofozoit

Bu dönemde parazit belirli bir şekle sahip değildir. Yalancı ayaklarla hareket edebildiği, beslenip büyüdüğü ve çoğaldığı aktif bir formdur. 12-60 µm büyüklüğünde olup taze dışkı örneklerinden yapılan mikroskopik incelemelerde hareketli olarak görülür.

Yalancı ayaklarıyla hem hareket eder hem de etraflarında bulunan besinleri fagosite ederler. Yalancı ayaklarda daha iyi ayırt edilebilen ekto ve endoplazma adı verilen iki tabakaya sahiptir. Ektoplazma refraktil ve granülsüz bir yapı arz ederken endoplazma granüllüdür. Endoplazma, parazitin çekirdeğini, az gelişmiş bir endoplazmik retikulumu ve etraftan fagositoz ile alınan besinlerin vakuollerini içermektedir. Parazit anaeroptur, mitokondri ve golgi cismine sahip değildir. Gerekli enzimlere sahip olmadığı için pürin nükleotidlerini sentezleyemez (El-Dib, 2017; Özcel, 2007; Saygı, 2009a; Şanlı, 2000; Unat vd., 1995).

Dış çevre koşullarına ve midenin asidik ortamına oldukça dayanıksızdır, kolayca parçalanır. Düşük sıcaklıkta ve değişken pH'da hareketliliği azalır, serum fizyolojik içerisinde +4 °C'de birkaç gün canlı kalabilir (Özcel, 2007; Saygı, 2009a; Ustaçelebi vd., 1999).

Trofozoit formunun bağırsak lümeninde bulunan ve kommensal yaşayan (minuta) ve dokulara invaze olarak doku hasarı ve nekroz yapabilen (magna) iki farklı tipi bulunur (Semerjyan & Susanyan, 2006).

2.3.1.1. Bağırsak boşluğu tipi

Apatojen olarak kabul edilen bu forma kommensal, tetragena veya minuta adları da verilmiştir. Yaklaşık 12-20 µm'lik boyutuyla doku şekline göre daha küçüktür. Akut kanlı ishal dönemini geçirmiş kişilerde ve taşıyıcılarda görülür. Sitoplazmalarında eritrosit yoktur (Özcel, 2007; Saygı, 2009b).

Mikroskobik incelemelerde taze örneklerde trofozoitlerin hızlı hareket etmesi ve yalancı ayaklarının parmaklı çıkıntılar şeklinde olması; ayrıca trikrom boyalı örneklerde eritrosit fagosite ettiğinin görülmesi, küçük ve santral bir nükleolusunun oluşu görülen trofozoitin patojen olma ihtimalini artırmaktadır (Özcel, 2007; Saygı, 2009a).

2.3.1.2. Doku tipi

Magna adı da verilen bu trofozoit tipi; invazyon yapan, enfeksiyon kliniğini ortaya çıkaran tiptir. Patojendir ve bağırsak boşluğu tipine göre daha büyük (20-60 µm) ebatlara sahiptir. Boyanmış preparatlarda noktasal, küçük ve santral bir nükleolusu, nükleus periferinde ise düzgün ve sıralı kromatin tanecikleri yer alır. Ayrıca sitoplazmasında fagosite ettiği eritrositler görülebilir (Ak vd., 2007; Junaidi vd., 2020; Saygı, 2002; Wisner, 2010).

2.3.2. Prekist

Trofozoitlerin bölünmesinden sonra ortaya çıkan geçici bir ara formdur. Çekirdek yapısı halen trofozoite benzese de içerdiği besin vakuollerini kaybetmeye başlar. Sitoplazmasında, “kromatoid cisimler” olarak adlandırılan puro veya çomak biçimli ribozomları içerir. Hücre, olgun bir kist haline gelmek üzere küçüldükçe bunlar da dışarı atılır. Enfeksiyonun kronikleştiği durumlarda veya tedavi almış hastalarda dışkı mikroskopisinde görülebilir (El-Dib, 2017; Özcel, 2007; Saygı, 2009a).

2.3.3. Kist

Prekistlerin olgunlaşmasıyla gelişen, yuvarlak ve ortalama 10-15 µm büyüklüğe sahip hareketsiz formdur. Plazma zarının dışında bir de refraktil kist duvarı vardır. Nükleus bölünerek önce iki daha sonra dört çekirdekli kistler oluşur. Bir ve iki çekirdekli şeklinde vakuoller vardır ve bu vakuoller lugol gibi iyot içeren çözeltilerle koyu renkte boyanırlar. Dört çekirdekli kist; olgun, çevre koşullarına dayanıklı ve bulaştan sorumlu formdur. Taze ve şekilli dışkılarından hazırlanan preparatlarda görülür. Dört çekirdekli matür kistte vakuol görülmez. Olgun kistler kuruluk ve yüksek sıcaklıklara duyarlı olsa da dış çevrede nemli koşullarda haftalarca canlılığını koruyabilir. Genellikle su arıtmada kullanılan konsantrasyonlardaki kloro karşı orta derecede dirençlidirler. Kistler, kanalizasyonda, doğal su kaynaklarında ve içme sularında +4 °C’de 1 ay canlı kalabilirler. Oda sıcaklığında peynir, ekmek ve sebze-meyve gibi gıdalar üzerinde 48 saate kadar hayatta kalabilir. Soğuğa ve mide asiditesine de dirençlidirler. Bahsedilen tüm bu özellikler, *E. histolytica*’nın bulaşında kist formunun rol oynamasında başlıca sebeplerdir (Özcel, 2007; Saygı, 2009a; Shirley vd., 2020).

2.3.4. Metakist

Olgun kistlerin kontamine su ve yiyeceklerle oral yoldan alınmasından sonra bu kistler ince bağırsakta metakist şekline dönüşürler (Junaidi vd., 2020).

2.3.5. Metakistik trofozoit

Yutulan kistler ince bağırsağa geldiğinde çekirdekleri ve sitoplazmaları bölünerek 8 adet küçük boyutta amip (amoebula) oluşur. Bu küçük amipler daha sonra kalın bağırsağa yerleşerek büyürler ve ardından, kommensal (minuta) veya patojen (magna) trofozoit şekillerine dönüşürler. Kalın bağırsakta en sık çekum ve rektosigmoidal bölgelere yerleşirler

ve ikiye bölünerek (binary fission) çoğalırlar. Patojen trofozoitler yalancı ayaklarını çıkarıp, litik enzimler salgılayarak etraf dokulara invaze olurlar. Yerleştikleri alanlarda inflamasyon ve ülserler meydana getirip kapillerlere ulaşarak kanama alanları oluştururlar. Bu kapillerlerden kan dolaşımına girebilirler bu şekilde başta karaciğer olmak üzere birçok doku ve organa giderek ekstraintestinal amebiyazis tablosuna neden olabilirler. Hastanın tedavi alması veya parazit için ortam şartlarının çeşitli sebeplerle bozulması sonucu bu trofozoitler hayatta kalabilmek adına prekist ve kist formlarına dönüşürler (Altıntaş, 2002; Junaidi vd., 2020; Özcel, 2007; Saygı, 2009a).

2.4. Yaşam Döngüsü

E. histolytica'nın tek rezervuarı insandır. Sadece insandan insana bulaş olur; ara konağa veya bir vektöre ihtiyaç göstermez. Bulaş, olgun kistlerin kontamine ettiği su ve yiyeceklerin tüketilmesiyle meydana gelir. Nadiren seksüel yolla veya trofozoit içeren dokuların transplantasyonu ile bulaş olabilmektedir (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Saygı, 2009a).

Yaşam döngüsü enfektif kist ve çoğalan trofozoit aşamalarını içerir (Guillen, 2021). Alınan kistler mide asidine dirençli oldukları için değişime uğramadan ince bağırsağa geçerler. İnce bağırsakta alkali ortam şartları, uygun sıcaklık ve tripsin enzimi etkisiyle ekskistasyon gerçekleşerek dört çekirdekli metakist açığa çıkar. Bu metakistin dört çekirdeği bölünerek sekiz çekirdek oluşturur. Her çekirdeğin etrafı bir miktar sitoplazma ile çevrilerek sonunda sekiz adet aktif hareket edebilen metakistik trofozoit (amoebula) oluşur. Bu immatür trofozoitler çekum ve rektosigmoidal bölge başta olmak üzere kalın bağırsağa yerleşirler, büyürler ve ikiye bölünerek çoğalırlar (İkbal vd., 2022; Sugeçti, 2018). Oluşan trofozoitler, konak dokularında nekroza sebep olurlar ve nekrotik dokularla beslenirler. Sitoplazmalarında fagosite edilmiş eritrositler görülebilir. Dışkı ile atıldıklarında 30 dakika ila 1 saat içerisinde hızla parçalanırlar (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; İkbal vd., 2022; Tuncay vd., 2007).

Bazı trofozoitler ise invazyon yapmadan, konağa zarar vermeden fekal içerikle beslenerek kalın bağırsak lümeninde yaşayabilir. Bu trofozoitler de bölünerek çoğalırlar ve belirli şartlar altında kist formuna dönüşürler. Kist oluşumunun; besin azlığı, parazitin büyümesi ve bölünmesi için elverişsiz koşulların ortaya çıkması, dolayısıyla hücrel metabolizmanın yavaşlaması gibi nedenlerle meydana geldiği düşünülmektedir. Enkistasyon sırasında trofozoitler, yalancı ayaklar gibi sitoplazmik çıkıntılarını geri çeker, yuvarlak bir

hal alır ve çok hücreli kümeler halinde aggrege olurlar. Erken evrelerde, hücre bölünmesi olmaksızın iki ardışık kromozomal replikasyon döngüsü nedeniyle dört nükleuslu bir ara form (erken kist) oluşur. Kistin olgunlaşması aşamasında ise kademeli olarak gelişen dehidrasyon sonucu sitoplazma yaklaşık %80 oranında küçülür. Glikojen depolanması ve kist duvarının oluşması sonrası dışkı ile atılır ve döngü böylece tamamlanır. Enfekte bir hasta günde 45 milyon kist atabilir (Guillén, 2023; Ikbal vd., 2022).

2.5. Epidemiyoloji

Amebiyazis, dünyada en sık görülen paraziter hastalıklardan biridir. DSÖ verilerine göre dünya genelinde 500 milyon insanı etkilemektedir. Yaklaşık 50 milyon insanda semptomatik hastalık ortaya çıkmakta ve 100.000 vaka ölümle sonuçlanmaktadır. Sıtma ve şistozomiyazisten sonra en sık ölüme neden olan üçüncü parazit kaynaklı hastalıktır. Gelişen moleküler teknikler sayesinde birçok vakanın aslında *E. dispar* ve *E. moshkovskii* ile enfekte olduğu, *E. histolytica* ile enfekte vaka sayısının 5 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. Parazit ile karşılaşanların %80-90'ı asemptomatik seyir göstermektedir. Çocuklar, immünsüprese hastalar ve hamile kadınlar enfeksiyona daha duyarlıdır (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Nasrallah vd., 2022).

Dünya çapında yaygın olarak görülmekle birlikte daha çok tropikal ve subtropikal iklime sahip, gelişmekte olan, sanitasyon ve sağlık hizmetleri yetersiz ülkeleri etkilemektedir. Ayrıca düşük okur-yazarlık düzeyi, yoksulluk, uygunsuz su temini ve artan nüfus gibi faktörler, parazitin bulaş oranlarının yükselmesine neden olmaktadır. *E. histolytica* enfeksiyonunun Güney ve Orta Amerika, Afrika ve Asya gibi gelişmekte olan ülkelerin daha fazla olduğu coğrafyalarda %50'lere çıkabildiği bildirilmektedir. Birçok Afrika ülkesinin yanı sıra Meksika, Kolombiya, Brezilya, Tayland, Çin, Hindistan ve Bangladeş gibi ülkeler endemik kabul edilmektedir (Ali vd., 2008; El-Dib, 2017; Nasrallah vd., 2022; Ximénez vd., 2009). Ancak küreselleşen dünya şartlarında artan turizm hızı, meydana gelen göçler ve mülteci hareketliliği ve seksüel bulaş gibi çeşitli faktörler sebebiyle Kuzey Amerika ve Batı Avrupa gibi yüksek gelire sahip gelişmiş ülkelerde de vaka insidansında artış görülmektedir (Fu vd., 2023).

Afrika’da yapılan çalışmalarda hastalık prevalansı Kenya için %58,3, Rwanda için %54,5, Uganda için %19,93 gibi yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Asya kıtası için; Hindistan’da %11,7, İran’da %3,45, Çin’de ise %11 olarak bildirilmiştir. Güney Amerika ülkelerinden Brezilya’da %1 ila %13,4 arasında değişmektedir (Nasrallah vd., 2022).

Ülkemiz genelinde prevalans %0,4- %18,4 arasındadır. İstanbul merkezli bir çalışmada 1999-2009 yılları arasında 27.664 dışkı örneği incelenmiş; *E. histolytica/dispar* sıklığı Akdeniz bölgesi için %3, Karadeniz bölgesinde %2, Doğu Anadolu’da %2, Güneydoğu Anadolu’da %4, Marmara bölgesinde %0,1, Ege bölgesinde %0,3 olarak tespit edilmiştir. Bursa’da yapılan diğer bir çalışmada ise *E. histolytica/dispar* görülme oranı %2,27 olarak bildirilmiştir (El-Dib, 2017; Yakut & Özden, 2008).

E. histolytica enfeksiyonlarında rezervuar, parazit ile enfekte ve dışkı ile kistleri dış ortama atan kişilerdir. Dolayısıyla dışkı ile sadece trofozoit atan akut kanlı ishelli hastalardan kaynaklanan fekal-oral bulaş beklenmez. Kistin hayatta kalabilmesinde en önemli faktör sıcaklıktır, 40 °C üzeri sıcaklığa, kuruluğa, iyotlu bileşiklere ve yüksek derişimde klora ve asetik asite duyarlıdır (Saygı, 2009a; Shirley vd., 2020).

2.6. Patogenez

Parazit, enfekte hastaların çok büyük bir kısmında herhangi bir semptomu neden olmaksızın kommensal bir şekilde yaşar. İnvaziv enfeksiyonun ortaya çıkmasında çeşitli virülans faktörleri rol oynar. Bu faktörler, galaktoz/N-asetilgalaktozamin lektin (Gal/GalNAc lektin), sistein proteaz, amebapor, kollajenaz, nötral proteaz, nöraminidaz ve β-glikozaminidaz gibi çeşitli yapısal komponentler ve enzimlerdir. Bazı yeni araştırmalarda ilave olarak, lipofosfopeptidoglikan ve serin-treonin-izolösinden zengin proteinin de parazitin adezyonu ve sitotoksisitesinde etkili olduğu anlaşılmıştır (Kurt vd., 2019; Lejeune vd., 2009). Bunlar içerisinde en önemli olanlar: Galaktoz/N-asetil-D-galaktozamin (Gal/GalNAc) lektin, sistein proteazlar, amebaporlar ve lipofosfopeptidoglikan kompleksidir (Özçelik & Malatyalı, 2008).

Galaktoz/N-asetil-D-galaktozamin (Gal/GalNAc) lektin: Birbirine disülfid bağlarıyla bağlanmış ağır (170 kDa) ve hafif (31-35 kDa) alt ünitelere nonkovalent olarak bağlanmış bir ara alt ünite (150 kDa) içeren 260 kDa ağırlığında bir heterodimerdir. Tüm bu alt üniteler farklı gen grupları tarafından kodlanırlar. Bir virülans faktörü olarak esas görevi konak hücrelerine bağlanma yani adezyondur. Ayrıca kompleman direnci ve sitotoksisite gibi rolleri de vardır. Lektine karşı gelişen antikorlar in vitro adezyonu ve sitotoksisiteyi

azaltır. Hem *E. histolytica* ve hem de *E. dispar*, Gal/GalNAc lektinlere sahiptir ancak bu iki türün lektinleri yapı ve işlev bakımından farklılık arz eder. *E. dispar*'da bulunan lektin yapışma, bağlanma ve sitotoksosite açısından çok daha düşük bir etkinliğe sahiptir (Kurt vd., 2019).

Sistein proteaz: Bu enzim, *E. histolytica*'nın konak dokularda yayılmasını kolaylaştıran, ekstrasellüler matriksi lizise uğratan, doku hasarına neden olan bir virülans faktörü olarak bilinmektedir. Bağırsak duvarındaki kollajen, elastin, fibronektin ve laminini parçalayarak infiltrasyonun derinleşmesine neden olur. Bunlarla birlikte C3a ve C5a gibi kompleman proteinlerini, IgG'nin ağır zincirini ve IgA'yı parçalayarak parazitin immünitete karşı direnç göstermesini sağlar. Sistein proteazlar için parazitin genomunda yaklaşık 50 adet gen bölgesi bulunmakla beraber; en çok EhCP1, EhCP2, EhCP5 ve EhCP7 eksprese edilir. *E. dispar*, *E. histolytica*'ya kıyasla 10 ila 1000 kat daha az sistein proteaz üretir. Aynı durum düşük virülans aktivite gösteren *E. histolytica* suşları için de geçerlidir (Argüello-García vd., 2023; Özçelik & Malatyacı, 2008; Siqueira-Neto vd., 2018).

Amebapor: 77 aminoasitten oluşan küçük proteinlerdir. A, B ve C olmak üzere üç tip amebapor vardır. Sitoplazmik veziküllerde depolanan bu proteinler fizyolojik bir deterjan olan saposin B'de bulunan "Saposin benzeri protein" (SAPLIP) bölgesini içerir. Bu deterjan benzeri özellik sayesinde temas bağımlı lizis yaparlar. Bu şekilde bakteri ve insan bağırsak hücrelerinde porlar oluştururlar. Bu porlardan hücre içine kontrolsüz bir iyon ve su girişi olur, hücreler şişer ve parçalanırlar. Ayrıca çevresinde bulunan lenfosit, makrofaj gibi immün sistem hücrelerini de bu yolla lizise uğratarak immüniteden kaçışta rol oynarlar. Amebapor ekspresyonu engellenen *E. histolytica* suşları patojenitelerini büyük ölçüde kaybederler (König vd., 2021; Leippe vd., 2005).

Lipofosfopeptidoglikan yüzey kompleksi (LPPG): *E. histolytica*'nın virülans faktörlerinden biri olan bu makromolekül parazitin hücre membranında bulunmaktadır. Oransal olarak %85 karbonhidrat, %8 peptit, %2,5 lipit ve %1 fosfattan oluşur. Konak bağışıklık hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına sebep olur. İnflamasyonu artırarak konak dokulara infiltrasyonu kolaylaştırır. Ayrıca parazitin tüm yüzeyini kaplayan bu yapı mekanik bir bariyer olarak paraziti immünitete karşı korumaktadır. Düşük virülansa sahip *E. histolytica* suşlarında daha az miktarlarda üretilirken, *E. dispar*'da ise modifiye edilmiş bir versiyonu bulunmaktadır (Faust & Guillen, 2012; Jasni vd., 2022).

Amebiyazis, asemptomatik kolonizasyondan invaziv amebik kolite (dizanteri) ve daha çok karaciğer ve akciğerlerde apse oluşumu şeklinde görülen ekstraintestinal enfeksiyonlara kadar çok farklı klinik şekillerde tezahür edebilir. Ayrıca amebomadan toksik megakolona ve perforasyona kadar değişebilen komplikasyonlar meydana getirebilir (Tengku & Norhayati, 2011; Zlobl, 2001). Bu klinik tabloların oluşumunda konağın immünitesi, parazitin virülansı, bağırsak mikrobiotasının durumu ve vücuda alınan kist sayısı gibi faktörler rol oynamaktadır (Ustaçelebi vd., 1999; Watanabe & Petri, 2019).

Enfeksiyon dört çekirdekli kistlerin ağız yoluyla alınmasıyla başlar. Ekskistasyon ince bağırsağın terminal ileum bölgesinde gerçekleşir, hareketli trofozoitler buradan kalın bağırsağa göç ederler. Burada hücresel artıklar ve mikroorganizmalarla beslenen, kalın bağırsağı kolonize eden, enkiste olarak dışkıyla atılan non-invaziv forma veya kolon mukozasını istila ederek doku hasarına neden olan invaziv forma dönüşürler. Ancak invaziv veya non-invaziv forma geçişi belirleyen faktörler halen aydınlatılmamıştır (Mathur vd., 2024; Mortimer & Chadee, 2010).

