

Dışkı Örneklerinde ELISA Yöntemiyle *Entamoeba histolytica* Lektin Antijeninin Gösterilmesi: Üç Yıllık Veriler

Entamoeba histolytica Lectin Antigen from Stool Specimens by ELISA Method: 3-Year Data

Pelin Yüksel, Deniz Gözde Çelik, Zeynep Güngördü, Tevhide Ziver, Sena İzmirli, Hakan Yakar, Suat Sarıbaş, Mustafa Aslan, Bekir Kocazeybek
İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışmada Ocak 2007-Aralık 2009 tarihleri arasında Fakültemiz Seroloji/ELISA Laboratuvarı'na, gastroenterit klinik bulgularıyla dışkı örneği gönderilen ve amip antijen testi istenen olgularda antijen pozitifliğinin dağılımı ve demografik verilerle ilişkisinin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çeşitli poliklinik ve servislerden, Seroloji/ELISA Laboratuvarı'na gönderilen dışkı örneklerinden ELISA yöntemi (Ridascreen Entamoeba [c1701], R-Biopharm, Almanya) ile 260 kd'luk *Entamoeba histolytica* Gal- veya GalNAc-spesifik lektin antijeni araştırılmıştır.

Bulgular: Antijen testi istenen 476 dışkı örneğinin 33'ünde (%7) amip antijeni pozitif bulunmuştur. Bu olguların 11'inin (%33) 41-50 yaş grubundan olduğu belirlenmiştir. Antijen pozitifliği en fazla 14 (%42) olguda sonbahar aylarında saptanmıştır.

Sonuçlar: Direkt mikroskopinin duyarlılığının düşük olmasından dolayı, amebiyaz şüphesi olan hastalarda tanıyı doğrulamak için, ELISA ile antijen tayini yönteminin kullanılması, verilecek tedavinin belirlenmesi veya gereksiz tedavinin önlenmesi açısından uygun olacaktır. *Klimik Dergisi* 2011; 24(3): 150-3.

Anahtar Sözcükler: ELISA, *Entamoeba histolytica*, lektin antijeni.

Abstract

Objective: In this study, we aimed to retrospectively evaluate the distribution of antigen positivity and its relation with demographic data in stool samples from patients with clinical gastroenteritis findings sent to our faculty Serology-ELISA Laboratory between January 2007 and December 2009 for the amoeba antigen test.

Methods: We investigated 260 kd *Entamoeba histolytica* Gal- or GalNAc-specific lectin antigen in stool samples that were sent to Serology/ELISA Laboratory from different clinics and outpatient clinics using ELISA (Ridascreen Entamoeba [c1701], R-Biopharm, Germany).

Results: 33 (7%) of 476 stool samples that were admitted for antigen test were determined as positive. Of 33 cases, 11 (33%) were between the ages of 41-50. Amoeba antigen positivity was detected mostly in autumn months in 14 (42%) cases.

Conclusions: Because of the low sensitivity of direct microscopy, we suggest that antigen detection using ELISA is beneficial for confirming the diagnosis in patients suspected of having amebiasis, to determine the treatment or to prevent unnecessary treatment. *Klimik Dergisi* 2011; 24(3): 150-3.

Key Words: Enzyme-linked immunosorbent assay, *Entamoeba histolytica*, lectin antigen.

Giriş

Amoebozoa şubesinin *Archamoeba* sınıfı üyesi olan, nemli ortamlarda yaşamını birkaç hafta devam ettirebilen *Entamoeba histolytica*'nın kistleri mide asidinde dirençli olup, bu kistlerin yapısında yirmiye yakın sistein proteinaz tanımlanmıştır. İntestinal epitel hücrelerinde

bazı proteinlere harabiyet vererek ve epitelin permeabilitesini artırarak, bu hücrelerden inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olurlar (1).