Trofozoitler, kalın bağırsağa geçtikten sonra yüzeylerinde bulunan Gal/GalNAc lektin aracılığıyla konak hücrelerine tutunurlar. Tutunma parazitin patogenezindeki en kritik aşamadır. Ardından sahip oldukları birtakım membran proteinleri, sistein proteaz enzimi ve amebaporlar sayesinde konağın enterositlerine, makrofaj, nötrofil ve lenfosit gibi immünite hücrelerine yoğun bir su ve ekstrasellüler kalsiyum girişi başlatarak hücreleri parçalarlar. Parçalanan veya hasarlanan bu hücreler trogositozu uğrar. Trogositoz, fagositoza benzeyen ancak fagositozdaki gibi tüm hücre yerine hasarlanan hücrelerin bir yalnızca bir kısmının yutulduğu bir süreçtir. *E. histolytica*, trogositoz yoluyla aldığı insan hücre membran proteinlerini kendi yüzeyinde eksprese eder. Bu yolla, kan dolaşımına geçtiğinde serum proteinleri tarafından yakalanarak parçalanmaktan kurtulmuş olur (Mathur vd., 2024).

Ayrıca, Gal/GalNAc lektin, serin-treonin-izolösinden zengin protein ve lipofosfoproteoglikan yüzey kompleksi (LPPG) konak hücrelerinde sitotoksisite ve kalsiyum girişi sonrası apoptoza neden olmaktadır. Meydana gelen apoptoz ve salınan sistein proteaz enzimi fagositozu tetikler ve ölü hücreler bu şekilde ortadan kaldırılır (Christy & Petri, 2011; Mathur vd., 2024). Huston vd. (2003) yaptıkları bir çalışmayla *E. histolytica* trofozoitlerinin fagosite etmek için öncelikle apoptotik hücreleri tercih ettiğini göstermişlerdir. Oluşan doku hasarı çoğu zaman mukoza ve submukozada sınırlı kalır, musküler tabakayı aşmaz. Patolojik kesitlerde tipik ağzı dar, tabanı daha geniş şişe şeklinde (flask-shaped) ülserlere sebep olur. Ödem ve nekroz olmasına rağmen hasarlı bölgede

lökosit oldukça azdır. Bağırsak çeperinde kanama alanları oluşur bu da dışkıya tipik kanlı ishal görünümünü verir. Nadir durumlarda trofozoitler lamina propriayı da infiltre ederek kan dolaşımına geçebilmektedir. Özellikle portal ven yoluyla karaciğere gelerek apse oluşumuna sebep olabilirler. Hematojen yolla veya bu apselerin diyaframa rüptürü sonucu komşuluğunda bulunan akciğerlere de ulaşabilir (Marie & Petri, 2014; Yakut & Özden, 2008).

2.7. Klinik

E. histolytica enfeksiyonları etkenin bulunduğu yere göre farklı şekillerde karşımıza çıkmaktadır (Tanyuksel & Petri, 2003).

1. İntestinal amebiyazis
 - a. Asemptomatik kolonizasyon
 - b. Amebik kolit ve dizanteri
2. Ekstraintestinal amebiyazis

2.7.1. Asemptomatik kolonizasyon

Kolit ve/veya ekstraintestinal bir enfeksiyon tablosu olmaksızın, dışkıda parazitin varlığının rastlantısal olarak tespit edilmesi asemptomatik kolonizasyon olarak adlandırılır. Asemptomatik taşıyıcılık veya noninvaziv intestinal enfeksiyon gibi tanımlamalar da kullanılmaktadır. Bulaş sonrası hastaların yaklaşık %90'ı herhangi bir belirti ve bulgu göstermez. Ancak bazı durumlarda şişkinlik, bağırsak alışkanlıklarında değişiklikler, mukoid vasıflı hafif ishal gibi müphem ve intermittan şikayetler olabilir. Dışkı mikroskopisinde eritrosit, lökosit ve trofozoit yoktur, ancak kısa bir süre kist görülebilir. Kolonoskopide mukozal görünüm doğaldır (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Othman vd., 2020; Türkdoğan, 2004).

Bununla birlikte oluşan kolonizasyonun, takip eden yıl içerisinde %9 oranında dizanteri ve karaciğer apsesine ilerleyebildiği bildirilmiştir (Shirley vd., 2020). Ayrıca *E. histolytica* ile enfekte asemptomatik vakaların %80'inin serumunda spesifik antikorlar tespit edilmiştir (Yanagawa vd., 2021). Ancak *E. histolytica*'ya mikroskopik olarak çok benzeyen *E. dispar* ile oluşan asemptomatik kolonizasyonda spesifik antikorlar bulunmaz ve tedavi gerekmez (Türkdoğan, 2004).

2.7.2. Amebik kolit ve dizanteri

Hafif, aralıklı ishalden, fulminan nekrotizan kolite kadar uzanabilen klinik tablo genel olarak subakut bir başlangıç gösterir. Kramp tarzında karın ağrısı, kusma, dışkıda mukusla beraber gizli veya gros kanama, tenesmus, iştah ve kilo kaybı gibi semptomlar görülür. Hastaların üçte birinde ateş meydana gelebilir (Alavi, 2007; Ullah vd., 2022).

Amebik kolit, özellikle tanı ve tedavisi zamanında yapılmadığı takdirde %0,5 oranında perianal fistül, ameboma, toksik megakolon, fulminan nekrotizan kolit gibi ender ancak ciddi komplikasyonlar ortaya çıkarabilir. Gebelik, çocuk yaş, immünsüpresif ilaç kullanımı, alkolizm, malnutrisyon ve malignensi gibi durumlar toksik megakolon ve fulminan nekrotizan kolit gelişmesinde önde gelen risk faktörlerindedir. Bu hastalarda yüksek ateş (>38 °C), taşikardi, şiddetli karın ağrısı, peritonit bulguları, yoğun kanlı-mukuslu ishal ve septik şoka yatkınlık mevcuttur. Nekrotizan kolit gelişen hastalarda mortalite oranı %40'tır ve eş zamanlı karaciğer apsesi olanlarda bu oran %89'a çıkmaktadır (Kantor vd., 2018; Morán vd., 2023; Türkdoğan, 2004).

İntestinal amebiyazis olgularının %1-2'sinde kalın bağırsağın çekum ve rektosigmoidal bölgelerinde ameboma gelişebilmektedir. Ameboma, histopatolojik olarak hiperplastik granülasyon dokusundan oluşan benign fibrotik bir lezyondur. Gecikmiş tanı ve yetersiz tedavi en önemli risk faktörleridir. Tümöre benzer kolonoskopik görüntüsü ve oluşturduğu şikayetler sebebiyle karsinomlarla karışabilmektedir (Memis vd., 2025; Türkdoğan, 2004).

2.7.3. Ekstraintestinal amebiyazis

Trofozoitlerin kalın bağırsak duvarını penetre ederek kan dolaşımına geçmesi sonucu farklı doku ve organlarda amebiyazis gelişebilir. En sık görülen ekstraintestinal tutulum portal ven yoluyla karaciğere gelen trofozoitlerin yaptığı amebik karaciğer apsesidir (Stanley, 2003). Amebik karaciğer apsesi, amebiyazis vakalarının %9'unda bir komplikasyon olarak ortaya çıkar. 2010 yılında dünya genelinde 50.000 ölüme neden olmuştur (Usuda vd., 2022).

Genel itibariyle akut bir başlangıç gösterir. Üşüme-titreme, ateş, iştahsızlık, sağ üst kadranda ağrısı, hepatomegali gibi belirti ve bulgular mevcuttur. Laboratuvar parametrelerinde anemi, lökositoz, hipoalbuminemi, artmış sedimentasyon hızı, alkalin fosfataz ve transaminazlarda yükselme vardır. Görüntüleme yöntemleriyle karaciğerde genelde tek apse

görülür ve büyük oranda sağ lob tutulmuştur. Bu hastaların yapılan dışkı incelemelerinde parazitin kist veya trofozoitine rastlanmayabilir (Kantor vd., 2018; Stanley, 2003).

Akciğerler, amebiyazisten en sık etkilenen ikinci ekstraintestinal organdır. Plöropulmoner amebiyazis, çoğunlukla amebik karaciğer absesinin plevral boşluğa rüptürü sonucu gelişir. Daha nadir olmakla birlikte hematogen veya lenfatik yolla da akciğer tutulumu mümkündür. Rüptür sonrası gelişen yayılımda, akciğerin en sık alt ve orta lobları etkilenir. Pulmoner apse, bronkohepatik fistül ve ampiyeme neden olur. Göğüste ve sağ skapuler alanda ağrı, öksürük, ateş ve balgamda safra bulunması akla plöropulmoner amebiyazisi getirmelidir (Kantor vd., 2018; Putra vd., 2023).

Daha nadir olmakla beraber pürülan perikardit, peritonit, cilt lezyonları ve hatta beyin apsesi gibi ciddi sonuçları olabilen doku ve organ tutulumları da görülebilmektedir (Morán vd., 2023).

2.8. İmmünoloji

E. histolytica bağırsak epiteliyle teması ve istilası üzerine, parazite karşı savunma amacıyla bir dizi immün yanıt aktive olur. Buna karşılık amip, bağışıklık yanıtına direnmek ve hayatta kalıp patogenezini sürdürmek için çeşitli kaçış mekanizmaları geliştirmiştir (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Amip, vücuda girdiğinde öncelikle doğal bağışıklık mekanizmalarıyla karşılaşır. Mide asidi, duyarlı mikroorganizmaları öldürme yeteneği sayesinde enteropatojenlere karşı önemli bir ilk savunma hattıdır. Ancak mide asidi birçok mikroorganizmayı öldürsede, amip kistleri bu aside dirençlidir. Bağırsakta, müsin tabakası epitel hücrelerini korumaktadır, ancak trofozoitler Gal/GalNAc lektin aracılığıyla müsin bağlanarak sistein proteaz ile mukus tabakasını ve ekstrasellüler matriks elemanlarını parçalarlar. Amipler epitele ulaştığında, epitel hücreleri Gal/GalNAc lektini TLR-2 ve TLR-4 reseptörleri ile algılar (Moonah vd., 2013; Uribe-Querol & Rosales, 2020). Bu etkileşim, NF- κ B aktivasyonunu tetikleyerek IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini başlatır (Rosales, 2021). Ayrıca, *E. histolytica* yüzeyindeki LPPG adlı kompleks de TLR-2 tarafından tanınarak IL-10 üretimini indükler (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Salgılanan IL-8 özellikle nötrofiller için potent bir kemoatraktandır ve bu hücreleri hızlı bir şekilde invazyon alanına çeker. Kan dolaşımından enfeksiyon alanına gelen nötrofiller; fagositoz, degranülasyon ve nötrofil hücre dışı tuzak (NET) oluşumu gibi antimikrobiyal mekanizmaları devreye sokarlar (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Makrofajlar da amebiyazise karşı savunma da önemli rol oynamaktadır. Özellikle TLR-2 ve TLR-4 aracılığıyla amip varlığını algılayarak IL-1, IL-6 ve IL-12 gibi çeşitli sitokinler salgırlar. Aktive makrofajlar nitrik oksit (NO) üretimi ve amip metabolizmasını bozan çeşitli antimikrobiyal ajanlar sayesinde *E. histolytica*'yı öldürebilme kapasitesine sahiptir (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Amebiyazise karşı diğer önemli bir savunma hattı ise hücrel immünitedir. Enterositlere ek olarak dentritik hücreler de toll-like reseptörleriyle amipleri tanırlar ve ardından T lenfositleri aktive ederler. T lenfositlerin cevabı enfeksiyonun gidişatına direkt olarak etki eder (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Th1'lerden salınan IFN- γ amebiyazise karşı koruma sunarken, Th2 hücrelerinden salınan IL-4'ün invaziv enfeksiyonla ilişkili olduğu bulunmuştur. Nitekim çocuklarda, yüksek serum IFN- γ seviyelerinin enfeksiyondan korunmayla korele olduğu, invaziv amebiyazisli hastalarda ise serum IL-4 seviyelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Haque vd., 2007; Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016).

Ayrıca fareler üzerinde yapılan bir aşı çalışmasında IFN- γ ve IL-17'nin aşılama sonrası korunmada rol aldığı gösterilmiştir. CD8+ T lenfositlerden salınan IL-17; müsin üretimi artırmak, antimikrobiyal peptidlerin salgılanmasını indüklemek, kolon epiteli boyunca IgA transportunu ve nötrofil infiltrasyonunu artırmak gibi çok yönlü bir rol oynamaktadır (Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016).

Bağırsak lümeninde bulunan Gal/GalNAc lektine karşı oluşmuş IgA, amebiyazise karşı koruyucudur ve kolon duvarında parazit kolonizasyonunu azaltır. Ancak enfeksiyon sürecinde, *E. histolytica*'ya karşı ortaya çıkan spesifik IgG yanıtı invaziv hastalığı veya rekürren enfeksiyonları önlemez. Bu antikörlerin koruyucu etkiye sahip olmamasının nedenlerinden biri parazitin ürettiği sistein proteazdır. Zira bu enzim, IgG'yi doz bağımlı bir şekilde parçalama yeteneğine sahiptir (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

2.9. Laboratuvar Tanı

Amebiyazisin laboratuvar tanısı; mikroskopik, immünojenik ve moleküler yöntemlere dayanır. Parazitin bulunduğu yere göre dışkı, çeşitli vücut sıvıları ve doku örnekleri için farklı yöntem ve tetkikler kullanılmaktadır.

Bu nedenle mikroskopik yöntemlerin yanı sıra kültür, izoenzim analizi, antijen saptama testleri, moleküler yöntemler ve hızlı tanı testleri gibi farklı yöntemlere ihtiyaç duyulabilmektedir. İntestinal amebiyazisin tanısı, ekstraintestinal amebiyazisten belli noktalarda ayrışmakta ve bu aşamalarda çeşitli zorluklar karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; asemptomatik taşıyıcılarda ve dizanteri geçirmiş vakalarda parazite karşı oluşan IgG seviyeleri serumda belli bir süre boyunca pozitif kalmaya devam etmektedir. Dolayısıyla serumda bu antikörlerin tespit edilmesi, geçmiş ve mevcut enfeksiyonları ayırt etmede yardımcı olmamaktadır (Jannati vd., 2024).

Diğer bir durum ise, çoğu ekstraintestinal amebiyazis vakasında eşzamanlı bir amebik kolit tablosunun olmamasıdır. Bu nedenle ekstraintestinal amebiyazis şüphesinde, eğer hasta gastrointestinal semptomlar göstermiyorsa dışkı mikroskopisi tanı açısından yetersiz kalmaktadır (Jannati vd., 2024).

2.9.1. Mikroskopik inceleme

Mikroskopik yöntemler; ucuz, hızlı ve basit olmaları sebebiyle amebiyazis tanısında uzun zamandır yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak *E. histolytica*'ya morfolojik olarak birebir benzeyen *E. dispar* ve *E. moshkovskii* gibi türleri ayırt etmek mümkün değildir. Bu nedenle direkt mikroskopik bakı tek başına tanısal değer taşımamaktadır (Jannati vd., 2024; Yakut & Özden, 2008).

Örnekler hem direkt olarak boyasız bakıda hem de lugol veya D'Antoni iodin gibi iyot içeren çözeltilerle boyanarak incelenebilir. İyot, nükleusların görünürlüğüne çok daha iyi hale getirmektedir (Saidin vd., 2019; Yakut & Özden, 2008).

Eritrosit fagosite etmiş trofozoitleri veya kistleri görmek parazitin laboratuvar tanısı açısından oldukça önemlidir ve *E. histolytica* lehine bir bulgu olarak değerlendirilir. Parazitin kist formu daha ziyade şekilli dışkılarda görülürken, trofozoitler ise kan, mukus ve püy içeren, şekilsiz dışkılarda karşımıza çıkmaktadır. Direkt boyasız bakılarda trofozoitlerin çekirdeklerini görebilmek oldukça zordur (Jannati vd., 2024; Kurt vd., 2019).

Direkt mikroskopik incelemede trofozoitleri hareketli şekilde görebilmek için dışının taze olması gereklidir. Hareketli trofozoitleri görebilmek için, örnek bir saat içerisinde laboratuvara ulaştırılıp incelenmeye alınmalıdır. Eğer hemen inceleme olanağı yoksa, dışkı polivinil alkol (PVA), Schaudinn fiksatif veya sodyum asetat-asetik asit-formalin (SAF) ile fikse edilmeli veya +4 °C’de saklanmalıdır. Bu şekilde trofozoitler 4 saate kadar hareketli olarak korunabilmektedir. Aksi takdirde hızla parçalanırlar (Das vd., 2022; Jannati vd., 2024).

İmmatür kistler, bir veya iki çekirdeği olup kromatoid cisimcikler ve glikojen vakuelleri içerirlerken, dört çekirdekli matür kistlerde bu yapılar kaybolmuştur. İyot içeren çözeltilerle immatür kistlerde bulunan glikojen vakuelleri koyu bir renkte boyanırlar. Ayrıca bu çözeltiler hem immatür hem de matür kistlerin çekirdeklerinin daha net görülebilmesi için kullanılırlar (Nowak vd., 2015; Yakut & Özden, 2008).

Ayrıca kümeler halinde eritrositler, Charcot-Leyden kristalleri gibi yapılar da mikroskopide görülebilen bulgulardır. Bu kristaller eozinofil ürünlerinin dejenerasyona uğramış kalıntılarıdır. Bir çalışmada, *E. histolytica* ile enfekte 10.000 hastanın dışkı örneği incelenmiş ve örneklerin %20’sinde Charcot-Leyden kristalleri pozitif bulunmuştur (Aegerter vd., 2021; Kurt vd., 2019).

Dışkı örneklerinin direkt incelenmesi hızlı ve kolay sonuç vermesi sebebiyle sıkça tercih edilmektedir. Ancak az sayıda kist veya trofozoit içeren örneklerde çeşitli yoğunlaştırma teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerin dayandığı temel esas fekal materyal ile parazit kisti arasındaki yoğunluk farkıdır. Yüzdürme ve çöktürme olmak üzere iki ana prensip mevcuttur. Çöktürme tekniklerinde kistten daha düşük dansiteye sahip hafif sıvılar kullanıldıktan sonra santrifüj yapılırken, yüzdürmede ise daha yoğun sıvılardan faydalanılarak kistlerin yüzmesi sağlanır. ZnSO₄, Sheather’s şeker yüzdürme, doymuş NaCl gibi yüzdürme; basit çöktürme ve Ritchie Formalin-Ether gibi çöktürme teknikleri uygulanmaktadır. *E. histolytica* tanısında Ritchie Formalin-Ether ve basit çöktürme yöntemleriyle, ZnSO₄ ve doymuş NaCl ile yüzdürme yöntemleri %100 uyumlu bulunmuştur. İntestinal amebiyazis tanısında herhangi birinin tercih edilebileceği bildirilmiştir (Çöplü vd., 2007).

Şekil, büyüklük ve çekirdek sayısı gibi morfolojik özelliklerin daha net ve ayrıntılı gözlemlenebilmesinde kalıcı boyama yöntemleri daha üstündür. Bu yöntemler sayesinde direkt mikroskopiyile gözden kaçması muhtemel pozitif hastalar da yakalanabilir. Ayrıca, bu kalıcı preparatlar uzun süre saklanarak eğitim materyali olarak değerlendirilebilir. Giemsa, Wright, metilen mavisi ve trikrom iodin gibi çeşitli boyalar kullanılabilir de rutinde trikrom ve demir hematoksilin gibi boyama yöntemleri önerilmektedir. Bunlar arasında ise en çok Wheatley trikrom boyama tercih edilmektedir. Trikrom boyama ve direkt mikroskopinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 1054 örnek için direkt mikroskopinin paraziti tespit etme oranı %61,8 iken trikrom boyama için bu oran %91,8 olarak bulunmuştur (Das vd., 2022; Kaplan, 1992; Yakut & Özden, 2008).

Ne var ki parazitin yalnızca morfolojik yapısı incelenebildiği için kalıcı boyama teknikleri de dahil olmak üzere hiçbir mikroskopik yöntem patojen *E. histolytica* ile apatojen *E. dispar*'ı ayırt etmede yeterli değildir (Kaplan, 1992). Bundan dolayı güncel tanı algoritmalarında boyalı ya da boyasız mikroskopik tanı yöntemleriyle *E. histolytica* lehine düşünülen örnekler, *E. histolytica/dispar* olarak raporlanmalıdır. Bu durumun tek istisnai durumu eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin görülmesidir. Eritrofagositoz uzun zamandır mikroskopik değerlendirmede *E. histolytica* için kesin tanı kriteri olarak kabul edilmiştir (Korkmaz & Ok, 2011; Tanyuksel & Petri, 2003).

Mikroskopi sonuçlarına olumsuz etkisi olan başka faktörler de bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; incelemeyi yapan kişinin yeterli deneyime sahip olmaması, örneğin laboratuvara iletilmesinde gecikme, örneğin uygunsuz şekilde alınması, hastanın yakın zamanda antibiyotik, antiasit, antidiyareik ilaçlar (bizmut, kaolin), lavman, purgatif, laksatif kullanmış olması, saklama koşullarına uyulmaması, örneklerin uygun bir fiksatifle muhafaza edilmemesi, kommensal yaşayan amip türlerinin varlığı, immotil trofozoitlerin polimorfonükleer lökositlerden, makrofajlardan ve epitel hücrelerden ayrımının zor olması gibi durumlardır (Das vd., 2022).