Amebiyazın rutin tanısında dışkı kültürü ve mikroskopi kullanılmaktadır. Kültürün özgüllüğü çok yüksek olup, bazı olgularda negatif sonuç verebilmektedir. Dışkı

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Bekir Kocazeybek, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Tel./Phone: +90 212 414 30 00 Faks/Fax: +90 212 632 00 50 E-posta/E-mail: bzeybek@istanbul.edu.tr
(Geliş / Received: 12 Kasım / November 2010; Kabul / Accepted: 2 Ağustos / August 2011)
doi:10.5152/kd.2011.37

mikroskopisinde ise *E. histolytica*/*E. dispar* ayrımı yapılamamaktadır. Ayrıca özellikle beklenmiş dışkı örneklerinde maya hücreleri ve lökositler *E. histolytica* ile karışabilmekte ve yalancı pozitif sonuçlar alınabilmekte, kist ve trofozoit salınımının olmadığı ülserasyon gelişmiş olgularda ise yalancı negatiflikler görülebilmektedir. Bu nedenle tanıda daha duyarlı ve özgül yöntemlerden ELISA yöntemiyle antijen aranması ve moleküler yöntemler önem kazanmaktadır. Özellikle *E. histolytica*'ya spesifik monoklonal antikolarla kaplı kitlerin kullanılmaya başlanmasıyla *E. histolytica*/*E. dispar* ayrımı da yapılabilmektedir. Özellikle deneyimi az olan laboratuvar ve merkezlerde dışkı mikroskopisine ek olarak kolay, pratik ve ucuz ELISA antijen testinin uygulanması, olası birçok yanlış tanının da önüne geçmiş olacaktır (2-4). Diğer bir tanı yöntemi de gittikçe yaygınlaşan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Genomik DNA'nın saptanması için PCR ticari olarak piyasada bulunmasa da, yüksek duyarlılığa sahip olması nedeniyle gözde tanı araçlarından biridir. Ancak bu konuda da dışkıdan istenen safılıkta ve yoğunlukta DNA elde edilmesinin zorluğundan ileri gelen bazı sorunlar vardır.

Amebiyaz insidansının belirlenip izlenmesinde kolay uygulanabilir, ucuz, serolojik olarak antikor ve dışkıda antijen testlerin kullanılmasıyla seroepidemiolojik verilerin belirlenmesi önem kazanmaktadır (5,6).

Çalışmamızda Ocak 2007 ile Aralık 2009 tarihleri arasındaki üç yıllık dönemde Fakültemiz Seroloji/ELISA Laboratuvarı'na, gastroenterit şikayetiyle başvuran ve amip antijen testi istenen olguların, dışkı örneklerinde saptanan antijen pozitifliğinin dağılımının ve demografik verilerle ilişkisinin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler

Ocak 2007-Aralık 2009 tarihleri arasında Fakültemiz Seroloji/ELISA Laboratuvarı'na, çeşitli poliklinik ve servislerden gönderilmiş gastroenterit bulguları olan hastalara ait dışkı örnekleri incelenmiştir.

Dışkı örneklerinde, ELISA (Ridascreen Entamoeba [c1701], R-Biopharm, Almanya), yöntemiyle 260 kd'luk *E. histolytica* Gal- veya GalNAc-spesifik lektin antijeni araştırılmıştır. Dışkı örneğindeki lektin varlığında, ortamdaki poliklonal antikolar ve konjugatta bulunan lektine spesifik monoklonal antikolar bağlanır.

İncelemeye alınan hastalar için laboratuvar tarafından herhangi bir sorgulama, anket veya araştırma yapılamamakla birlikte, bu hastaların antibiyotik kullanımı hakkında da bir sınıflamaya gidilememiştir. Laboratuvarımızda üç yıllık süre içinde toplam 476 olgunun dışkı örneği incelenmiştir. Hastalara ait cinsiyet, yaş, mevsimsel geliş tarihi, geldiği poliklinik veya servis gibi demografik bilgiler retrospektif olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Bulgular

Çalışmaya alınan 476 hastanın yaşları 6-80 arasında olup, yaş ortalamaları 43 olarak saptanmıştır. Yaş gruplarına göre incelediğimizde, amip antijen isteminin en sık 40-50 yaş (92 [%19] olguda) arasında olduğu belirlenmiştir. Test istenen 476 hastanın 233 (%49)'ünün kadın, 243 (%51)'ünün erkek

olduğu; mevsimlere göre dağılımda ise amip antijen isteminin en fazla sonbahar aylarında olduğu görülmüştür. Örneklerin en fazla İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Servisi'nden gönderildikleri belirlenmiştir. Demografik veriler ayrıntılı olarak Tablo 1'de gösterilmiştir.