2.9.2. Kültür ve izoenzim analizi

Kültür için kullanılan besiyerleri ksenik ve aksenik olarak sınıflandırılmıştır. Ksenik besiyerleri de monofazik ve difazik olarak ikiye ayrılmıştır. *E. histolytica*'yı ilk kez 1925 yılında Boeck ve Drbohlav yumurta içeren ksenik besiyerinde üretmeyi başarmışlardır (Malatyalı & Özçelik, 2010).

Ksenik besiyerlerinde yapılan kültürlerde parazitin yanı sıra tanımlanmamış bir flora da bulunmaktadır. Aksenik kültürlerde ise parazit haricinde hiçbir canlı hücre bulunmaz (El-Dib, 2017).

Ksenik kültür için geliştirilmiş farklı besiyerlerinden; difazik Locke-egg, Robinson ve monofazik TYSGM-9 en sık tercih edilenlerdir. TYI-S-33 ve YI-S besiyerlerinin ise aksenik kültür için geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. *E. histolytica* kültürü; dışkı, rektal biyopsi örnekleri ve karaciğer apse drenaj materyalinden yapılabilir.

Karaciğer apse drenaj mayii genelde steril olduğu için ksenik bir kültür ortamında üretilmek istenirse, inokulasyondan önce besiyerine bir bakteri veya tripanazomatidin ilave edilmesi gerekir (Fotedar vd., 2007).

Entamoeba dispar ksenik kültürde üretilebilir; ancak çoğu izolat monoksenik kültürde zayıf üreme gösterir ve sadece birkaç suşun aksenik kültürde yaşayabilir olduğu bildirilmiştir, bu da *E. dispar*'ın partikül içermeyen bir ortamda besin elde etme konusunda *E. histolytica*'dan daha az yetenekli olduğunu düşündürmektedir (Fotedar vd., 2007).

E. histolytica'nın dışkı veya karaciğer apsesi gibi klinik örneklerden kültürü önemli oranda yanlış negatif sonuç vermesi ve teknik olarak zor olması dolayısıyla tercih edilmez. Klinik laboratuvarlarda *E. histolytica* kültürü rutin bir prosedür olarak uygulanabilir değildir ve duyarlılığı mikroskobiden daha düşüktür. Referans laboratuvarlarda dahi duyarlılık oranları %50-70 seviyelerinde kalmaktadır. Sürdürülmesi zor, pahalı ve yoğun emek gerektiren bir yöntemdir. Kültür sırasında bakteri, mantar veya diğer protozoonların aşırı çoğalması karşılaşılan ana sorundur. Bu nedenle kültür, *Entamoeba* türlerinin tespiti için rutin bir tanı prosedürü olarak önerilmez (Fotedar vd., 2007).

İzoenzim (zimodem) analizi, DNA tabanlı tekniklerin geliştirilmesinden önce *E. histolytica* alt gruplarını ayırt etmek için başvurulan klasik altın standart yöntemdir. Bu teknik sayesinde patojen *E. histolytica* ile apatojen *E. dispar* ayırt edilebildiği gibi her bir grup içerisindeki varyasyonları da tanımlama şansı doğmuştur (Mahmood, 2023).

Zimodem, bazı enzimler için aynı elektroforetik paterni gösteren bir grup amip varyantı veya suşu olarak tanımlanabilir. Zimodemler, malik enzim, glukoz fosfat izomeraz, heksokinaz ve fosfoglukomutaz izoenzimlerinin elektroforetik paternlerinden oluşur. Bugüne kadar toplam 24 farklı zimodem tanımlanmıştır, bunların 21'i insan izolatlarından (9'u *E. histolytica* ve 12'si *E. dispar*) elde edilmiştir (Mahmood, 2023).

Endemik bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda fayda sağlasa da; bu yöntem oldukça zaman alıcıdır ve başarısı kültürün başarısına bağlıdır. Kültür prosedürlerinde karşılaşılan bütün zorluklardan etkilenmektedir. Ayrıca, mikroskopıyla pozitif bulunmuş örnekler için negatif sonuçlar verebilmektedir (Mahmood, 2023; Taşbent, 2022).

Parazitleri kültürde üretmek için gereken tecrübe, teşhis sürecinin karmaşıklığı ve maliyet nedeniyle zimodem analizi rutin klinik laboratuvar çalışmalarına kolayca dahil edilemez. Günümüzde *Entamoeba* türlerini incelemek için; DNA tabanlı yöntemler, kültür ve izoenzim analizi yöntemlerinin yerini almıştır (Mahmood, 2023).

2.9.3. Antikor saptama yöntemleri

Hastalığın nadir görüldüğü gelişmiş ülkelerde antikor saptama yöntemleri, tanısal anlamda faydalı olabilmektedir. Ancak *E. histolytica* enfeksiyonlarının sık görüldüğü endemik bölgelerde geçirilmiş enfeksiyon ile halen devam eden akut enfeksiyonu ayırt etmede yetersiz kalmaktadır. Bunun nedeni ise enfeksiyon tamamen tedavi edilse bile antikorların serumda yıllarca pozitif kalabilmesidir (Fotadar vd., 2007; Taşbent, 2022).

Antikorların tespiti için indirekt hemaglutinasyon (IHA), lateks aglutinasyon, immünoelektroforez, karşı immünoelektroforez, amebik jel difüzyon testi, immünodifüzyon, tamamlayıcı fiksasyon, indirekt immünofloresan testi (IFA) ve ELISA dahil olmak üzere birçok farklı test geliştirilmiştir. Kompleman fiksasyon testleri diğerlerinden daha az duyarlı görünmektedir, uygulanması daha maliyetlidir ve çoğu laboratuvar tarafından kullanılmamaktadır. IHA'nın uygulanması kolaydır ve gastrointestinal semptomlar gösteren insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonlu hastalarda oldukça spesifik (%99,1) bir tanı aracı olduğu gösterilmiştir. Ancak, ELISA'ya kıyasla daha fazla yanlış negatif sonuç verebilmektedir (Fotadar vd., 2007).

İmmünoelektroforez, karşı immünoelektroforez ve immünodifüzyon yöntemleri agar jel membranında antikor ve antijenin presipite olma özelliğine dayanır. Ekstraintestinal *E. histolytica* enfeksiyonuna karşı gelişen antikorların karşı immünoelektroforez ile tespitinin zaman alıcı olduğu ancak invaziv amibiyozisli hastalarda yüksek bir duyarlılığa (100%) sahip olduğu gösterilmiştir. IFA ise geçirilmiş ve hali hazırda devam eden enfeksiyonu ayırt etme konusunda başarılı bulunmuştur. Ancak bu testin, kültür ve ardından antijen hazırlama konusunda beceri ve tecrübe gerektirmesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda uygulanması zordur (Fotadar vd., 2007).

ELISA, dünya çapında en sık başvurulan yöntemlerden biridir ve asemptomatik hastalarda anti-amebik antikorları tespit etmek ve epidemiyolojiyi ortaya koymak için kullanılmaktadır. Bu yöntemin özellikle amebik karaciğer apsesi olan hastaların tanısı için yeterli olduğu düşünülmekte olup laboratuvarında kolayca uygulanabilir.

Ayrıca, amebiyazis şüphesi olan ancak dışkıda organizma tespit edilemeyen intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonların tanısında da kullanılabilir. İntestinal amebiyazis hastalarının serumunda Gal/GalNAc lektine karşı gelişen IgM türündeki antikorlar, ELISA ile diğer amip türleriyle çapraz reaksiyon vermeden yüksek duyarlılık ve özgüllükle tespit edilmektedir. Ayrıca ELISA ile tükürük salgısında IgA tespiti de özellikle intestinal enfeksiyon tanısında faydalı bulunmuştur (Fotadar vd., 2007; Hooshyar & Rostamkhani, 2022).

2.9.4. Antijen saptama yöntemleri

Dışkı örneklerinde *E. histolytica* antijen tespitinde, sahip olduğu bazı önemli avantajlar sebebiyle ELISA yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. *E. histolytica* ile *E. dispar*'ı ayırt edebilmesi, yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermesi, deneyimli personel gerektirmemesi, hızlı ve objektif sonuç alınabilmesi, aynı anda çok sayıda örnek çalışılmasına imkan vermesi ve moleküler tekniklere göre daha ucuz olması gibi avantajları vardır (Beder & Taşbent, 2024).

Monoklonal antikorların kullanıldığı bu ELISA kitleri, parazite ait Gal/GalNAc lektini veya serinden zengin antijeni tespit edecek şekilde tasarlanmışlardır. Ancak dışkıya eklenen fiksatiflerin antijenleri parçalaması sebebiyle, yalnızca taze veya dondurulmuş örneklerde doğru sonuca ulaşılabilir. Bunlara ek olarak, araştırmalarda, lektinden zengin yüzey antijeni, lipofosfoglikan, tükürükte tespit edilen 170 kDa adherans lektin amebik antijen de tespit edilmiştir (Fotadar vd., 2007).

ELISA'ya ilave olarak dışkı da antijen tespiti için geliştirilmiş immünokromatografik testler de mevcuttur. Oldukça kolay uygulanabilmeleri ve hızlı bir şekilde sonuç vermeleri sebebiyle sınırlı imkanlara sahip laboratuvarlarda ve sahada kullanıma uygundur. Yalnızca *E. histolytica* antijenlerini tespit edebilen veya *E. histolytica* ile beraber *Giardia* ve *Cryptosporidia* gibi farklı parazitlerin antijenlerinin de tek seferde taranabildiği kitler mevcuttur. Ancak antijen saptamada gösterdikleri düşük performans ve patojen/apatojen suşların ayrımını yapamamak gibi dezavantajları vardır (El-Dib, 2017).

2.9.5. Moleküler tanı yöntemleri

E. histolytica'yı diğer *Entamoeba* türlerinden ayırt etme kabiliyeti ve yüksek duyarlılık gibi avantajları dolayısıyla çeşitli PCR teknikleri amebiyazisin moleküler tanısında güvenle kullanılmaktadır (Carrero vd., 2020).

E. histolytica'nın genomik düzeyde tanımlanması için farklı yöntemler kullanılsa da birçoğunda hedef gen sekansı, ribozomun küçük alt ünitesini kodlayan (SSU-rRNA) bölgedir. Bunun nedeni ise *E. histolytica* ile *E. dispar*'ın 18S rRNA genleri arasında yüksek derecede varyasyon olmasıdır (Hooshyar & Rostamkhani, 2022). Bu geni hedef alan PCR tekniklerinin, mevcut en iyi ELISA testinden 100 kat daha hassas olduğu ortaya konulmuştur (Morán vd., 2023). Etkeni tespit etmede gösterdikleri bu eşsiz performans nedeniyle PCR'ın amebiyazis teşhisinde altın standart olabileceği düşünülmektedir (Carrero vd., 2020).

Ayrıca, 16S benzeri rRNA, sistein proteaz 8 (CP8), serinden zengin *E. histolytica* proteini (SREHP), hemolizin (HLY6), adezin (adh112) ve aktin gibi proteinlerin kodlandığı genler de moleküler yöntemlerle hedeflenen diğer genlerdir (Calle-Pacheco vd., 2022; Carrero vd., 2020).

Entamoeba türlerinin tespiti ve ayırıcı tanısı için en çok kullanılan teknikler; konvansiyonel PCR, PCR-RFLP, nested PCR, multipleks PCR, nested multipleks PCR, real-time PCR ve döngü aracılı izotermal amplifikasyon testi (LAMP)'dir. Bu teknikler; ksenik-aksenik kültürler, dışkı, karaciğer apse drenaj mayi, idrar, kan, tükürük, biyopsi ve otopsi örneği gibi materyallere uygulanabilmektedir (Ali, 2015; Hooshyar & Rostamkhani, 2022).

Günümüzde, yüksek maliyetli, uzun zaman alan, kantitatif olmayan sonuçlar veren ve yanlış pozitif sonuç verme ihtimalinin daha fazla olduğu konvansiyonel PCR yerine real-time PCR tercih edilmektedir. Real-time PCR yöntemi, PCR sonrası kontaminasyon ve buna bağlı yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldırmıştır. Ayrıca kantitatif sonuç verebilmesi ve konvansiyonel PCR ile tespit edilemeyen çok düşük miktarlardaki parazit genomunu tespit ederek tanısal duyarlılığı artırması gibi avantajları da bulunmaktadır (Hooshyar & Rostamkhani, 2022).

Dışkıda bulunabilen çeşitli inhibitörler nedeniyle PCR sonuçları olumsuz etkilenebilir. Bu nedenle dışkıdan parazite ait nükleik asitlerin ekstraksiyonu noktasında birtakım geliştirmeler yapılmıştır. Bu amaçla PCR inhibitörlerini elimine edebilen ekstraksiyon kitleri üretilmiştir. Böylece duyarlılık önemli ölçüde artırılmaktadır (Hooshyar & Rostamkhani, 2022).

Son yıllarda moleküler biyoloji tabanlı yöntemler izlenen adımların daha basit hale gelmesi, artan duyarlılık ve özgüllük avantajları nedeniyle amebiyazis teşhisi için altın standart olarak kabul edilmiştir. Ancak bu yöntemlerin yüksek maliyetleri, zaman alıcı olabilmeleri ve özel ekipman gerektirmeleri gibi dezavantajları dolayısıyla gelişmekte olan ülkelerde laboratuvar rutininde yaygın kullanım alanı bulamamaktadır (Hooshyar & Rostamkhani, 2022).

2.10. Ayırıcı Tanı

Amebiyazisin ayırıcı tanısında süreç; öykü, klinik semptomlar, fizik muayene bulguları, radyolojik görüntüleme ve seroloji ışığında kapsamlı bir şekilde yönetilmelidir (Pritt & Clark, 2008).

Dizanteriye neden olan *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, enteroinvaziv *E. coli*, enterohemorajik *E. coli* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi bakteriyel; *Schistosoma mansoni* ve *Balantidium coli* gibi paraziter enfeksiyonlara ek olarak; inflamatuvar bağırsak hastalıkları, karsinomalar, iskemik kolit, divertikülit gibi enfeksiyöz olmayan hastalıklar amebik kolit ile benzer şikayetlere neden olabilmektedir. Bu nedenle bakteriyel etkenlerden ayırım yapılabilmesi için dışkı kültüründen ve toksin testlerinden faydalanılabilir. Ayrıca, *Schistosoma mansoni* veya *Balantidium coli* enfeksiyonlarında mikroskopide bu parazitlere ait yumurtalar görülebilir (Harries, 1982; Pritt & Clark, 2008; Shirley vd., 2020).

Amebik karaciğer apsesi ise bakteriyel apse, ekinokokal kist, tüberküloz, metastatik veya primer karaciğer tümörleri gibi farklı tedaviler gerektiren tablolarla karışabilir. Radyoloji, enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz etiyolojileri ayırmada oldukça faydalıdır ancak bakteriyel ve amebik apse ayırımında yetersiz kalabilmektedir. Tamamen güvenilir olmamakla beraber bakteriyel apselerle karşılaştırıldığında amebik apse; karaciğerin genelde sağ lobunda, soliter ve subkapsüler yerleşimlidir. Ayrıca, bu apselerden bilgisayarlı tomografi veya ultrason eşliğinde ince iğne ile elde edilen aspirat ile kültür ve antijen tespiti için ELISA testi yapılabilir. Nadiren, plöretik ağrı, öksürük ve dispne ile kendini gösterebilmesi nedeniyle pnömoni ile ayırımının yapılması gerekebilir (Pritt & Clark, 2008; Türkdoğan, 2004).

2.11. Tedavi

Asemptomatik taşıyıcılar, süreç içerisinde %10 oranında invaziv amebiyazise dönüşme riski taşımakla beraber parazitin sağlıklı insanlara bulaşmasında rezervuar görevi görmektedirler. Bu nedenle asemptomatik olsa da dışkıda kanıtlanmış *E. histolytica* varlığı olan her hastanın tedavi edilmesi gerektiği bildirilmektedir.

Bazı yayınlarda ise parazitözün endemik olduğu bölgelerde sadece semptomatik vakaların tedavi edilmesi önerilmektedir (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Saygı, 2009b; Türkdoğan, 2004).

Amebiyazisin klinik formuna ve semptomların ciddiyet derecesine göre farklı amebisid ilaçlar kullanılabilir. Tedavide sistemik etkili doku amebisidleri ve bağırsak lümeninde etkili luminal amebisidler olmak üzere iki grup ilaçtan yararlanır. Paramomisin, iyodokinol, diloksanid furoat ve nitazoksanid luminal; emetin, dihidroemetin, klorokin, metronidazol ve tinidazol ise doku etkili ajanlardır (Morán vd., 2023).

Luminal ilaçlar, bağırsak boşluğunda etkinlik göstererek kistleri elimine ederler. Bu grup, asemptomatik kolonizasyon tedavisinde önerilir. Paramomisin, kısa süre içerisinde etki göstermesi ve düşük yan etki potansiyeli nedeniyle bu grupta bulunan ilaçlar arasında en sık tercih edilenidir. Bağırsaklardan emiliminin olmaması ve lümeninde bulunan trofozoitlere de etki edebilmesi nedeniyle gebelerde kullanılmaktadır. Kramp tarzında karın ağrısı, diyare ve bulantı en sık görülen yan etkileridir (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Türkdoğan, 2004).

İnvaziv amebik kolit ve ekstraintestinal amebiyazis tedavisinde temel ilaçlar nitroimidazoller (metronidazol, tinidazol, seknidazol, ornidazol)'dir. Ancak parazitin yalnızca trofozoit formuna etki gösterirler, kistlere karşı etkisizdirler. Tinidazol, seknidazol ve ornidazolün uzun yarılanma ömürleri sayesinde tedavi daha kısa sürer ve daha iyi tolere edilirler. Buna rağmen metronidazol, hızlı bağırsak emilimi, mükemmel biyoyararlanımı, doku ve apseye penetrasyonu nedeniyle en sık tercih edilen ajandır (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Kantor vd., 2018; Pritt & Clark, 2008). Bir ön ilaç olan metronidazol, parazitin tiyoredoksin redüktaz enzimi ile çeşitli reaktif moleküllere indirgenir ve bu metabolitler parazit için toksiktir (Li vd., 2021).

Metronidazol tedavisi sırasında bulantı, kusma, baş ağrısı, ağızda metalik tat oluşması gibi hafif; anoreksiya ve ataksi gibi ciddi yan etkiler görülebilir (Morán vd., 2023). Ayrıca yalnızca nitroimidazol verilen vakalarda tedavi sonrası %40-60 oranında intestinal lümende persiste eden parazitler kalabilir. Bu nedenle 10 günlük bir tedavi sonrası relapsı önlemek adına hastalara paramomisin verilmelidir (Kantor vd., 2018). Yan etkilerin şiddetlenebilmesi sebebiyle paramomisin ve metronidazol aynı anda kullanılmamalıdır (Türkdoğan, 2004).

Amebik kolit gibi amebik karaciğer apsesi de büyük oranda metronidazol ve paramomisin ile gerçekleştirilen medikal tedaviye cevap verir. Vakaların yalnızca %15'inde perkütan drenaja ihtiyaç duyulur. Ancak, antiamebik tedaviye 5 ila 7 gün içerisinde yanıt alınamadığında, apsenin sol lobda lokalize olması ve 5 cm'den büyük bir çapa sahip olması gibi rüptür riskinin yüksek olduğu durumlarda ve amebik plevral effüzyonda drenaj düşünülebilir. Görüntüleme kılavuzluğunda perkütan iğne aspirasyonu veya kateter drenajı tercih edilen prosedürlerdir (Kantor vd., 2018; Pritt & Clark, 2008; Usuda vd., 2022).

Fulminant amebik kolit geliştiği takdirde, bakteriyel translokasyonu önlemek amacıyla tedaviye geniş spektrumlu antibiyotikler eklenmelidir. Toksik megakolon ve akut karın belirtileri gösteren hastalarda cerrahi müdahaleler de gerekebilmektedir (Kantor vd., 2018).

Gelişmekte olan, maddi kaynakları kısıtlı endemik ülkelerde standart ancak optimal olmayan yaklaşım, dışkıında trofozoit veya kist görülen tüm hastaları tür belirlemek için ek testler yapmaksızın tedavi etmektir. Ne var ki bu yaklaşım aşırı ilaç kullanımı sonucu direnç gelişimine neden olmaktadır (Ben Ayed & Sabbahi, 2017; Pritt & Clark, 2008). Amebiyazisin tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç olan metronidazolün amebisidik konsantrasyonlarının laboratuvar koşullarında parazit direncini indüklediği görülmüştür. İlaç direncinin, demir içeren süperoksit dismutaz ve peroksiredoksin ekspresyonunun artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlara paralel olarak bazı *E. histolytica* izolatlarında kısmi metronidazol direnci tespit edilmiştir (Li vd., 2021).

50 yılı aşkın bir süredir amebiyazis tedavisinde başarıyla kullanılan metronidazole karşı gelişmesi muhtemel direnç nedeniyle çeşitli terapötik alternatifler araştırılmaktadır. Bu bağlamda *E. histolytica*'nın sistein proteaz, kitinaz gibi enzimlerine ek olarak L-sistein ve poliamin sentezi gibi metabolik yolları hedef alınmaktadır (Li vd., 2021).

2.12. Korunma

Amebiyazisten korunma ve enfeksiyonun kontrolü için birincil olarak; hijyen alışkanlıklarının iyileştirilmesi ve su arıtma sistemlerinin geliştirilmesi gibi temel önlemlerle fekal-oral maruziyet riski azaltılmalıdır (Morán vd., 2023). Etken bulaşını azaltmak için, insan atıklarının doğru şekilde bertaraf edilmesi, temiz suya erişimin sağlanması ve enfeksiyon hakkında farkındalığın artırılması gerekmektedir. Tuvalet kullanımı sonrası ve yiyecek hazırlama öncesi elleri yıkamak için sabun ve su kullanılmalı, çiğ tüketilen sebze ve meyveler iyice yıkanmalıdır. Ayrıca bulaş yollarından biri olması bakımından güvenli seksüel aktivite teşvik edilmelidir (Danish vd., 2023; Morán vd., 2023).

Tüm bu önlemler sayesinde hastalıktan korunmak basit gibi görünse de gelişmekte olan ülkelerin yoksul bölgelerinde bu imkanları sağlayacak temel altyapı oldukça yetersizdir. Bu nedenle, hükümetlerin ve sağlık kuruluşlarının, amip bulaşını önlemek ve enfeksiyon insidansını azaltmak için gerekli koşulları ve altyapıyı sağlamak için büyük çabalar sarf etmesi gerekmektedir (Morán vd., 2023).

Bahsedilen tedbirlere ilave olarak, *E. histolytica* enfeksiyonundan korunmada geliştirilecek bir aşı, yan etki profili açısından ilaçlara göre daha güvenilir olması, maliyet-etkin ve uzun süreli bir koruma sağlaması bakımından oldukça önemlidir (Li vd., 2021). Ne yazık ki, şimdiye kadar bu hastalığa karşı bir aşı elde etmek mümkün olmamıştır. Ancak, son zamanlarda yapılan birçok aşı geliştirme çalışması umut verici görünmektedir (Morán vd., 2023).

2.13. Aşı Çalışmaları

E. histolytica'ya karşı geliştirilecek ideal bir aşı, uzun vadeli bir immünolojik hafıza sağlamalı, güvenli olmalı, çocuklara uygulanabilmeli, amebik kolit ve amebik karaciğer apsesine karşı koruyucu olmalıdır. Teorik olarak aşılama *E. histolytica* enfeksiyonunu önleyebilir, ancak bazı majör zorluklar nedeniyle henüz onay alabilen ideal bir aşı yoktur (Oryakhil vd., 2021).

Konak savunma yanıtında özellikle sekretuar IgA başta olmak üzere mukozal immünglobülinlerin önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Ayrıca, serumunda antiamebik antikoları pozitif olan kişilerde reenfeksiyonun daha az görüldüğü saptanmıştır. Buradan hareketle özellikle endemik coğrafyalarda mortalite-morbidite oranlarının azaltılması ve

salgınların önlenmesi için etkili bir aşı geliştirilmesi büyük öneme sahiptir (Kantor vd., 2018; Türkdoğan, 2004).

Parazitin Gal/GalNAc lektininin doğal ve rekombinant formları kullanılarak yapılan aşılama çalışmalarında, bileşiğin hayvanları bağırsak ve karaciğer amebiyazisine karşı koruyabildiği gösterilmiştir (Li vd., 2021). Kolera toksin B alt birimi immünojenik olması, düşük toksisite dinamikleri ve mukozal Th2 hücrelerini uyarabilmesi nedeniyle adjuvan olarak denenmektedir (Oryakhil vd., 2021).

Nitekim, babunlar üzerinde yapılan bir araştırmada, kolera toksin B alt birimi, Gal-lektin birlikte uygulandığında *E. histolytica* reenfeksiyonuna karşı anlamlı, orta düzeyde koruma sağlanmıştır. Aşılanan babunlarda daha yüksek intestinal antipeptid IgA, intestinal antilektin IgA ve serum antipeptid IgG antikor titreleri gösterilmiş ve takip kolonoskopilerinde inflamatuvar kolit veya amebik invazyon gözlenmemiştir (Abd Alla vd., 2012).

Hayvan modellerinde elde edilen bu başarı, uygulanabilir bir insan aşısı geliştirmenin mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Ancak ne yazık ki, başarılı bir aşının ayırt edici özelliği olan uzun süreli immünolojik hafızanın indüklenmesi henüz hayvan modellerinde gösterilememiştir (Kantor vd., 2018).

Serinden zengin protein, 29 kDa redüktaz antijeni, heparin sülfat bağlayan protein (HSBP), 30 kDa kollajen bağlayan protein (CBP30) gibi Gal/GalNAc lektin harici diğer komponentler de etkin bir aşı üretimi için üzerinde çalışılan diğer hedeflerdir (Li vd., 2021; Oryakhil vd., 2021).

E. histolytica'ya karşı başarılı bir aşının geliştirilmesi aşamalarında, hedef immünojenik proteinleri tanımlamanın yanı sıra, doz ve adjuvan optimizasyonu için çok sayıda çalışma yapılması gerekmektedir (Gardiner vd., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul ve Proje Desteği Bilgileri

Bu tez çalışması, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 17 Kasım 2023 tarihinde değerlendirilerek 2023/4629 sayılı kararla onaylanmıştır. Proje numarası 24TU18001 olan bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

3.2. Hasta Seçimi

Çalışmamıza Kasım 2024-Mart 2025 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi'ne ishal şikayetiyle başvuran hastalardan seçilen 96 dışkı örneği dahil edildi. Çeşitli servis ve polikliniklerden laboratuvarımıza gönderilen bu örnekler seçilirken belirli kriterler gözetildi. İntestinal amebiyazis şüphesiyle gönderilen, sulu, şekilsiz, kanlı ve/veya mukuslu olan dışkı örnekleri çalışmaya dahil edilirken, sert ve şekilli olanlar çalışma dışı bırakıldı. Hastalara ait klinik bulgular ve demografik verilere ulaşmak için laboratuvar veri sisteminden yararlanıldı.

Seçilen tüm örneklere; direkt mikroskopi, Wheatley trikrom boyama, ELISA ve multipleks real-time PCR yöntemleri uygulanarak *E. histolytica* varlığı araştırıldı.

3.3. Laboratuvar Çalışma Basamakları

Dışkı numuneleri ağız geniş, vida kapaklı, şeffaf kaplar içerisinde laboratuvarımıza ulaştırıldı. Gelen örnekler makroskobik olarak değerlendirilip uygun görülenler vakit kaybetmeksizin Wheatley trikrom boyama prosedürüne alındı. Örneklere bir yoğunlaştırma yöntemi olan doymuş NaCl ile yüzdürme tekniği uygulanıp ayrı bir preperat hazırlanarak direkt mikroskobik incelemeler yapıldı. Trikrom ile boyanan kalıcı preperatlar x100'lük, direkt mikroskopi için hazırlanan preperatlar ise x40'lık büyütme ile incelendi.

Ayrıca örnekler, mikroskopi çalışmalarıyla eşzamanlı olarak herhangi bir solüsyon veya fiksatif ilave edilmeden ELISA ve PCR çalışmaları için saklanmak üzere ayrı eppendorf tüplerine aktararak -80 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra tüm örneklere ELISA ve PCR testleri uygulandı.

3.3.1. Mikroskopik inceleme

3.3.1.1. Direkt mikroskopik inceleme

Seçilen tüm örneklere direkt mikroskopik bakı öncesi olası paraziter etkenlerin görülme ihtimalini artırmak üzere doymuş NaCl ile yüzdürme tekniği uygulandı. Bu yöntem için ticari Para-Set Float parazitolojik tanı amaçlı yüzdürme seti (Oytaş, Türkiye) kullanıldı (Şekil 3.1). Doymuş NaCl çözeltisi, 1 litre distile suda 375 gram NaCl çözülerek hazırlandı.

Yöntemin uygulanması:

Set içerisindeki filtreli aparatla bir miktar dışkı örneği alınarak, ters çevrilmiş kapak içerisinde 4-5 mL doymuş NaCl çözeltisi ile karıştırılıp homojenize edildi. Ardından kabın hazne kısmı takılıp set düz şekilde konarak örneğin filtreden süzülmesi sağlandı. Süzme aşamasından sonra haznenin tamamı doymuş NaCl çözeltisi ile tepeleme dolduruldu. Üzerine bir lam kapatılarak 30 dakika beklendi. Hazırlanan bu lam üzerine lugol çözeltisi damlatıldıktan sonra lamel kapatılarak mikroskopta x40'lık büyütme ile incelendi. Görülen şüpheli *E. histolytica/dispar* yapıları ve olası diğer parazitolojik etkenler not edildi.



Şekil 3.1. Para-set float parazitolojik tanı amaçlı yüzdürme seti

3.3.1.2. Wheatley trikrom boyama yöntemi

Yöntemin uygulanmasında hazır olarak satılan ticari bir boyama kiti (GBL, Türkiye) kullanıldı. Boya aşamaları kit içerisinde yer alan kılavuza uygun şekilde gerçekleştirildi.

Kit içeriğinde bulunan reaktifler:

- Schaudinn fiksatif
- Alkolik çözelti
- İyot solüsyonu
- Wheatley trikrom boyası
- Asetik etanol

Boyama öncesi 12 adet cam şale hazırlanarak etiketlendi ve numaralandırıldı. Ardından şalelere sırasına göre reaktifler konuldu.



Şekil 3.2. Wheatley trikrom boyama için hazırlanan şaleler ve reaktifler

%70'lik alkol içerisinde demli çay veya amber rengi elde edilene kadar stok iyot solüsyonundan ilave edilerek reaktiflerden biri olan iyot çalışma solüsyonu hazırlandı. Solüsyon ışık almayacak şekilde saklandı ve her hafta yenilendi.

Örnekten, bir aplikatör çubuk yardımıyla iki adet temiz lam üzerine yayma yapıldı. Yaymaların kalınlığı makroskobik olarak kontrol edildi. Çok ince veya çok kalın olmamasına özen gösterildi.

Yaymalar hazırlandıktan sonra boya aşamalarına geçildi:

- Schaudinn fiksatif (Yaymalar kurumadan hızlı bir şekilde Schaudinn fiksatif içerisine konuldu. En az 30 dakika fiksatif içerisinde bırakılarak sabitlendi. Bazı durumlarda yaymalar bir gece fiksatif içinde bırakıldı.
- Alkolik çözelti (5 dakika)
- İyot çalışma solüsyonu (2 dakika)
- Alkolik çözelti (3 dakika)
- Alkolik çözelti (3 dakika)
- Wheatley trikrom boyası (10 dakika)
- Asetik etanol (2-3 saniye batırılıp çıkarıldı)
- %100 alkol (Çalkalama yapıldı)
- %100 alkol (5 dakika)
- %100 alkol (5 dakika)
- Ksilen (5 dakika)
- Ksilen (5 dakika)

Boyama kalitesini arttırmak için lamalar bir reaktiften diğerine aktarılırken, öncekinden arta kalan damlalar bir kurutma kağıdına emdirilerek bir sonraki reaktifin kirlenmemesine dikkat edildi. Yaymalar kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskop altında x100'lük büyütmeyle incelendi.

3.3.2. ELISA

Çalışmaya alınan tüm dışkı numuneleri *E. histolytica*'ya özgü adezin antijenini tespit etmek için geliştirilmiş *Entamoeba* CELISA Path (Cellabs, Avustralya) kiti ile araştırıldı. Çalışma basamakları üretici firmanın hazırlamış olduğu kılavuza uygun olarak gerçekleştirildi. Kit içeriğinde bulunan reaktifler aşağıdaki gibidir:

- Her birinde 8 kuyu bulunan 12 adet mikroparka strip
- Dilüent (40 mL)
- Konsantre yıkama solüsyonu (50 mL)
- Pozitif kontrol (3,5 mL)
- Konjugat (7 mL)
- Substrat (14 mL)
- Stop solüsyonu (7mL)



Şekil 3.3. ELISA kit içeriği

Kitin çalışma prensibi şu şekildedir: Kit içeriğinde bulunan mikroplaka kuyularının iç yüzeyinde *E. histolytica* adezin antijenini bağlayan immobilize poliklonal antikorlar bulunmaktadır. Örnek ve konjugat (*E. histolytica* adezinine spesifik monoklonal antikor konjuge edilmiş enzim) adezinin bu antikorlarla bağlanabilmesi için bu kuyulara konularak inkübe edilir. Eğer örnekte adezin antijeni varsa enzim-antikor-antijen kompleksi oluşur. Daha sonra yıkama işlemiyle kuyular bağlanmayan dışkı partiküllerinden temizlenir, ancak oluşan kompleks uzaklaştırılmaz. Substrat eklenmesiyle gelişen reaksiyon sonucu kuyuda bulunan kompleks miktarıyla orantılı bir renklenme meydana gelir.

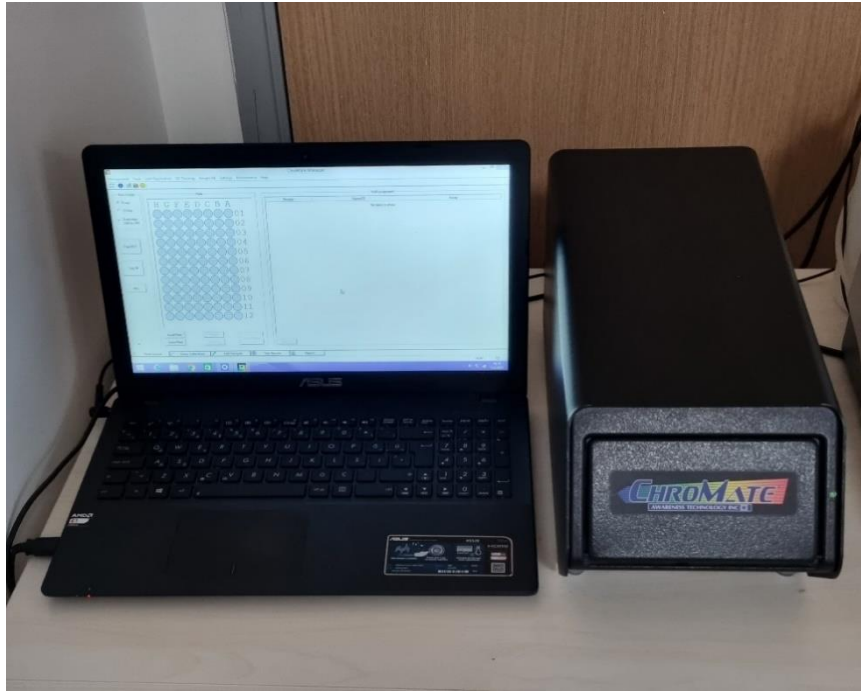
Testin uygulanma basamakları:

1. ELISA çalışması için daha önce dondurularak saklanan örnekler kullanıldı. Tüm örnekler çalışmaya alınmadan önce homojenizasyon için vortekslendi. Dilüsyon aşaması için her biri bir örneğe karşılık gelecek şekilde numaralandırılmış eppendorf tüpler hazırlandı. Şekilsiz ancak sulu olmayan örneklerden 0,2 gr, sulu örneklerden 400 μ L alınarak bu tüpler içerisinde 400 μ L dilüentle karıştırıldı. Bu karışım 10 saniye kadar vortekslendi.
2. Her hasta örneği için ayrı bir kuyu, pozitif ve negatif kontroller için de birer kuyu kullanıldı.
3. Pozitif ve negatif kontrol kuyuları da dahil olmak üzere tüm kuyulara bir damla konjugat konuldu.

4. Pozitif kontrol kuyusuna bir damla pozitif kontrol solüsyonu, negatif kontrol kuyusuna ise 100 µL dilüent konuldu. Diğer kuyulara vortekslenen dilüe hasta örnekleri eklendi. Bu işlem sırasında her bir kuyuya 200 µL örnek mikropipet yardımıyla aktarıldı. Kontaminasyonu önlemek için her örneğe ayrı pipet ucu kullanıldı.
5. Plağın üstü yapışkan şeffaf bir bantla veya plastik bir kapakla kapatılarak karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası plaka içeriği boşaltıldı. Otomatize Combiwash (Human Diagnostics, Almanya) cihazında tüm kuyular %5'lik dilüe yıkama solüsyonuyla 4 kez yıkandı. Yıkama sonrası kalan damlalar plaka ters çevrilip temiz kağıt havlulara vurularak uzaklaştırıldı.
7. Ardından her kuyuya 2 damla substrat koyularak yine karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
8. Bu sürenin ardından son olarak her kuyuya bir damla stop solüsyonu eklendi. İki dakika beklendikten sonra kuyular renk değişimi açısından ChroMate 4300 PC Controlled Elisa Microplate Reader (Awareness Technology Inc., ABD) cihazında 450/620 nm'de analiz edildi.
9. Analiz sonucu $OD_{450/620} \geq 0,90$ örnekler pozitif kabul edildi.



Şekil 3.4. Otomatize ELISA mikrolaka yıkama cihazı



Şekil 3.5. ELISA mikrolaka okuma cihazı

3.3.3. PCR

-80 °C’de muhafaza edilen örnekler çalışma öncesi oda sıcaklığına getirildi. DNA ekstraksiyonu için QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanıldı. Üretici firmanın önerileri dikkate alınarak yapılan çalışmaya tüm dışkı örnekleri dahil edildi.

Ekstraksiyon sonrası örnekler bir multipleks real-time PCR kiti olan Bio-Speedy Gastroenterit qPCR MX-6T Parazitik Panel (Bioeksen, Türkiye) ile çalışıldı.

3.3.3.1. Nükleik asit ekstraksiyonu

Kit içeriği şu şekildedir:

- QIAamp DNA mini spin kolon
- InhibitEX Buffer
- Proteinaz K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer ATE



Şekil 3.6. QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Almanya)

Ekstraksiyon basamakları:

1. Dışkı örneklerinden 180-220 mg kadar (örnek sulu ise 200 µL) alınarak 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu.
2. Tüm örnekler 1 mL InhibitEX Buffer ilave edilip 1 dakika boyunca veya örnek tamamen homojenize oluncaya dek vortekslendi.
3. Bu süspansiyon 5 dakika boyunca 70°C'de ısıtıldı. Zor parçalanmış örnekler için sıcaklık 95°C'ye çıkarıldı ve ardından 15 saniye vortekslendi.
4. Dışkı partiküllerini çöktürmek için örnekler 1 dakika santrifüj edildi.
5. 15 µL Proteinaz K, 2 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
6. Santrifüj edilen örneğin üzerindeki süpernatant kısmından 200 µL alınarak Proteinaz K içeren tüpe pipetlendi.
7. Aynı tüp içerisine 200 µL Buffer AL de konduktan sonra 15 saniye vortekslendi. Homojen bir karışım elde edildi.
8. 70°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Daha sonra tüpün içerisine 200 µL etanol (%96-100) pipetlenerek vortekslendi.
10. Oluşan bu 600 µL hacmindeki lizat QIAamp spin kolona aktarıldı. Spin kolon kapağı kapatılarak 1 dakika santrifüj edildi.
11. QIAamp spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren tüp atıldı.
12. Spin kolon dikkatlice açılarak içine 500 µL Buffer AW1 eklendi. 1 dakika santrifüj edildi. Ardından spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren tüp atıldı.
13. Spin kolon tekrar dikkatlice açılarak içine bu kez 500 µL Buffer AW2 eklendi. 3 dakika santrifüj edildi.
14. Santrifüj sonrası spin kolon yeni 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Tekrar 3 dakika santrifüj edildi.
15. Ardından spin kolon yeni 1,5 mL tüpe konduktan sonra içine 200 µL Buffer ATE direkt olarak QIAamp membranına pipetlendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
16. İnkübasyon sonrası DNA'yı ayrıştırmak için 1 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen tüm izolatlar, PCR çalışması için -20 °C'de muhafaza edildi.

3.3.3.2. Multipleks real-time PCR

Örnekler, bir multipleks real-time PCR kiti olan Bio-Speedy Gastroenterit qPCR MX-6T Parazitik Panel (Bioksen, Türkiye) ile çalışıldı. Üretici firmanın önerileri dikkate alınarak yapılan çalışmaya tüm örnekler dahil edildi.