Amip antijen testi istenen 476 dışkı örneğinin 33 (%7)'ünde antijen pozitif olarak saptanmıştır. Yaş gruplarına göre pozitif amip antijen dağılımı incelendiğinde, pozitif saptanan toplam 33 olgunun 11 (%33)'inin 41-50 yaş grubunda olduğu belirlenmiştir. Mevsimlere göre dağılımında ise amip antijen pozitifliği 14 (%42) olguda en fazla sonbahar aylarında saptanmıştır. Örneklerin geldikleri servislere göre dağılımı incelendiğinde 33 pozitif hastanın 13 (%39)'ünün İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Servisi'nden geldiği belirlenmiştir (Tablo 2).

İrdeleme

Amebiyaz dünyada ikinci sıklıkta görülen paraziter hastalık olup, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre sıtma ve şistozomiyazdan sonra üçüncü en sık ölüm nedenidir. Gelişmekte olan ülkelerdeki asemptomatik bireylerde amip prevalansı %1-21'dir. Almanya'dan tropikal bölgelere seyahat

Tablo 1. Çalışmaya Alınan Olguların Gönderildiği Servisler ve Demografik Verileri

Demografik Veriler	Örnek Sayısı (%)	
Cinsiyet		
Erkek	243	(51)
Kadın	233	(49)
Yaş Grupları		
0-10	64	(14)
11-20	38	(8)
21-30	78	(16)
31-40	72	(15)
41-50	92	(19)
51-60	61	(13)
61-70	55	(12)
71-80	16	(3)
Mevsimler		
İlkbahar	80	(17)
Yaz	95	(20)
Sonbahar	175	(37)
Kış	126	(26)
Servisler		
İç Hastalıkları Gastroenteroloji	229	(48)
Genel Dahiliye	98	(21)
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	96	(20)
İç Hastalıkları Hematoloji	24	(5)
Kadın Hastalıkları	17	(4)
Genel Cerrahi	12	(2)
Toplam	476	(100)

Tablo 2. Amip Antijen Pozitifliğinin Hastaların Demografik Parametrelerine Göre Dağılımı

Demografik Veriler	Antijen Pozitifliği	
	n	(%)
Cinsiyet		
Erkek (n=243)	18	(8)
Kadın (n=233)	15	(7)
Yaş Grupları		
0-10 (n=64)	3	(5)
11-20 (n=38)	1	(3)
21-30 (n=78)	7	(9)
31-40 (n=72)	5	(7)
41-50 (n=92)	11	(12)
51-60 (n=61)	3	(5)
61-70 (n=55)	2	(4)
71-80 (n=16)	1	(6)
Mevsimler		
İlkbahar (n=80)	4	(5)
Yaz (n=95)	6	(6)
Sonbahar (n=175)	14	(8)
Kış (n=126)	9	(7)
Servisler		
İç Hastalıkları Gastroenteroloji (n=229)	13	(6)
Genel Dahiliye (n=98)	7	(7)
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (n=96)	9	(9)
İç Hastalıkları Hematoloji (n=24)	2	(8)
Kadın Hastalıkları (n=17)	1	(6)
Genel Cerrahi (n=12)	1	(8)

sonrası geri dönüşlerde *E. histolytica* prevalansı %0.3 olup, gelişmiş ülkelerdeki yüksek risk grubunda prevalans %4'tür. Esas olarak Orta-Güney Amerika, Afrika ve Hindistan'da yaygındır. Tropik ve ılıman tüm bölgelerde endemiktir. Gelişmiş ülkelerde nadir görülür. 1993'te Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin bildirdiği 2970 amebiyaz olgusunun yarısının göçmen olduğu bildirilmiştir (7-9).

Gelişmekte olan ülkelerde yaşayan insanlar gelişmiş ülkelere göre daha sık ve daha erken yaşta *E. histolytica* ile infekte olmaktadır. İtalya, Japonya ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde homoseksüeller grubunda prevalans %4-21 olup etken noninvazif *E. dispar*'dır. DSÖ 1997 verilerine göre (*E. dispar* ayrımı yapılmadan önce); 500 milyon kişinin *E. histolytica* ile infekte olduğu söyleniyordu. Bu olguların 50 milyonu semptomatikti ve yılda 100 bin kişinin ölüm nedeniydi (9). Türkiye'de amip prevalansı %0.4-18.4 olup Güney ve Güneydoğu Bölgeleri'nde endemiktir (10). Eski tarihli yayınlar ışığında amebiyaz prevalansı ile ilgili çalışmalarda, morfolojik olarak aynı olan *E. dispar* ile ayrımı yapılmadığı için prevalansla ilgili yorum yapmak zordur.