Kit ile *E. histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis* ve *Cyclospora cayetanensis* varlığı aşağıda verilen gen bölgeleri üzerinden araştırıldı.

Entamoeba histolytica: 18S ribozomal RNA

Giardia intestinalis: Beta giardin geni

Cryptosporidium spp.: Ookist duvar proteini geni

Dientamoeba fragilis: ITS (Internal transcribed spacer)

Blastocystis hominis: 18S ribozomal RNA

Cyclospora cayetanensis: ITS (Internal transcribed spacer)

Kit içeriği şu şekildedir:

- qPCR Mix
- GCE Oligo Mix (*G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*)
- DBC Oligo Mix (*D. fragilis*, *B. hominis*, *C. cayetanensis*)
- NTC
- PC Mix



Şekil 3.7. Bio-Speedy Gastroenterit qPCR MX-6T Parazitik Panel Kiti

PCR kurulumu: Ekstrakte edilen örnekler $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak oda sıcaklığına getirildi. Çalışma, GCE oligo mix ve DBC oligo mix kullanılarak iki ayrı reaksiyon şeklinde hazırlandı.

1. PCR plakası pozitif ve negatif kontroller de dahil olmak üzere tüm örnekler için numaralandırıldı. Her kuyuya sırasıyla $10\text{ }\mu\text{l}$ qPCR mix ve $5\text{ }\mu\text{l}$ oligo mix pipetlendikten sonra pozitif kontrol kuyusunda $5\text{ }\mu\text{l}$ PC, negatif kontrol kuyusuna $5\text{ }\mu\text{l}$ NTC ve kalan her kuyuya sırasıyla $5\text{ }\mu\text{l}$ örnek eklendi.
2. Plakanın üzeri dikkatlice kapatılıp LightCycler 96 (Roche, İsviçre) cihazına yerleştirildi. Reaksiyon basamakları için cihaz ayarları, kit üreticisinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. PCR için kullanılan thermal cycler protokolü

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
Enzim aktivasyonu	1 döngü	52 °C	3 dakika
Bekleme	1 döngü	95 °C	10 saniye
Denatürasyon	12 touchdown döngüsü: Döngü başına bağlanma	95 °C	1 saniye
Bağlanma/uzama	sıcaklığında 1 °C azalma	67 °C - 56 °C	15 saniye
Denatürasyon	35 döngü	95 °C	1 saniye
Bağlanma/uzama		55 °C	15 saniye
Tespit (okuma)			(FAM-Yeşil, HEX-Sarı, ROX-Turuncu, CY5-Kırmızı)

3. Araştırılan etkenlerin PCR cihazındaki tespit kanalları ise şu şekildedir:

GCE oligo mix ile çalışılan reaksiyon için;

- FAM: *Giardia intestinalis*
- HEX: İnsan (IC - internal kontrol)
- ROX: *Entamoeba histolytica*
- CY5: *Cryptosporidium spp.*

DBC oligo mix ile çalışılan reaksiyon için;

- FAM: *Dientamoeba fragilis*
- ROX: *Blastocystis hominis*
- CY5: *Cyclospora cayetanensis*



Şekil 3.8. LightCycler 96 cihazı (Roche, İsviçre)

PCR sonuçlarının değerlendirilmesi: PCR sonuçlarını değerlendirmede belirli bazı kriterler mevcuttur. Öncelikle pozitif kontrol grafiğinin threshold çizgisini keserek sigmoidal bir eğri oluşturması gerekir. Kontaminasyon olmadığından emin olmak için ise negatif kontrol eğrisinin threshold çizgisinin altında kalması ve çizgiyi kesmemesi gerekmektedir. Ayrıca internal kontrolün de pozitif sigmoidal bir eğri oluşturması beklenir. Pozitif örnekler, threshold çizgisini kesip üzerine çıkarak pozitif kontrol grafiğine benzer sigmoidal bir eğri oluştururlar. Bu şekilde threshold çizgisinin üzerine çıkmayan veya sigmoidal eğri oluşturmayan örnekler negatif kabul edilmelidir.

3.4. İstatistiksel Analiz

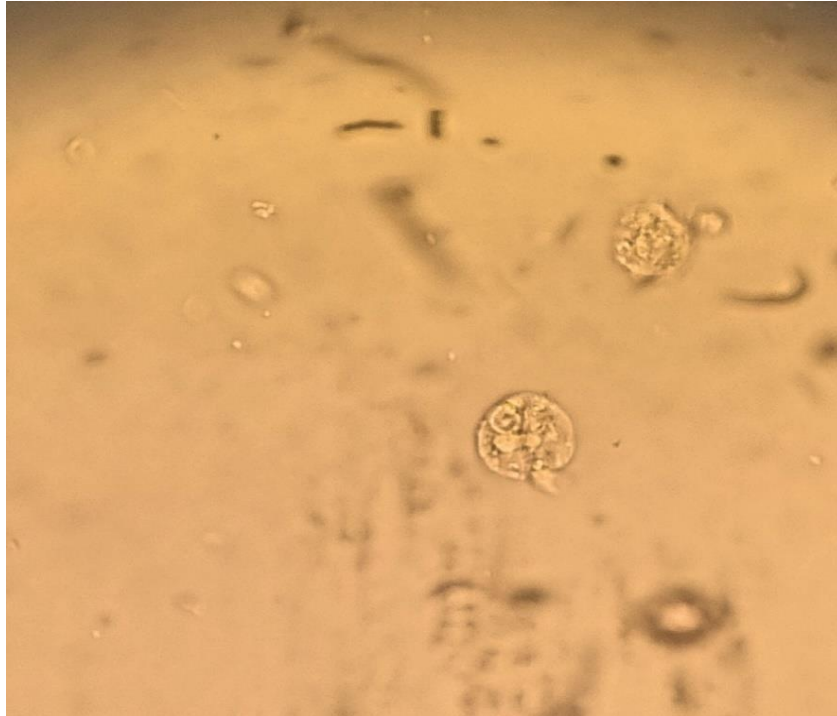
Çalışmalar sonucu elde edilen verilerin analizinde SPSS Statistics 27 (IBM, ABD) programından yararlanılmıştır. Sayısal verilerin özetlenmesinde ortalama ve standart sapma değerleri; kategorik verilerin özetlenmesinde sayı ve yüzde değerleri kullanılmıştır. Cinsiyet ve yaş gruplarına göre test sonuçlarının karşılaştırılmasında ki-kare testine başvurulmuştur. Duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve testin doğruluk oranı; %95 güven aralığıyla yüzde olarak belirtilmiştir.

4. BULGULAR

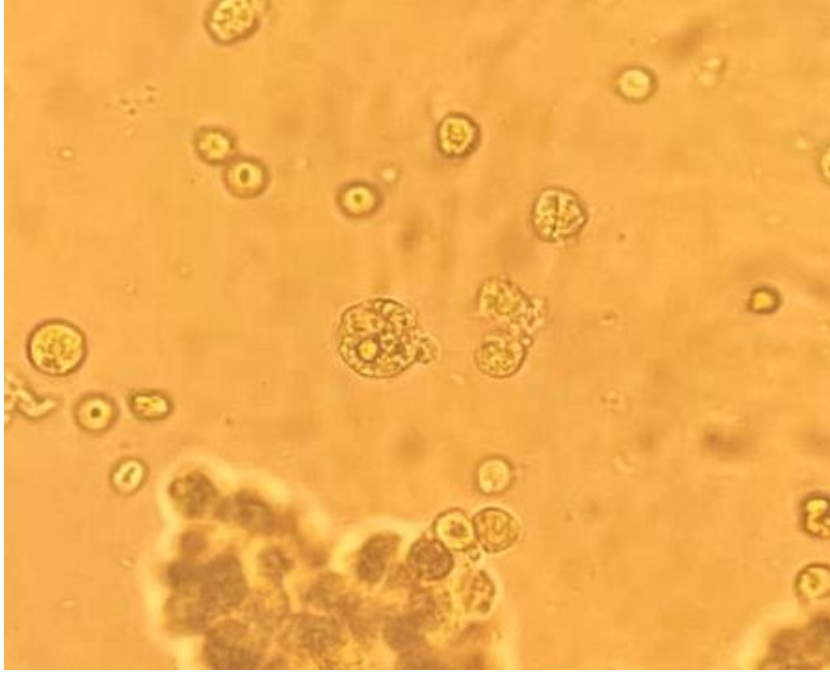
Çalışmaya, Kasım 2024-Mart 2025 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne ishal şikayetiyle başvuran hastalardan seçilen amebiyazis şüpheli dışkı örnekleri dahil edilmiştir. Makroskopik olarak 19'u kanlı ve mukuslu, 32'si mukuslu ve 45'i sulu vasıfta olan toplam 96 örneğin; 48'i erkek, 48'i kadın hastalara aittir. Yaş aralığı 0-86 olan hastaların yaş ortalaması 37,32 (standart sapma: $\pm 24,10$) olarak hesaplanmıştır. Çocuk yaş grubunda bulunan toplam 25 hastanın yaş ortalaması ise 6,8 (standart sapma: $\pm 5,65$) olarak bulunmuştur.

Hastaların en sık başvurduğu birimler; %44,7 Dahiliye Hepatoloji/İBH polikliniği, %22,9 Çocuk Acil servisi, %15,6 Çocuk Gastroenteroloji polikliniği ve %11,4 Dahiliye Gastroenteroloji polikliniğidir.

Direkt mikroskopi, Wheatley trikrom boyama, ELISA ve PCR yöntemleri örneklerin tümüne uygulanmıştır. Direkt mikroskopiyle 34 örnekte (%35,4) amip kist ve trofozoitleri tespit edilmiştir. Görülen şüpheli amip kistlerinden bazıları fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

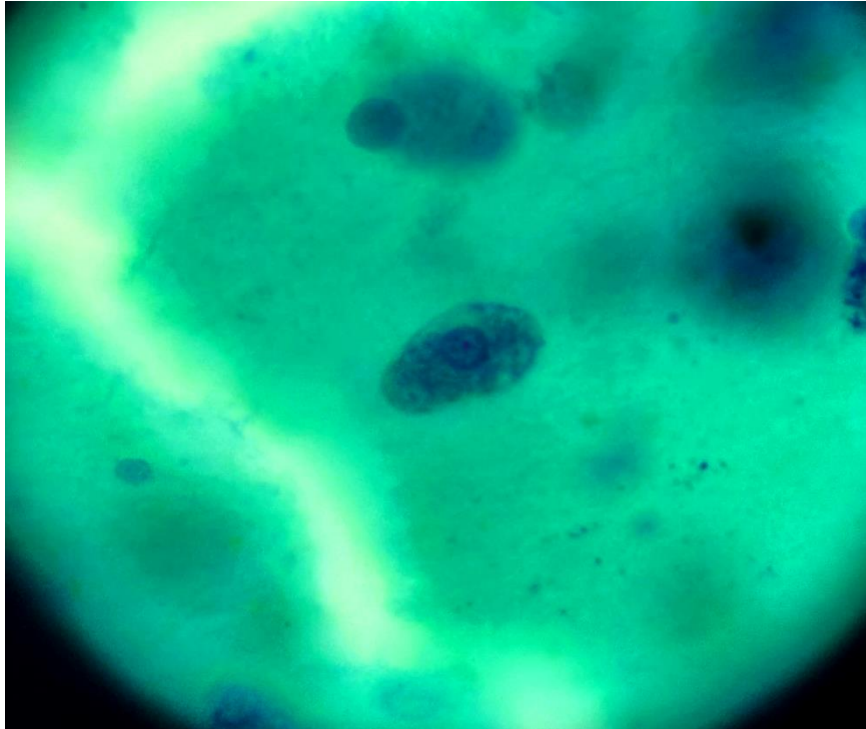


Şekil 4.1. Direkt mikroskobide görülen şüpheli amip kistleri

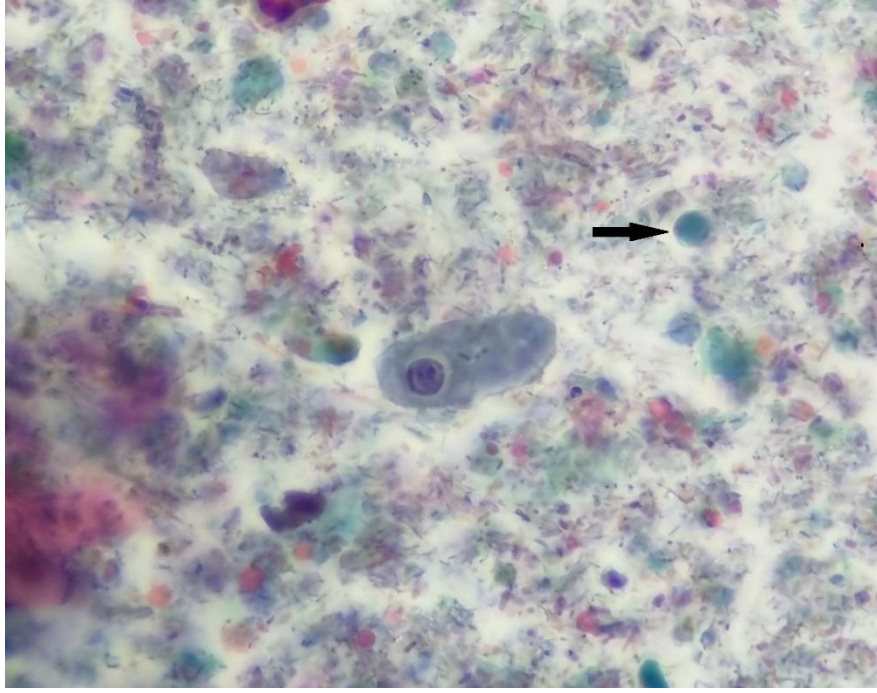


Şekil 4.2. Direkt mikroskobide görülen şüpheli amip kisti ve lökosit kümeleri

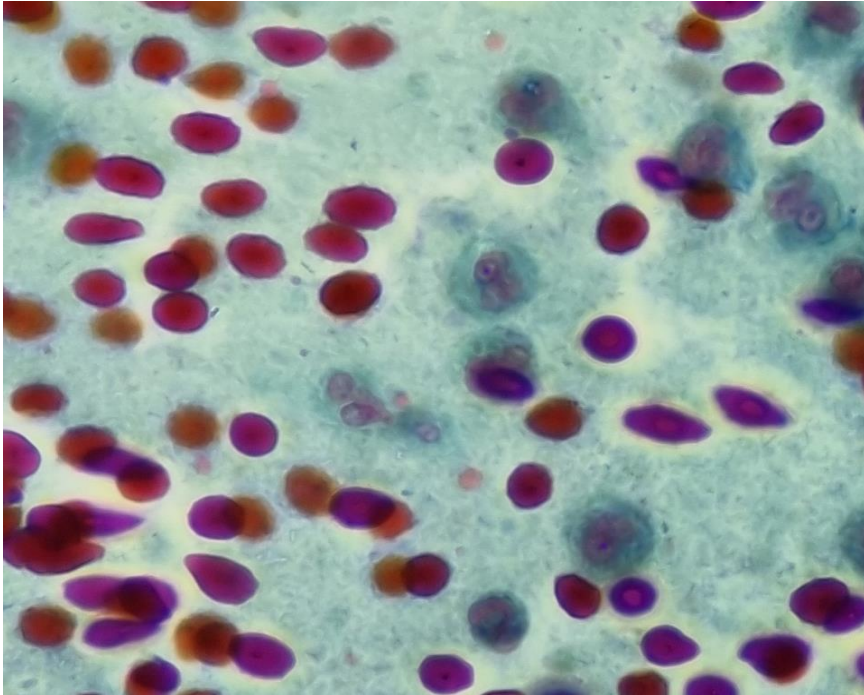
Trikróm boyama sonrası incelemede 26 örnekte (%27,1) *E. histolytica/dispar* trofozoit ve/veya kist yapıları görülmüştür (Şekil 4.3 ve Şekil 4.5). 17 örnekte (%17,7) *Blastocystis hominis* tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Ayrıca 11 örnekte (%11,4) Charcot-Leyden kristallerine rastlanmıştır (Şekil 4.7).



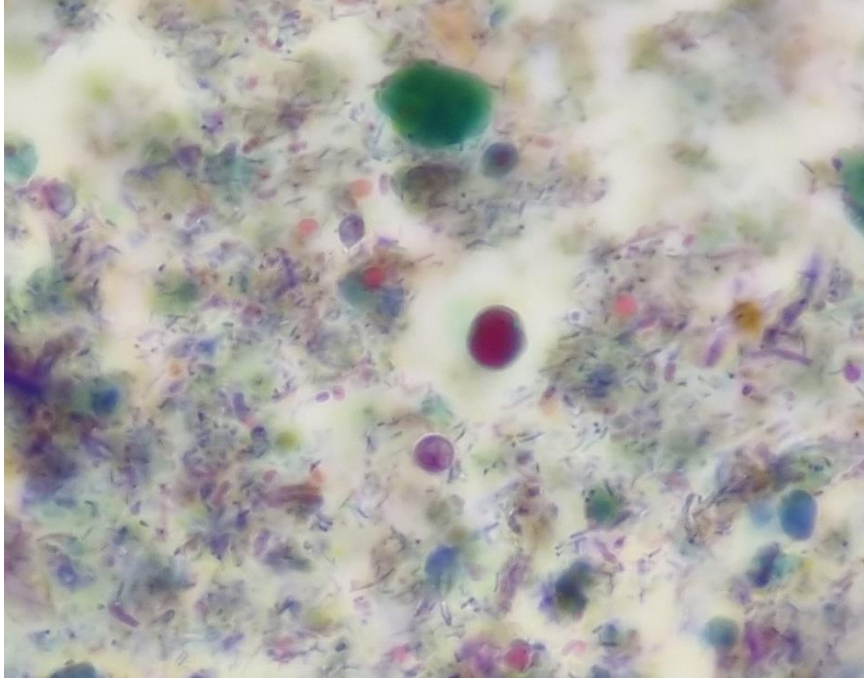
Şekil 4.3. Wheatley trikróm boyama ile görülen *E. histolytica/dispar* trofozoiti



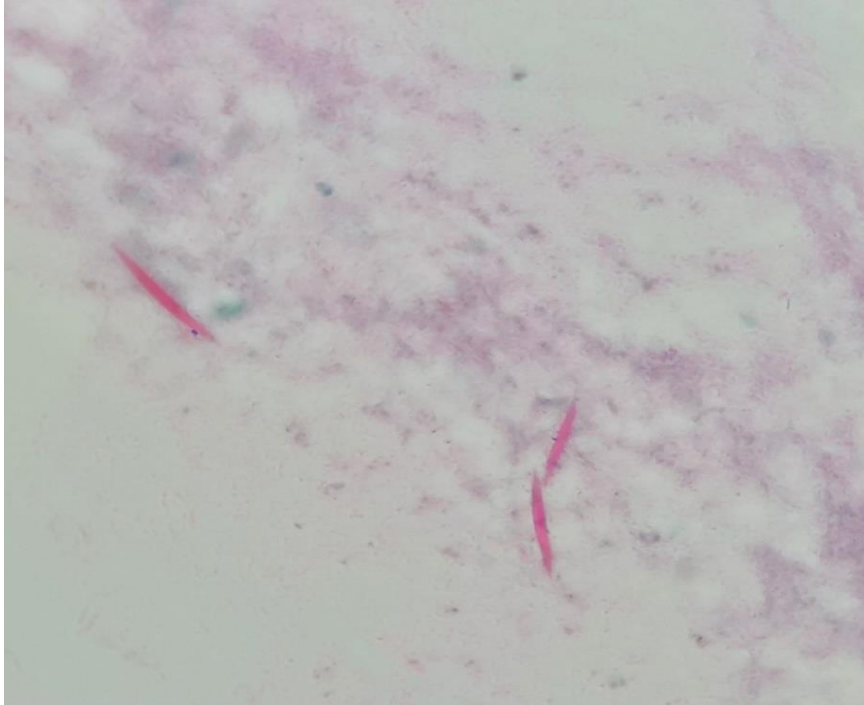
Şekil 4.4. Wheatley trikrom ile görülen *E. histolytica/dispar* trofozoiti ve siyah okla işaretlenen *B. hominis* kisti



Şekil 4.5. Wheatley trikrom boyama ile görülen *E. histolytica/dispar* kistleri ve eritrositler



Şekil 4.6. Trikrom boyama ile görülen *B. hominis* kisti



Şekil 4.7. Trikrom boyama ile görülen Charcot-Leyden kristalleri

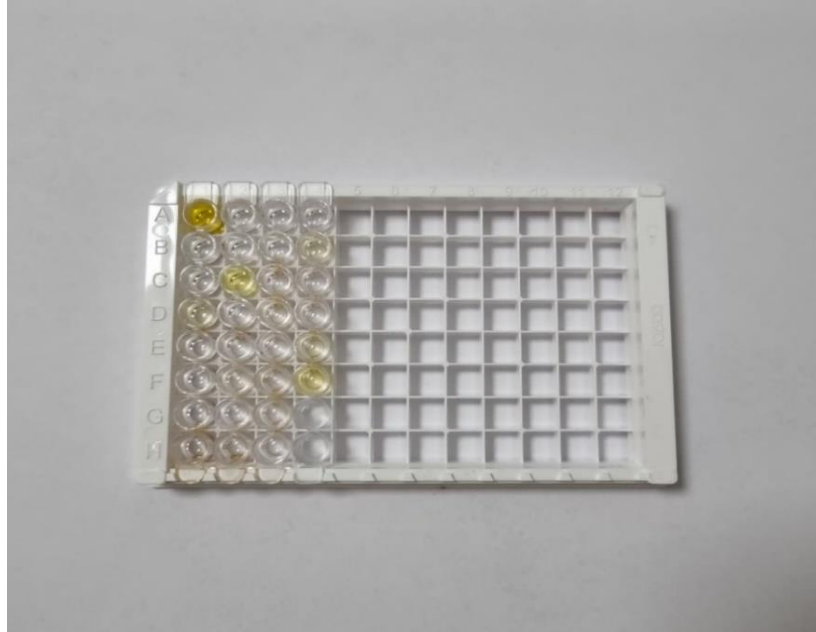
Trikrom boyama ile pozitif tespit edilen örneklerden 4'ünde trofozoit ve kistler beraber iken 22 örnekte yalnızca kistler görülmüştür. 13 örnek hem direkt mikroskopi hem trikrom boyama ile pozitif bulunmuştur.

Tablo 4.1. Trikrom boyama ve direkt mikroskopi sonuçlarının karşılaştırılması

		Trikrom Boyama		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Direkt Mikroskopi	Pozitif	13	21	34
	Negatif	13	49	62
	Toplam	26	70	96

Tüm örneklere dışkıda adezin antijenini tespit eden ELISA yöntemi uygulanmıştır. 20 örnek adezin pozitif bulunurken 76 örnekte negatif sonuç alınmıştır.

ELISA ile direkt mikroskobide şüpheli görülen 34 örnekten 4'ü pozitif iken, trikrom boyamada görülen 26 örnekten 6'sı pozitif bulunmuştur.



Şekil 4.8. ELISA çalışması sonucu pozitif kontrol, negatif kontrol ve hasta örneklerine ait kuyucukların görünümü

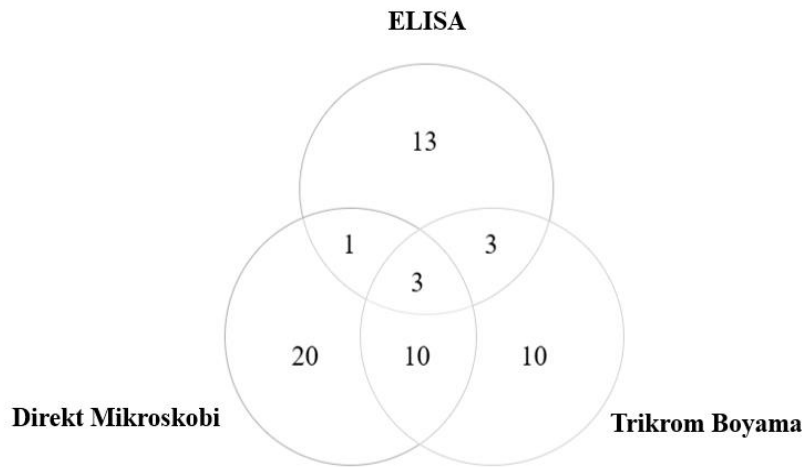
Tablo 4.2. ELISA ve direkt mikroskopi sonuçlarının karşılaştırılması

		ELISA		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Direkt Mikroskopi	Pozitif	4	30	34
	Negatif	16	46	62
	Toplam	20	76	96

Tablo 4.3. ELISA ve trikrom boyama sonuçlarının karşılaştırılması

		ELISA		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Trikrom Boyama	Pozitif	6	20	26
	Negatif	14	56	70
	Toplam	20	76	96

3 örnek direkt mikroskopi, trikrom boyama ve ELISA yöntemlerinin üçünde de pozitif bulunmuştur (Şekil 4.9).

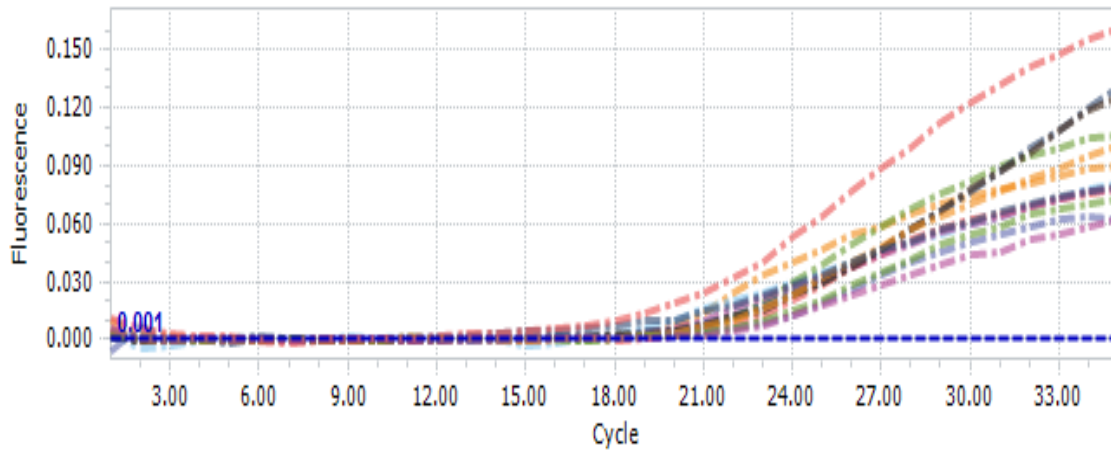


Şekil 4.9. Direkt mikroskopi, trikrom boyama ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

Multipleks real-time PCR çalışmasında 22 örnekte *E. histolytica*, 33 örnekte *Blastocystis hominis*, 5 örnekte *Dientamoeba fragilis* ve 1 örnekte *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir. *Giardia intestinalis* ve *Cyclospora cayetanensis* ise tüm örnekler için negatif bulunmuştur. 5 örnekte *E. histolytica* ve *B. hominis* ve 3 örnekte *D. fragilis* ve *B. hominis* birlikte tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Multipleks real-time PCR sonuçları

Multipleks Real-time PCR Sonuçları	Sayı	Pozitiflik Oranı (%)
<i>Blastocystis hominis</i>	33	%34,3
<i>Entamoeba histolytica</i>	22	%22,9
<i>Dientamoeba fragilis</i>	5	%5,2
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	%1,04
<i>Giardia intestinalis</i>	0	-
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	0	-
<i>E. histolytica</i> + <i>B. hominis</i>	5	%5,2
<i>B. hominis</i> + <i>D. fragilis</i>	3	%3,1



Şekil 4.10. *E. histolytica* pozitif örneklere ait PCR grafikleri

PCR pozitif örneklerin 8'i (%36,3) çocuk; 14'ü (%63,6) ise yetişkin hastalara aittir. Yapılan analizde; yaş gruplarına göre PCR sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.5. Yaş gruplarına göre PCR sonuçlarının karşılaştırılması

PCR Sonuçları			
	Pozitif	Negatif	Toplam
Çocuk	8	17	25
Yetişkin	14	57	71
Toplam	22	74	96

Ayrıca PCR pozitif örneklerin 10'u (%45,4) erkek; 12'si (%54,5) kadın hastalara aittir. Yapılan analizde; cinsiyete göre PCR sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Cinsiyete göre PCR sonuçlarının karşılaştırılması

PCR Sonuçları			
	Pozitif	Negatif	Toplam
Kadın	12	36	48
Erkek	10	38	48
Toplam	22	62	96

Çalışmada *E. histolytica* pozitif bulunma oranı PCR ile %22,9 (n=22), ELISA ile %20,8 (n=20)'dir. Trikrom boyama ile örneklerin %27,1'inde (n=26) *E. histolytica/dispar* tespit edilmiştir. Direkt mikroskopik bakıda %35,4 (n=34)'ünde şüpheli amip kist ve/veya trofozoitleri görülmüştür. PCR ile tespit edilen 22 pozitif örneğin; 7'si (%31,8) direkt mikroskobiyile, 9'u (%40,9) trikrom boyama ile ve 16'sı (%72,7) ELISA ile pozitif saptanmıştır.

Tablo 4.7. PCR ve direkt mikroskopi sonuçlarının karşılaştırılması

		PCR		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Direkt Mikroskopi	Pozitif	7	27	34
	Negatif	15	47	62
	Toplam	22	74	96

PCR yöntemi referans alınarak direkt mikroskobinin duyarlılığı, özgülüğü, pozitif ve negatif prediktif değeri hesaplanmıştır.

Duyarlılık: %31,8

Özgülük: %63,5

Pozitif prediktif değer: %20,6

Negatif prediktif değer: %75,8

Testin doğruluk oranı: %56,2

Tablo 4.8. PCR ve trikrom boyama sonuçlarının karşılaştırılması

		PCR		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Trikrom Boyama	Pozitif	9	17	26
	Negatif	13	57	70
	Toplam	22	74	96

PCR yöntemi referans alınarak trikrom boyama yönteminin duyarlılığı, özgülüğü, pozitif ve negatif prediktif değeri hesaplanmıştır.

Duyarlılık: %40,9

Özgülük: %77

Pozitif prediktif değer: %34,6

Negatif prediktif değer: %81,4

Testin doğruluk oranı: %68,7

Tablo 4.9. PCR ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

		PCR		
		Pozitif	Negatif	Toplam
ELISA	Pozitif	16	4	20
	Negatif	6	70	76
	Toplam	22	74	96

PCR yöntemi referans alınarak ELISA yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değeri belirlenmiştir.

Duyarlılık: %72,7

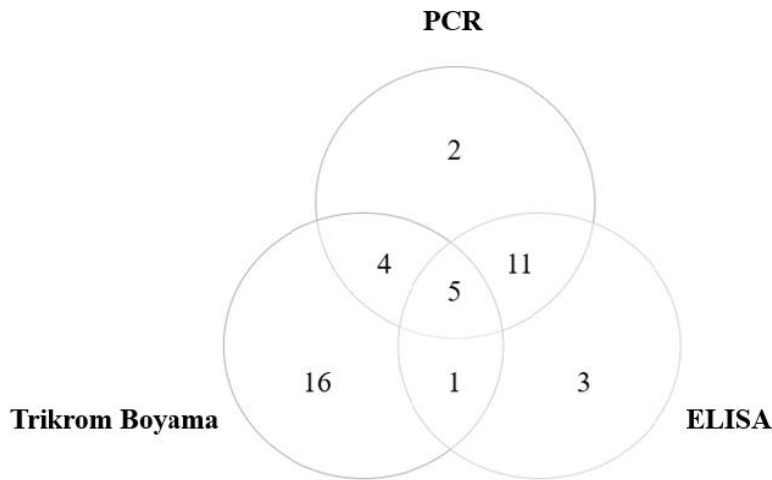
Özgüllük: %94,5

Pozitif prediktif değer: %80

Negatif prediktif değer: %92,1

Testin doğruluk oranı: %89,5

Ayrıca, 5 örnek trikrom boyama, ELISA ve PCR yöntemlerinin üçünde de pozitif tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Makroskobik değerlendirme bulgularının pozitiflik durumu ise; 19 kanlı ve mukuslu örneğin 9'u (%47,3); 32 mukuslu örneğin 7'si (%21,8) ve 45 sulu örneğin 6'sı (%13,3) PCR ile *E. histolytica* pozitif bulunmuştur.



Şekil 4.11. Trikrom boyama, ELISA ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Amebiyazis, dünya çapında morbiditesi ve mortalitesi yüksek paraziter hastalıklardan biridir. Parazitoz, %80-90 oranında asemptomatik seyretmesine rağmen 500 milyon insanı etkilemekte, 50 milyon semptomatik hastalığa ve komplikasyonlar sebebiyle her yıl yaklaşık 100.000 ölüme neden olmaktadır. 1986'dan bu yana hastalığın sıklığına ilişkin yayımlanan verilerde dünya nüfusunun yaklaşık %10-20'sinin bu parazit ile enfekte olduğu ve bunlardan %1'inde hastalığın invaziv seyrettiği bildirilmektedir. Hastalık özellikle gelişmekte olan, sağlık hizmetleri ve sanitasyon altyapısı yetersiz, tropikal ve subtropikal iklime sahip ülkeleri etkilemektedir (Ben Ayed & Sabbahi, 2017). Ancak günümüz dünyasında artan insan hareketliliği ve küreselleşme sonucu yüksek gelir düzeyine sahip gelişmiş ülkelerde de amebiyazis insidansında artış eğilimi görülmektedir (Fu vd., 2023).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda, *E. histolytica/dispar* prevalansı %0,2-45,9 gibi oldukça geniş bir oran aralığında tespit edilmiştir. Bu değişkenliğe; araştırmaların farklı sosyoekonomik bölgeler üzerinde yapılması, farklı eğitim düzeyine sahip grupların seçilmesi ve kullanılan yöntemlerin çeşitliliği gibi faktörlerin neden olduğu düşünülmektedir (Tüzemen & Doğan, 2014).

Mikroskopi ucuz, hızlı ve basit olması dolayısıyla tanı için en sık başvuru olan yöntemdir. Ancak mikroskopik yöntemlerin bazı ciddi handikapları bulunmaktadır. Direkt mikroskopik inceleme sonucu bir "ön-rapor" niteliğindedir. Kesin rapor, boyama ve yoğunlaştırma yöntemleri uygulandığında verilir. Patojen *E. histolytica* ile apatojen *E. dispar* ve *E. moshkovskii* türleri morfolojik olarak birebir benzerdir, bu nedenle mikroskopik incelemeyle ayırt edilemezler. Ayrıca, *E. histolytica*'nın kist veya trofozoit formu yalnızca diğer amip türleriyle değil, epitel hücresi ve makrofaj gibi lökositlerle de karıştırılabilir. Dolayısıyla direkt mikroskopik bakı tek başına tanısal değer taşımaz, boyalı bakılarda *E. histolytica* lehine düşünülen amip kist ya da trofozoitleri *E. histolytica/dispar* olarak raporlanır. Mikroskopiyle amebiyazis tanısı koyduran tek durum; incelenen dışkı örneğinde eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin görülmesidir. Ancak nadiren de olsa *E. dispar*'ın da eritrofagositoz yapabildiği bildirilmiştir. Ayrıca hasta dışkısında parazit sürekli bulunmayabilir. Bu yüzden tek örnekle yapılan incelemede parazitin yakalanma oranı %33-50 arasında iken farklı zamanlarda alınan üç ayrı örneğin incelenmesi sonucu bu oran %75'lere çıkabilmektedir. Trofozoitler dış ortam koşullarına oldukça dayanıksızdır, bu nedenle yaşanan gecikmelerde parazit parçalanır ve tespit edilemez. Tüm bu nedenlerle tek

başına mikroskobinin tanısai değeri düşüktür. ELISA ve PCR gibi daha güvenilir yöntemlere ihtiyaç doğmuştur (Tanyuksel & Petri, 2003; Tuncay vd., 2007).

Dışkı örneklerinde *E. histolytica* antijen tespit eden ELISA yöntemi, mikroskobinin aksine; gösterdiği yüksek duyarlılık ve özgüllükle *E. histolytica* ile patojen olmayan amip türlerini ayırt edebilmesi, deneyim gerektirmemesi, hızlı ve objektif sonuç verebilmesi, aynı anda çok sayıda örnek çalışılabilmesi ve moleküler yöntemlere göre daha ucuz olması gibi avantajları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Beder & Taşbent, 2024). Ancak dışkı örneğine eklenen fiksatiflerin antijenleri denatüre etmesi nedeniyle, yalnızca taze veya dondurulmuş örneklerde doğru sonuca ulaşılabilir (Fotedar vd., 2007).

En iyi ELISA testinden 100 kat daha hassas bir yöntem olan PCR ile *Entamoeba histolytica*'nın farklı gen bölgeleri hedeflenebilse de en sık araştırılan gen sekansı ribozomun küçük alt ünitesini (SSU-rRNA) kodlayan 18S rRNA bölgesidir. Dışkıda bulunması muhtemel PCR inhibitörlerini elimine eden ekstraksiyon kitlerinin geliştirilmesi, aşamaların daha basit hale getirilmesi ve paraziti tespit etmede gösterdikleri yüksek performans nedeniyle amebiyazis teşhisinde yeni altın standart olabileceği ifade edilmektedir. Ne var ki bu yöntemin yüksek maliyetleri, özel ekipmanlara ihtiyaç duyulması ve zaman alıcı olabilmesi gibi dezavantajları sebebiyle gelişmekte olan ülkelerde laboratuvar rutinine girmesi oldukça zor görünmektedir (Carrero vd., 2020; Hooshyar & Rostamkhani, 2022; Morán vd., 2023).

Görüldüğü üzere amebiyazisin laboratuvar tanısında kullanılan her yöntem kendi içinde birtakım avantaj ve dezavantajlar barındırmaktadır. Bu gerçekten yola çıkarak dünyada ve ülkemizde amebiyazisin laboratuvar tanısı ve *E. histolytica*'nın diğer amip türlerinden ayırımı noktasında birçok araştırma yapılmıştır.

Nitekim, yaptığımız çalışma da bu konuda literatüre katkı sağlamak üzere planlanmıştır. Toplamda 96 dışkı örneği; yoğunlaştırma sonrası direkt mikroskopi, trikrom boyama, ELISA ve multipleks real-time PCR yöntemleriyle *E. histolytica* varlığı açısından araştırılmış ve altın standart tanı yöntemi olarak PCR kabul edilmiştir. Çalışmamızda 20 örnekte (%20,8) ELISA ile, 22 örnekte (%22,9) PCR ile *E. histolytica* pozitif bulunmuştur. Trikrom boyama ile 26 örnek (%27,1) *E. histolytica/dispar* olarak bulunurken, direkt mikroskobik bakıda 34 örnekte (%35,4) şüpheli amip kist ve trofozoitleri görülmüştür. 16 örnek hem ELISA hem PCR çalışmalarında pozitif bulunmuştur.

Benzer şekilde yine ülkemizde yapılan bir tez çalışmasında 74 dışkı örneği *E. histolytica* açısından çeşitli yöntemlerle araştırılmış olup; 24 örnek mikroskopi ile, 13 örnek ELISA antijen testi ile, 16 örnek konvansiyonel PCR ile, 19 örnek real-time PCR ile pozitif olarak tespit edilmiştir. Real-time PCR ile pozitif bulunan 19 örneğin 7'si; ELISA ile pozitif bulunan 13 örnekten 7'si mikroskopiyle pozitif bulunmuştur. Real-time PCR altın standart yöntem olarak alındığında mikroskobinin duyarlılığı %36,8, özgüllüğü %69,1 olarak hesaplanmıştır (Aktaş, 2012). Yaptığımız çalışmada real-time PCR referans yöntem olarak kabul edildiğinde direkt mikroskobinin duyarlılığı %31,8, özgüllüğü %63,5 olarak bulunmuştur.

Yıldırım vd. (2014), 259 hastadan alınan ishalleri dışkı örneklerini analiz ettikleri çalışmada ELISA yöntemi ile örneklerin %25,1'inde antijen pozitifliği saptamışlardır. ELISA ile pozitif bulunan örneklerin yalnızca %26,1'ini mikroskopiyle de pozitif tespit edilmiştir. Araştırmacılar, direkt mikroskobinin *E. histolytica* / *E. dispar* ayırımında yetersiz olmasının yanı sıra parazit formlarının dışkıda bulunan özellikle lökositler olmak üzere hücresel yapılarla kolayca karıştırılabileceği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da ELISA ile antijen pozitif bulunan 20 örneğin yalnızca 4'ü (%20) direkt mikroskopiyle pozitif tespit edilmiştir.

Malezya'da 500 dışkı örneği üzerinde yapılan bir araştırmada formalin-eter sedimentasyon tekniği, trikrom ve PCR yöntemleri karşılaştırılmıştır. Formalin-eter sedimentasyon tekniğiyle örneklerden %11,2'si, trikrom boyama ile %13,4'ü *E. histolytica/dispar/moshkovskii* açısından pozitif bulunurken; bu iki yöntemin kombinasyonunda tespit oranı %18,6'ya çıkmıştır. PCR ile tespit oranı ise %21,2'dir. PCR yöntemi ile kıyaslandığında formalin-eter sedimentasyon tekniği %31,1, trikrom boyama tekniği ise %53,8 duyarlılığa sahip olarak hesaplanmıştır (Anuar vd., 2013).