Morfolojik olarak birbirlerine benzerlik gösteren *E. histolytica/E. dispar* ayrımının yapılması hastalığın tedavi ve takibinde çok önemlidir. *E. histolytica* patojen olup klinik tablo-

lara yol açarken *E. dispar* kökenleri apatojendir. *E. histolytica/E. dispar* ayrımında zimodem analiziyle tanı konulabilmektedir; ancak bu yöntem oldukça zor ve zahmetlidir. Bu nedenle ancak referans laboratuvarlarında yapılabilmektedir. Bunun yerine *E. histolytica/E. dispar* ayrımı yapabilen ucuz, kullanım kolaylığı olan, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek test yöntemleri geliştirilmiştir. Patojen *E. histolytica* ile patojen olmayan *E. dispar*'ın ayrımında *E. histolytica*'da bulunan Gal- veya GalNAc-bağlayan lektin proteinini saptayan monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Piyasada hazır olarak bulunan ve %95'in üzerinde duyarlılık ve özgüllüğü olduğu ileri sürülen ELISA antijen kitleri dışında *E. histolytica/E. dispar*'ın ayrımı yapılabilmekte, böylece dışkı mikroskopisinde pozitif saptanan *E. histolytica/E. dispar* olgularının doğrulanmasında ELISA ile antijen aranmasının önemi ortaya çıkmaktadır (11-13).

Bangladeş'in kırsal bölgesinde yaşayan çocuklarda *E. histolytica* yaygınlığını araştırmak için yapılan bir çalışmada monoklonal ELISA yöntemi kullanılmış ve %8'lik antijen pozitifliği bulunmuştur (14). Nesbitt ve arkadaşları (15)'nin 842 dışkı örneğini inceledikleri çalışmada, ELISA yöntemiyle amip antijeni araştırılmış ve *E. histolytica* prevalansının %0.8 olduğu bildirilmiştir.

Ankara'dan Tanyüksel ve arkadaşları (16) 2005 yılında 380 olguyla yaptıkları çalışmada, 51 (%13) olguda amip antijeni saptamışlardır. Yine Ankara'dan Ülçay ve arkadaşları (17)'nin 2008 yılında 80 ishali olguyla yaptıkları çalışmada *E. histolytica* antijeni aranmış ve olguların sadece 1 (%2.8)'inde amip antijeni tespit edilmiştir. Zonguldak'tan Mengeloğlu ve arkadaşları (18), 2009 yılında 1720 dışkı örneğiyle yaptıkları çalışmada 26 (%1.5) örnekte amip antijeni saptamışlardır. Yine Tuncay ve arkadaşları (19)'nin İzmir'de yaptıkları çalışmada 9378 dışkı örneği incelenmiş bunların 33 (%0.4)'ünde amip antijeni saptanmıştır. Şanlıurfa'dan Zeyrek ve arkadaşları (20) 2006 yılında 1600 dışkı örneğinden mikroskopik olarak şüphelendikleri 87 örnekte ELISA ile amip antijeni araştırmışlar ve 19 (%1.2)'ünde spesifik amip antijeni saptamışlardır.

Çalışmamızda ise amip antijen test istemi olan 476 dışkı örneğininin 33 (%7)'ünde amip antijen testi pozitif bulunmuştur. Yaş gruplarına ve cinsiyete göre pozitif amip antijen dağılımı incelendiğinde, ELISA pozitifliğinin cinsiyetle bir ilişki saptanmamakla birlikte, 33 olgunun 11 (%33)'inin 41-50 yaş grubunda olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar literatürde mevsimsel olarak bir anlamlılık olmasa da çalışmamızda 14 (%42) olguda olmak üzere en fazla sonbahar aylarında pozitiflik saptanmıştır.