Bir başka çalışmada nativ-lugol inceleme sonucu *E. histolytica/dispar* tanısı konmuş 90 dışkı örneği, trikrom boyama ve Wampole *E. histolytica* II (Techlab, Hollanda) ile Serazym *E. histolytica* (Seramun Diagnostica, Almanya) kitleriyle incelenmiştir. Trikrom boyama ile örneklerin %31,1'inde; Wampole antijen testiyle %62,2'sinde ve Serazym antijen testiyle %64,4'ünde pozitiflik saptanmıştır. Wampole antijen testi ve Serazym antijen testi ortak sonuçları baz alındığında trikrom boyamanın duyarlılığı %53,85 bulunmuştur (Uslu vd., 2016). Çalışmamızda referans yöntem olarak kabul edilen real-time PCR ile kıyaslandığında trikrom boyama yönteminin; %40,9 duyarlılığa ve %77 özgüllüğe sahip olduğu bulunmuştur.

Bu veriler ışığında gerek nativ-lugol gerek trikrom boyama gibi mikroskopik yöntemlerin *E. histolytica* tespitinde ve patojen olmayan türlerden ayırımı açısından yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle mikroskopinin, serolojik ve/veya moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir. Hindistan'da yapılan mikroskopi, ELISA ve nested multiplex PCR tekniklerini karşılaştıran bir çalışmada 631 örneğin analizi sonucu; ELISA yönteminin, gerçek *E. histolytica* enfeksiyonlarını tespit ederek gereksiz tedaviyi önleme konusunda mikroskopiye göre daha duyarlı ve özgül olduğu belirtilmiştir (Das vd., 2022).

Konya'da Ocak 2010-Aralık 2012 tarihlerini kapsayan bir araştırmada 41.967 dışkı örneği bağırsak parazitleri açısından nativ-lugol ve formol etil asetat tekniğiyle yoğunlaştırma sonrası incelenmiştir. Şüpheli bulunan örnekler trikrom boyama ile incelenmiştir. *Entamoeba histolytica/dispar* ayırımı yapılamayan örneklere dışkıda adezin antijeni saptamaya yönelik ELISA testi yapılmıştır. Üç yıl süresince başvuran 41.967 hastanın 2145'inin (%5,11) dışkı örneğinde bağırsak paraziti tespit edilmiştir. Parazit tespit edilen hastalardan %59,9'unun *Blastocystis* spp., %25'inin *Entamoeba* spp., %13,7'sinin *G. intestinalis* ile enfekte olduğu saptanmıştır. Trikrom boyama ile *E. histolytica/dispar* açısından pozitif olduğu düşünülen 100 hastanın dışkı örneğiyle yapılan ELISA testinde antijen pozitifliği tespit edilmemiştir (Pektaş vd., 2015).

Tortop vd. (2022) yapmış oldukları çalışmada kanlı ve/veya mukuslu, şekilsiz toplam 546 dışkı örneği çalışmalarına almışlar ve farklı yöntemlerle *E. histolytica* varlığını değerlendirmişlerdir. Direkt mikroskopik incelemeyle örneklerin 198'inde (%36,33) şüpheli amip kist ve/veya trofozoiti görmüşler ve bu şüpheli örneklere trikrom boyama yapılmıştır. Trikrom ile boyanan 198 örnekten 49'u amip varlığı açısından pozitif bulunarak direkt mikroskopiyle şüpheli bulunan örneklerden %75,2'si *E. histolytica/dispar/moshkovskii* varlığı açısından dışlanmışlardır. Yapılan ELISA testi sonucu 49 örneğin tamamı negatif olarak saptanırken, PCR çalışmasında ise 44 örnek negatif bulunmuş, 5 örnekte geçersiz sonuç alınmıştır. Bahsi geçen çalışmalar, boyalı ya da boyasız mikroskopik değerlendirmede yanlış pozitiflik oranlarının yüksek olabileceğini göstermektedir.

Roy vd. (2005) yapmış oldukları bir araştırmada real-time PCR, konvansiyonel PCR ve ELISA antijen yöntemlerini 205 dışkı ve karaciğer apse materyali üzerinde karşılaştırmışlardır. ELISA ile 101 (%49) örneği pozitif, 104 (%51) örneği negatif bulmuşlardır. Konvansiyonel PCR ile 90, real-time PCR ile 124 örnek pozitif saptanmıştır. Her üç yönteminde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu ancak real-time PCR'in

en duyarlı yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Real-time PCR ile karşılaştırıldıklarında, ELISA'nın %79 duyarlılık ve %96 özgüllüğe; konvansiyonel PCR'm ise %72 duyarlılık ve %99 özgüllüğe sahip olduğunu hesaplamışlardır. Çalışmamızda benzer şekilde real-time PCR yöntemi referans alınarak yapılan hesaplamada ELISA'nın duyarlılığı %72,7, özgüllüğü ise %94,5 olarak tespit edilmiştir.

Haque vd. (1998) Bangladeş'te 98 hastadan alınan ishalleri dışkı örnekleriyle nested PCR yöntemini, izoenzim analizi ve dışkıda antijen tespit eden ELISA ile karşılaştırdıkları bir çalışma yapmıştır. Mikroskopi ve izoenzim analizi sonucu toplamda 88 örnekte amip varlığı tespit etmişlerdir. İzoenzim analizi sonucu bu 88 pozitif örnekten 53'ü *E. histolytica*, 28'i ise *E. dispar* olarak tanımlanmıştır. PCR yöntemiyle, izoenzim analizinde *E. histolytica* tespit edilen 53 örneğin 51'i pozitif saptanmış ve iki yöntem %96 oranında uyumlu bulunmuştur. PCR %87 ve ELISA %85 olmak üzere benzer duyarlılıklara sahip olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu iki yöntem arasında %93 oranında korelasyon olduğu tespit edilmiştir. İzoenzim analizi ve antijen tespiti ile negatif bulunan 10 örnekte PCR'da da negatif sonuç elde edilmiştir. Çalışma sonucu araştırmacılar üç yöntem arasında mükemmel düzeyde bir uyumluluk olduğunu ve antijen tespiti yapan ELISA yönteminin hızlı ve teknik olarak kolay olduğunu belirtmişlerdir.

Kanada'da yapılmış bir çalışmada 95 dışkı örneği, mikroskopi, ELISA ve PCR yöntemleriyle araştırılmıştır. ELISA, mikroskopi ve PCR yöntemi ile 51 örnekte; PCR ve mikroskopi ile 9 örnekte; tek başına PCR yöntemiyle 4 örnekte pozitiflik tespit edilmiştir. Ayrıca PCR ile 2'si *E. histolytica*, 66'sı *E. dispar* olmak üzere toplam 68 örnekte pozitif sonuç alınmıştır. PCR ile karşılaştırıldığında ELISA'nın mikroskopiye göre daha düşük duyarlılığa sahip olduğu bulunmuştur. *E. dispar*'ın daha sık tespit edilmesi ve düşük duyarlılığı nedeniyle tropikal olmayan bölgelerde ELISA kullanımını tavsiye edilmemiştir (Gonin & Trudel, 2003).

Stark vd. (2008) Avustralya'da *Entamoeba* kompleks (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*) içeren 279 dışkı örneği ile bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada iki farklı ticari ELISA kitini (*Entamoeba* CELISA Path ve TechLab *E. histolytica* II) PCR yöntemi ile karşılaştırmışlardır. CELISA Path kitinin %28 duyarlılığa ve %100 özgüllüğe sahip olduğunu, TechLab kitinin ise farklı amip türleriyle çapraz reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Yazarlar, her iki ELISA kitinin de endemik olmayan bölgelerde kullanımının uygun olmadığı sonucuna varmışlardır.

Bu verilerden yola çıkarak, Bangladeş gibi *E. histolytica* açısından endemik bölgeler için dışkıda antijen tespit eden ELISA yönteminin uygun olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, Kanada, Avusturalya gibi endemik olmayan ve apatojen amip türlerinin daha sık tespit edildiği ülkeler için ELISA yerine PCR yöntemi önerilmektedir.

Blessmann vd. (2002) *E. histolytica* - *E. dispar* ayırımı konusunda, real-time PCR'ın mikroskopi, seroloji, kültür sonrası izoenzim analizi yöntemlerine karşı değerlendirildiği bir çalışma yapmışlardır. 181 örneğe yer verilen araştırmada, PCR ile mikroskopi ve kültür sonuçları arasında yüksek düzeyde bir uyum görülmekle beraber PCR'ın diğer iki yönteme göre daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Kültür ve sonrasında yapılan izoenzim analiziyle, 181 örneğin 13'ü (%7,2) *E. histolytica* ve 12'si (%6,6) *E. dispar* olarak saptanmıştır. *E. histolytica* pozitif bulunan 13 örnekten 12'si; *E. dispar* pozitif bulunan 12 örnekten 10'u PCR ile de pozitif bulunmuştur. Buna göre izoenzim analizi ve PCR arasında *E. histolytica* tespitinde %92,3; *E. dispar* tespitinde ise %83,3 oranında uyumluluk olduğu ortaya konmuştur. Araştırma sonucunda, mikroskobinin tür ayırımında yetersiz kaldığı, kültür ve sonrasında yapılan izoenzim analizinin ise uzun zaman aldığı belirtilmiş, bu nedenle amebiyazis tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren PCR yönteminin daha uygun olduğu ifade edilmiştir.

İsveç'te yapılan bir çalışmada mikroskopiyle *E. histolytica/dispar* açısından pozitif bulunan 207 örnek PCR ile analiz edilmiştir. PCR analizinde, 165 hastada *E. dispar*, 10 hastada *E. histolytica* pozitif bulunmuştur. Mikst enfeksiyon tespit edilmemiştir. Ayrıca çalışma ile %70 etanolün dışkı örnekleri için uygun bir taşıma ortamı olup olmadığı da araştırılmıştır. Aynı hastalara ait biri etanol ile fikse edilen ve diğeri edilmeyen eşleştirilmiş 168 örnek PCR ile analiz edilmiştir. 8 hastanın yalnızca fiksasyon yapılan örnekleri için PCR pozitif sonuç vermiştir. Bu nedenle etanolün dışkı örneği taşınmasında yararlı olabileceği ifade edilmiştir (Lebbad & Svärd, 2005).

Tayland/Myanmar sınır bölgesinde ikamet eden bireylerden alınan 455 dışkı örneğinin çalışıldığı bir araştırma yapılmıştır. Tüm örnekler mikroskopiyle incelenerek şüpheli görülen 30 örnek, küçük alt ünite rRNA (SSU-rRNA), kitinaz ve serinden zengin protein genleri hedeflenerek PCR ile analiz edilmiştir. SSU-rRNA amplifikasyonu ile 30 örnekten 3'ünde *E. histolytica* ve *E. dispar*; *E. histolytica* kitinaz gen amplifikasyonu ile 30 örnekten 12'sinde pozitif sonuç alınmıştır. Ayrıca *E. histolytica* serinden zengin protein gen bölgesi amplifikasyonu ile 30 örnekten 22'sinde; *E. dispar* serinden zengin protein gen bölgesi amplifikasyonu ile 30 örnekten 16'sında pozitiflik saptanmıştır. Böylece, iki türün

tek veya mikst enfeksiyonlarının tespiti, kültüre gerek olmaksızın dışkıdan izole edilen DNA'dan etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir (Intarapuk vd., 2009).

Eskişehir'de yapılan bir çalışmada ishal şikayetiyle gelen hastalardan ve rastgele seçilen ilköğretim okullarındaki öğrencilerden alınan toplam 1049 dışkı örneğinden 354'üne tüm yöntemler uygulanmıştır. Bu 354 örneğin %23,7'si direkt mikroskopi, %17,2'si trikrom boyama, %8,7'si ELISA, %12,9'u kültür ile pozitif bulunmuştur. PCR çalışması için DNA ekstraksiyonu, bizim de kullanmış olduğumuz QIAamp DNA Stool Mini Kit ile yapılmıştır. *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* varlığını tespit edebilen ticari bir kit ile yapılan multipleks tandem PCR çalışmasında *Entamoeba histolytica* için peroksiredoksin (prx) gen bölgesi hedeflenmiştir. PCR sonrası analiz sonucunda 354 örnekten 9'u (%2,5) *E. histolytica* açısından pozitif bulunmuştur. (Tüzemen & Doğan, 2014).

Bizim çalışmamızda da ticari bir multipleks real-time PCR kiti kullanılmış olup farklı olarak *E. histolytica* tespiti için hedef, 18S ribozomal rRNA'yı kodlayan gen sekansdır. Ayrıca *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia intestinalis*'e ek olarak *Blastocystis hominis* ve *Cyclospora cayetanensis* varlığı da araştırılmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda PCR ile 96 örnekten 22'sinde *E. histolytica*; 33'ünde *B. hominis*; 5'inde *D. fragilis* ve 1 örnekte *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

1. Çalışmamızda amebiyazis ön tanısıyla laboratuvara gönderilen 96 dışkı örneği, Wheatley trikrom boyama, doymuş NaCl çözeltisiyle konsantrasyon tekniği sonrası direkt mikroskopi, dışkıda adezin antijeni tespit eden ELISA ve multipleks real-time PCR yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. *E. histolytica* pozitiflik oranı PCR ile %22,9 (n=22), ELISA ile %20,8 (n=20) bulunmuştur. Trikrom boyama ile örneklerin %27,1'inde (n=26) *E. histolytica/dispar* tespit edilmiştir. Direkt mikroskopik bakıda %35,4 (n=34)'ünde şüpheli amip kist ve/veya trofozoitleri görülmüştür.
2. PCR ile tespit edilen 22 *E. histolytica* pozitif örneğin; 7'si (%31,8) direkt mikroskopiyle, 9'u (%40,9) trikrom boyama ile ve 16'sı (%72,7) ELISA ile pozitif saptanmıştır.
3. Multipleks PCR'da 6 paraziter etken araştırılmış ve en sık (%34,3) *B. hominis*, daha sonra sırasıyla *E. histolytica* (%22,9), *D. fragilis* (%5,2) ve *Cryptosporidium* spp. (%1,04) pozitifliği tespit edilmiştir. *G. intestinalis* ve *Cyclospora cayetanensis* örneklerin hiçbirinde saptanmamıştır.
4. *E. histolytica* tanısı için PCR yöntemi referans tanı yöntemi olarak alındığında direkt mikroskopi, trikrom boyama ve ELISA'nın duyarlılıkları sırası ile %31,8, %40,9, %72,7 iken özgüllükleri sırasıyla %63,5, %77 ve %94,5 olarak bulunmuştur. PCR yöntemine göre direkt mikroskopi, trikrom ve ELISA yöntemlerinin sırasıyla test doğruluk oranları %56,2; %68,7; %89,5 olarak hesaplanmıştır.
5. Bulunan düşük duyarlılık ve özgüllük nedeniyle direkt mikroskopi ve trikrom boyama yönteminin *E. histolytica*'nın, *E. dispar*'dan ayırt edilmesinde tek başına yeterli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.
6. Çalışmada *E. histolytica* açısından incelenen 96 dışkı örneğinin makroskobik olarak 19'u kanlı ve mukuslu, 32'si mukuslu, 45'i ise sulu formda idi. Makroskobik değerlendirme bulgularının pozitiflik durumu ise kanlı ve mukuslu örneğin 9'u (%47,3); mukuslu örneğin 7'si (%21,8) ve sulu örneğin 6'sı (%13,3) PCR ile *E. histolytica* pozitif bulunmuştur. Buna göre dışkının mukuslu ve kanlı olması *E. histolytica* pozitiflik ihtimalini artırmaktadır.

6.2. Öneriler

Amebiyazisin rutin tanısında birçok zorlukla karşılaşmaktadır. Bunlardan en önemlisi, görsel farklılıklar üzerinden ayırımı yapmaya yardımcı olan mikroskopinin morfolojik olarak birebir benzer olan *E. histolytica*, *E. dispar* ve *E. moshkovskii* türlerini ayırmada yetersiz kalmasıdır. Bu nedenle fazla sayıda yanlış pozitif sonuç ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla yalnızca mikroskopi sonucuna göre tedaviye karar vermek gereksiz ilaç kullanımı ve yanlış tanıya yol açacaktır.

ELISA yöntemi ise yüksek duyarlılık ve özgüllükle *E. histolytica*'yı dışkıdaki diğer amip türlerinden ayırt edebilen, aynı anda çok sayıda örnek çalışılabilen, hızlı ve objektif sonuç veren, moleküler yöntemlere kıyasla daha ucuz olan ve deneyimli personel gerektirmeyen bir yöntemdir. Bu avantajları sebebiyle özellikle düşük gelir düzeyine sahip endemik bölgeler için oldukça akılcı bir seçenek olarak görülmektedir.

Diğer taraftan moleküler yöntemler; dışkıda bulunan inhibitörleri elimine eden, aşamaları daha basit ve hızlı hale getiren ticari kitlerin geliştirilmesiyle tanı açısından en yüksek performansı vadetmektedir. Ancak yüksek maliyetleri ve özel ekipmanlara gerek duyulması yaygın kullanımının önündeki en büyük engeldir.

Amebiyazis, hem dünya hem de ülkemiz için halen önemini koruyan bir hastalıktır. Mortalite ve morbiditeyi önlemede doğru ve hızlı bir laboratuvar sonucu oldukça büyük öneme sahiptir. Bu bakımdan yalnızca mikroskopiye dayanan bir tanısal yaklaşım uygun değildir. O nedenle laboratuvarlar *E. histolytica* tespiti için bir tanı algoritması oluşturmalı; ELISA ve/veya PCR gibi mikroskobik tanıyı destekleyen ikinci bir yöntem bu algoritmalar içerisinde mutlaka yer almalıdır. Ayrıca, laboratuvar sonuçlarının enfeksiyon hastalıklarında tanının yalnızca bir yönünü oluşturduğu unutulmamalıdır. Amebiyazis tanısında süreç; öykü, klinik semptomlar, fizik muayene bulguları, laboratuvar sonuçları ve gerektiğinde radyolojiyi de içeren geniş bir perspektifle yönetilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abd Alla, M. D., Wolf, R., White, G. L., Kosanke, S. D., Cary, D., Verweij, J. J., Zhang, M. J., & Ravdin, J. I. (2012). Efficacy of a Gal-lectin subunit vaccine against experimental *Entamoeba histolytica* infection and colitis in baboons (*Papio sp.*). *Vaccine*, *30*(20), 3068-3075. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.02.066>
- Aegerter, H., Smole, U., Heyndrickx, I., Verstraete, K., Savvides, S. N., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2021). Charcot–Leyden crystals and other protein crystals driving type 2 immunity and allergy. *Current Opinion in Immunology*, *72*, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.03.013>
- Ak, M., Tanyüksel, M., & Dağcı, H. (2007). Amebiosis. M. A. Özcel, Y. Özbel, & M. Ak (Ed.), *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları içinde* (1. baskı, ss. 279-307). Meta Basım.
- Akgun, S., & Celik, T. (2020). Evaluation of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium hominis*/*Cryptosporidium parvum* in human stool samples by the BD MAX™ Enteric Parasite Panel. *Folia parasitologica*, *67*. <https://doi.org/10.14411/fp.2020.020>
- Aktaş, H. (2012). *Entamoeba histolytica tanısında real-time PCR yönteminin kullanılması* [Doktora Tezi]. Çukurova Üniversitesi.
- Alavi, K. (2007). Amebiasis. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, *20*(1), 033-037. <https://doi.org/10.1055/s-2007-970198>
- Ali, I. K. M. (2015). Intestinal amebae. *Clinics in laboratory medicine*, *35*(2), 393-422. <https://doi.org/10.1016/J.CLL.2015.02.009>
- Ali, I. K. M., Clark, C. G., & Petri, W. A. (2008). Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, genetics and evolution : Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *8*(5), 698-707. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.004>
- Altıntaş, K. (2002). Genel parazitoloji. *Tıbbi Parazitoloji içinde* (ss. 1-49). MN Medical & Nobel tıp kitapçıları.
- Anuar, T. S., Al-Mekhlafi, H. M., Abdul Ghani, M. K., Abu Bakar, E., Azreen, S. N., Salleh, F. M., & Moktar, N. (2013). Evaluation of formalin-ether sedimentation and trichrome staining techniques: its effectiveness in detecting *Entamoeba*

- histolytica/dispar/moshkovskii* in stool samples. *Journal of microbiological methods*, 92(3), 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.010>
- Arellano-Aguilar, G., Marín-Santillán, E., Castilla-Barajas, J. A., Bribiesca-Juárez, M. C., & Domínguez-Carrillo, L. G. (2017). A brief history of amoebic liver abscess with an illustrative case. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 82(4), 344-348. <https://doi.org/10.1016/J.RGMXEN.2017.05.003>
- Argüello-García, R., Carrero, J. C., & Ortega-Pierres, M. G. (2023). Extracellular cysteine proteases of key intestinal protozoan pathogens—factors linked to virulence and pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12850. <https://doi.org/10.3390/ijms241612850>
- Bajaj, A. (2020). The flourishing parasite-amoebic colitis. *EC Gastroenterology and Digestive System*, 7(2), 01-09. <https://www.academia.edu/download/89408377/the-flourishing-parasite-amoebic-colitis.pdf>
- Beder, D., & Taşbent, F. E. (2024). Evaluation of adhesin antigen test results in samples sent with suspicion of amebiasis. *Genel Tip Dergisi*, 34(4), 542-546. <https://doi.org/10.54005/geneltip.1470640>
- Ben Ayed, L., & Sabbahi, S. (2017). *Entamoeba histolytica*. In: R. Fayer & W. Jakubowski (Ed.), *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.34>
- Blessmann, J., Buss, H., Nu, P. A. T., Dinh, B. T., Ngo, Q. T. V., Van, A. Le, Alla, M. D. A., Jackson, T. F. H. G., Ravdin, J. I., & Tannich, E. (2002). Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *Journal of clinical microbiology*, 40(12), 4413-4417. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4413-4417.2002>
- Calle-Pacheco, G. L., Jiménez-Chunga, J. A., & Vivas-Ruiz, D. E. (2022). Molecular diagnosis of amoebiasis. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 79(1), 3-16. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.21000044>
- Carrero, J. C., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Unzueta, J., León-Sicairos, N., & de la Garza, M. (2020). Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *International*

Journal of Medical Microbiology, 310(1), 151358.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>

- Christy, N. C. V., & Petri, W. A. (2011). Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiology*, 6(12), 1501-1519. <https://doi.org/10.2217/FMB.11.120>
- Clark, C. G., & Diamond, L. S. (1991). The Laredo strain and other 'Entamoeba histolytica-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46(1), 11-18. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90194-B](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90194-B)
- Cox, F. E. G. (2002). History of human parasitology. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 595-612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>
- Çöplü, N., Gözalan, A., & Akın, L. (2007). Gaitada parazit incelemesinde kullanılan yoğunlaştırma yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(2), 123-128.
- Danish, W., Bibi, A., Suleman, A., Naveed, F., Fuzail, M. M. M., Mehmood, M., Afresham, S., & Imran, M. (2023). Amoebiasis in one health perspective. *One Health Triad, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan*, 3, 146-150. <https://doi.org/10.47278/book.oht/2023.89>
- Das, S., Rajkumari, N., Gunalan, A., Rajavelu, D., & Olickal, J. J. (2022). A comparative analysis of microscopy, coproantigen serology, and nested multiplex PCR in the laboratory diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(02), 125-131. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732488>
- El-Dib, N. A. (2017). *Entamoeba histolytica*: An overview. *Current Tropical Medicine Reports*, 4(1), 11-20. <https://doi.org/10.1007/s40475-017-0100-z>
- Faust, D. M., & Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection*, 14(15), 1428-1441. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.013>
- Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., & Harkness, J. (2007). Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 511-532. <https://doi.org/10.1128/CMR.00004-07>
- Fotedar, R., Stark, D., Marriott, D., Ellis, J., & Harkness, J. (2008). *Entamoeba moshkovskii* infections in Sydney, Australia. *European Journal of Clinical Microbiology and*

Infectious Diseases, 27(2), 133-137. <https://doi.org/10.1007/S10096-007-0399-9/TABLES/2>

- Fu, X., Zhong, Y., Chen, L., Ge, M., Yu, M., Sun, Y., & Shen, L. (2023). Global burden and trends of the *Entamoeba* infection-associated diseases from 1990 to 2019: An observational trend study. *Acta tropica*, 240, 106866. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106866>
- Gardiner, B. J., Simpson, I., & Woolley, I. J. (2015). Caught in the act... a case of fulminant amoebic colitis. *JMM Case Reports*, 2(4). <https://doi.org/10.1099/JMMCR.0.000081>
- Gonin, P., & Trudel, L. (2003). Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 237-241. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.237-241.2003>
- Guillen, N. (2021). Signals and signal transduction pathways in *Entamoeba histolytica* during the life cycle and when interacting with bacteria or human cells. *Molecular microbiology*, 115(5), 901-915. <https://doi.org/10.1111/mmi.14657>
- Guillén, N. (2023). Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence*, 14(1), 2158656. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2158656>
- Haque, R., Ali, I. K. M., Akther, S., & Petri, W. A. (1998). Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 449-452. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.449-452.1998/FORMAT/EPUB>
- Haque, R., Mondal, D., Shu, J., Roy, S., Kabir, M., Davis, A. N., Duggal, P., & Petri, W. A. (2007). Correlation of interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(2), 340-344.
- Harries, J. (1982). Amoebiasis: A review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75(3), 190-197. <https://doi.org/10.1177/014107688207500309>
- Hooshyar, H., & Rostamkhani, P. (2022). Accurate laboratory diagnosis of human intestinal and extra-intestinal amoebiasis. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 15(4), 343-359. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v15i4.2496>

- Huston, C. D., Boettner, D. R., Miller-Sims, V., & Petri, W. A. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 71(2), 972. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.964-972.2003>
- Ikbal, A. M. A., Debnath, B., Rajkhowa, A., Paul, K., Majumder, R., & Manna, K. (2022). Amoebiasis: An infectious disease caused by *Entamoeba histolytica*. *Asian Journal of Basic Science & Research*, 04(02), 32-40. <https://doi.org/10.38177/AJBSR.2022.4202>
- Intarapuk, A., Kalambaheti, T., Thammapalerd, N., Mahannop, P., Kaewsatien, P., Bhumiratana, A., & Nityasuddhi, D. (2009). Identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR assay of fecal specimens obtained from Thai/Myanmar border region. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 40(3), 425-434. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19842426>
- Istre, G. R., Kreiss, K., Hopkins, R. S., Healy, G. R., Benziger, M., Canfield, T. M., Dickinson, P., Englert, T. R., Compton, R. C., Mathews, H. M., & Simmons, R. A. (1982). An outbreak of amebiasis spread by colonic irrigation at a chiropractic clinic. *The New England Journal of Medicine*, 307(6), 339-342. <https://doi.org/10.1056/NEJM198208053070603>
- Jannati, R., Tavakoli Pasand, S., & Garedaghi, Y. (2024). Evaluation of different techniques in laboratory diagnosis of intestinal amoebiasis. *International Journal of Medical Parasitology and Epidemiology Sciences*, 5(1), 16-23. <https://doi.org/10.34172/ijmpes.3129>
- Jasni, N., Saidin, S., Kin, W. W., Arifin, N., & Othman, N. (2022). *Entamoeba histolytica*: membrane and non-membrane protein structure, function, immune response interaction, and vaccine development. *Membranes*, 12(11), 1079. <https://doi.org/10.3390/membranes12111079>
- Junaidi, J., Cahyaningsih, U., Purnawarman, T., Latif, H., Sudarnika, E., Hayati, Z., & Muslina, M. (2020). *Entamoeba histolytica* neglected tropical diseases (NTDs) agents that infect humans and some other mammals: A review. *E3S Web of Conferences*, 151, 01019. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202015101019>
- Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., & Ochner, C. (2018). *Entamoeba histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2018/4601420>

- Kaplan, R. L. (1992). Microscopic examination of fecal specimens: Permanent stained smear (Trichrome). In: H. D. Isenberg (Ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press.
- Kataria, S., Singla, A., Thandi, P., Kumar, M., & Ali, A. (2024). *Entamoeba histolytica*: Current status in all the suspected patients having gastrointestinal infections in a tertiary care hospital, Jaipur. *The Journal of Medical Sciences*, 10(1--4), 29-34. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10045-00248>
- Korkmaz, M., & Ok, Ü. Z. (2011). *Parazitolojide laboratuvar*. Türkiye Parazitoloji Derneği.
- König, C., Honecker, B., Wilson, I. W., Weedall, G. D., Hall, N., Roeder, T., Metwally, N. G., & Bruchhaus, I. (2021). Taxon-specific proteins of the pathogenic *Entamoeba* species *E. histolytica* and *E. nuttalli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 641472. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.641472>
- Kurt, E. O., Akgül, Ö., Akyüz, F., & Öner, Y. A. (2019). Gaita örneklerinde *Entamoeba histolytica* ile *Entamoeba dispar* ayırımında PCR ve ELISA yöntemlerinin değerlendirilmesi. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 2(4), 131-138. <https://orcid.org/0000-0002-3802-3270>
- Lebbad, M., & Svärd, S. G. (2005). PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 37(9), 680-685. <https://doi.org/10.1080/00365540510037812>
- Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O., & Grötzinger, J. (2005). Ancient weapons: The three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends in parasitology*, 21(1), 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.10.009>
- Lejeune, M., Rybicka, J. M., & Chadee, K. (2009). Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future microbiology*, 4(1), 105-118. <https://doi.org/10.2217/17460913.4.1.105>
- Li, J., Cui, Z., Li, X., & Zhang, L. (2021). Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. *Research in veterinary science*, 136, 174-181. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2021.02.021>

- Mahmood, S. A. F. (2023). Genetic variability of *Entamoeba histolytica* strains. In: *Genetic Diversity - Recent Advances and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106828>
- Malatyali, E., & Özçelik, S. (2010). Farklı fiziksel koşullarda *Entamoeba histolytica*'nın in vitro kültüründe elde edilen bulgular. *Cumhuriyet Medical Journal*, 32(3), 283-287.
- Marie, C., & Petri, W. A. (2014). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual review of microbiology*, 68, 493-520. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-091313-103550>
- Mathur, S., Kaushik, S., Kothari, S. L., & Srivastava, V. K. (2024). Role of various virulence factors involved in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*, 266, 108841. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2024.108841>
- Memis, K. B., Celik, A. S., Aydin, S., & Kantarci, M. (2025). Rectal ameboma: A new entity in the differential diagnosis of rectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 17(1). <https://doi.org/10.4240/wjgs.v17.i1.100278>
- Moonah, S. N., Jiang, N. M., & Petri, W. A. (2013). Host immune response to intestinal amebiasis. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003489. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003489>
- Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Rojas-Velázquez, L., González, E., Pérez-Juárez, H., Hernández, E. G., Padilla, M. de los A., Zaragoza, M. E., Portillo-Bobadilla, T., Ramiro, M., & Ximénez, C. (2023). Amoebiasis: Advances in diagnosis, treatment, immunology features and the interaction with the intestinal ecosystem. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11755. <https://doi.org/10.3390/ijms241411755>
- Mortimer, L., & Chadee, K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*, 126(3), 366-380. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.005>
- Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, 7, 175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175>
- Nasrallah, J., Akhoundi, M., Haouchine, D., Marteau, A., Mantelet, S., Wind, P., Benamouzig, R., Bouchaud, O., Dhote, R., & Izri, A. (2022). Updates on the worldwide

- burden of amoebiasis: A case series and literature review. *Journal of infection and public health*, 15(10), 1134-1141. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.08.013>
- Ngui, R., Angal, L., Fakhrurrazi, S. A., Lian, Y. L. A., Ling, L. Y., Ibrahim, J., & Mahmud, R. (2012). Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. *Parasites & vectors*, 5, 187. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-187>
- Nowak, P., Mastalska, K., & Loster, J. (2015). *Entamoeba histolytica* - pathogenic protozoan of the large intestine in humans. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 1(1), 010-017. <https://doi.org/10.17352/jcmbt.000003>
- Oryakhil, Q., Hanif, M., & Irfan, M. (2021). An update of vaccine development against *Entamoeba histolytica*. *European Journal of Health Sciences*, 6(2), 30-40. <https://doi.org/10.47672/ejhs.715>
- Othman, N., Ujang, J. A., Ng, Y. L., Kumarasamy, G., & Noordin, R. (2020). Amebiasis. In: *Molecular Advancements in Tropical Diseases Drug Discovery* (ss. 1-19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821202-8.00001-3>
- Ouattara, M., N'guéssan, N. A., Yapi, A., & N'goran, E. K. (2010). Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d'Ivoire). *PLoS neglected tropical diseases*, 4(1), e574. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000574>
- Özcel, M. A. (2007). *Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları*. Meta Basım.
- Özçelik, S., & Malatyalı, E. (2008). Amebiyaz ve virulans faktörlerinin *Entamoeba histolytica* patogenezindeki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65(3), 139-148.
- Pektaş, B., Gökmen, A. A., İnci, A., Biten, A. A., & Keşli, R. (2015). Bir Eğitim Araştırma Hastanesi'nde üç yıllık bağırsak parazitlerinin dağılımı: Retrospektif bir çalışma. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 269-273.
- Pritt, B. S., & Clark, C. G. (2008). Amebiasis. *Mayo Clinic proceedings*, 83(10), 1154-1160. <https://doi.org/10.4065/83.10.1154>
- Putra, A. C., Chyntia, B., Winardi, E., Johan, M., Pradwiyanto, A. A., Tambun, R., Wiyono, W. H., & Alatas, F. (2023). Primary pulmonary amoebiasis mimicking lung tumour in

- immunocompromised patient: A case report. *Respirology Case Reports*, 11(8).
<https://doi.org/10.1002/rcr2.1199>
- Rosales, C. (2021). Neutrophils vs. amoebas: Immunity against the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of leukocyte biology*, 110(6), 1241-1252.
<https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0521-849RR>
- Roy, S., Kabir, M., Mondal, D., Ali, I. K. M., Petri, W. A., & Haque, R. (2005). Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2168-2172. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2168-2172.2005/FORMAT/EPUB>
- Saidin, S., Othman, N., & Noordin, R. (2019). Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(1), 15-38.
<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3379-3>
- Sardar, S. K., Ghosal, A., Haldar, T., Maruf, M., Das, K., Saito-Nakano, Y., Kobayashi, S., Dutta, S., Nozaki, T., & Ganguly, S. (2023). Prevalence and molecular characterization of *Entamoeba moshkovskii* in diarrheal patients from Eastern India. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(5), e0011287. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011287>
- Saygı, G. (2002). *Temel tıbbi parazitoloji* (2. Baskı). Es-Form Ofset.
- Saygı, G. (2009a). *Paraziter hastalıklar ve parazitler*. Es Form Ofset.
- Saygı, G. (2009b). *Temel tıbbi parazitoloji*. Es-Form Ofset.
- Semerjyan, A. B., & Susanyan, M. G. (2006). *Medical Parasitology*. Zangak-97.
http://books.ysmu.am/uploads/Parasitology_24.pdf
- Shirley, D.-A., Hung, C.-C., & Moonah, S. (2020). *Entamoeba histolytica* (amebiasis). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 699-706.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00094-6>
- Siqueira-Neto, J. L., Debnath, A., McCall, L.-I., Bernatchez, J. A., Ndao, M., Reed, S. L., & Rosenthal, P. J. (2018). Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(8), e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
- Stanley, S. L. (2003). Amoebiasis. *Lancet (London, England)*, 361(9362), 1025-1034.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)

- Stark, D., van Hal, S., Fotedar, R., Butcher, A., Marriott, D., Ellis, J., & Harkness, J. (2008). Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. *Journal of clinical microbiology*, 46(5), 1678-1681. <https://doi.org/10.1128/JCM.02261-07>
- Sugeçti, S. (2018). *Entamoeba histolytica* patojenitesi ve moleküler tanı yöntemleri. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 4(4), 203-207. <https://doi.org/10.5606/fng.btd.2018.036>
- Şanlı, S. (2000). *Adana ve çevresindeki çeşitli sağlık kuruluşlarından elde edilen dışkı örneklerinde Entamoeba histolytica'nın kültür, boyama ve elektroforez yöntemleriyle diğer amip türlerinden ayrılması*. [Yüksek Lisans Tezi]. Çukurova Üniversitesi.
- Tanyuksel, M., & Petri, W. A. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 713-729. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.713-729.2003>
- Taşbent, F. E. (2022). *İshali olan immünsupresif hastalarda fırsatçı ve fırsatçı olmayan protozoonların sıklığının konvansiyonel yöntemler ve multipleks PZR ile araştırılması*. [Doktora Tezi]. Selçuk Üniversitesi.
- Taşbent, F. E., & Boran, C. C. (2020). *Entamoeba gingivalis* ve periodontal hastalıklardaki etkinliğinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 50(4), 204-210. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2020.204>
- Tengku, S. A., & Norhayati, M. (2011). Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: A review. *Tropical biomedicine*, 28(2), 194-222.
- Tortop, S., Koyuncu Özyurt, Ö., Öngüt, G., Yazısız, H., Öztürk Eryiğit, F., Özhak, B., Dönmez, L., Şekercioğlu, A. O., & Ögünç, D. (2022). İshalli hastaların dışkı örneklerinde *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji bulteni*, 56(4), 682-691. <https://doi.org/10.5578/MB.20229606>
- Tuncay, S., Inceboz, T., Över, L., Yalçın, G., Usluca, S., Şahin, S., Delibas, S. B., Aksoy, Ü., & Akısü, Ç. (2007). Dışkıda *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında kullanılan yöntemlerin birlikte değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(3), 188-193. https://www.academia.edu/download/44191683/The_evaluation_of_the_techniques_used_fo20160329-9865-gj1rcq.pdf

- Türkdoğan, M. K. (2004). Amebiyaz (Klinik, Teşhis ve Tedavi). *Türkiye Klinikleri Journal of Gastroenterohepatology*, 15(3), 126-131. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-amebiyaz-klinik-teshis-ve-tedavi-35912.html>
- Tüzemen, N. Ü., & Doğan, N. (2014). *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 48(1), 114-122. <https://doi.org/10.5578/MB.6795>
- Ullah, R., Shafiq, M., Rehman, M. U., Khan, I., Hayat, A., & Jehangir, I. (2022). The public health and clinical importance of amoebiasis. *Health Science Journal*, 16(3), 1-7. <https://doi.org/10.36648/1791-809X.16.4.934>
- Unat, E. K. (1985). Amöbiyozların tarihçesi. Ş. Yaşaryol, S. Budak, M. A. Özcel, H. A. Kuman, & İ. Sermet (Ed.), Amöbiyozlar içinde (ss. 1-30). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını.
- Unat, E. K., Yücel, A., Altaş, K., & Samastı, M. (1995). *Unat'ın tıp parazitolojisi* (5. baskı). Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları.
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Immune response to the enteric parasite *Entamoeba histolytica*. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 35(4), 244-260. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00038.2019>
- Uslu, H., Aktas, O., & Uyanik, M. H. (2016). Comparison of various methods in the diagnosis of *Entamoeba histolytica* in stool and serum specimens. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 124-129. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0074>
- Ustaçelebi, Ş., Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A. T., Tümbay, E., & Mete, Ö. (1999). *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Güneş Kitapevi.
- Usuda, D., Tsuge, S., Sakurai, R., Kawai, K., Matsubara, S., Tanaka, R., Suzuki, M., Takano, H., Shimozawa, S., Hotchi, Y., Tokunaga, S., Osugi, I., Katou, R., Ito, S., Mishima, K., Kondo, A., Mizuno, K., Takami, H., Komatsu, T., ... Sugita, M. (2022). Amebic liver abscess by *Entamoeba histolytica*. *World journal of clinical cases*, 10(36), 13157-13166. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V10.I36.13157>
- Watanabe, K., & Petri, W. A. (2019). Learning from the research on amebiasis and gut microbiome: Is stimulation by gut flora essential for effective neutrophil mediated protection from external pathogens? *Gut microbes*, 10(1), 100-104.

https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1479626/ASSET/2C5C86C1-4AF8-41AE-85C7-585285CB0D81/ASSETS/IMAGES/KGMI_A_1479626_F0001_C.JPG

- Wiser, M. F. (2010). *Entamoeba* and amebiasis. In: *Protozoa and Human Disease* (1. bs, ss. 31-46). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9780429258282>
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., & Gómez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, genetics and evolution*, 9(6), 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008>
- Yakut, M., & Özden, A. (2008). Amip, amebiasis ve ilişkili hastalıklar. *Güncel Gastroenteroloji*, 12(2), 81-97. <https://guncel.tgv.org.tr/journal/26/pdf/288.pdf>
- Yanagawa, Y., Nagata, N., Yagita, K., Watanabe, K., Okubo, H., Kikuchi, Y., Gatanaga, H., Oka, S., & Watanabe, K. (2021). Clinical features and gut microbiome of asymptomatic *Entamoeba histolytica* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(9), e3163-e3171. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa820>
- Yıldırım, D., Hasbek, M., & Nur, N. (2014). İshalli hastalarda bağırsak amebiyazının adezin antijen testi ve direkt mikroskopi ile incelenmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 38(3), 155-158. <https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3478>
- Zlobl, T. L. (2001). Amebiasis. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 8(2), 65-68. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(00\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(00)00076-7)