Sonuçlarımızın yüksek orandaki pozitifliği, klinik olarak amebiyaz ön tanısı almış hastalardan seçilmiş olguların fazlalığından ileri gelmiş olabilir. Sosyoekonomik düzeyi yüksek ve su kontaminasyonu ile direkt olarak ilişkili olabilecek kanalizasyon ve su şebekesi problemlerinin fazla olmadığı bir metropolde yapılan çalışmamızdaki bu yüksek oran, İstanbul şehrinin amebiyaz yönünden endemik olan bölgelerden, siyasal, sosyal ve ekonomik nedenlerle göç almasına da bağlanabilir. Sonuç olarak, amebiyaz şüphesi olan hastalarda tanıyı doğrulamak için, direkt mikroskopi ve ELISA ile antijen tayini yönteminin bir arada kullanılmasının, hastaya verilecek tedavinin belirlenmesi veya hastanın gereksiz tedavi almasının önlenmesi açısından uygun olacağını düşünmekteyiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Yakut M, Özden A. Amip, amebiasis ve ilişkili hastalıklar. *Güncel Gastroenteroloji*. 2008; 12(2): 81-97.
2. Aksoy Ü. *Entamoeba histolytica* Antijeninin Dışkıda ELISA Yöntemi ile Aranması ve Direkt Bakı Yöntemleri ile Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 1998.
3. Doğançlı L. Ülkemizde amebiasis tanısında ve tedavisinde sorunlar. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. 2007; 16(1): 1-14.
4. Taylan Özkan A. Rutin dışkı bakısına alternatif: antijen tarama yöntemleri. In: 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi (18-25 Eylül 2005, İzmir) Özet Kitabı. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği. 2005: 58-60.
5. Inceboz T, Uner A. The value of determining antibodies against *Entamoeba histolytica* in stool samples using ELISA test in the diagnosis of amebiasis. *Türk Parazitol Derg*. 2000; 24(1): 25-8.
6. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(9): 2405-7.
7. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(4): 713-29. [CrossRef]
8. Walderich B, Weber A, Knobloch J. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57(1): 70-4.
9. Amebiasis. *WHO Weekly Epidemiol Rec*. 1997; 72: 97-100.
10. Değirmenci A, Naser S, Güneş K, et al. Ege Üniversitesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarında 2005 yılı boyunca saptanan barsak parazitlerinin dağılımı. *Türk Parazitol Derg*. 2007; 31(2): 133-5.
11. Abd-Alla MD, Jackson TF, Gathiram V, el-Hawey AM, Ravdin JI. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(11): 2845-50.
12. el-Hamshary EM, el-Shewy KA, Hegazy MM, Zakaria H. Diagnostic potentials of copro-antigen detection based ELISA, compared to microscopy in intestinal amoebiasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 2004; 34(2): 601-10.
13. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(10): 2558-61.
14. Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lysterly DM, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis*. 1997; 175(3): 734-6. [CrossRef]
15. Nesbitt RA, Mosha FW, Katki HA, Ashraf M, Assenga C, Lee CM. Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Natl Med Assoc*. 2004; 96(5): 671-7.
16. Tanyuksel M, Yılmaz H, Ulukanlıgil M, et al. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol*. 2005; 110(3): 322-6. [CrossRef]
17. Ülçay A, Görenek L, Coşkun Ö, Araz E, Acar A, Eyigün CP. İmmün yetmezlikli hastalarda intestinal protozoonların tanısı. *Türk Parazitol Derg*. 2008; 32(4): 328-33.
18. Mengeloğlu FZ, Aktaş E, Külah C, Beğendik Cömert F. Dışkı örneklerinde ELISA yöntemi ile *Entamoeba histolytica*'nın saptanması. *Türk Parazitol Derg*. 2009; 33(1): 1-3.
19. Tuncay S, Inceboz T, Över L, et al. Dışkıda *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında kullanılan yöntemlerin birlikte değerlendirilmesi. *Türk Parazitol Derg*. 2007; 31(3): 188-93.
20. Yıldız-Zeyrek F, Özbilge H, Yüksel M, Zeyrek CD, Sırmatel F. Şanlıurfa'da parazit faunası ve ELISA yöntemi ile dışkıda *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* sıklığı. *Türk Parazitol Derg*. 2006; 30(2): 95-8.