

Dışkı Örneklerinde *Entamoeba histolytica* "Galactose-Inhibitable-Adherence Protein" (GIAP) Antijeninin ELISA ile Aranması ve Sonuçların Mikroskopisi ile Karşılaştırılması

Özden Büyükbaba, Gülçin Babaoğlu, Handan Katrancı, Ayşegül Uyar, Hayriye Kırkoyun, Ergene Büğet

Özet: Sosyoekonomik düzeyi düşük ve sanitasyon koşulları yeterli olmayan bir bölgedeki ilkokulun yedi yaş grubundan 74 öğrencisinin dışkı örneklerinde mikroskop incelemesi ve ELISA ile *Entamoeba histolytica* araştırılmıştır. Sadece mikroskop incelenmesi ile 3 (% 4) örnekte *E.histolytica* kisti belirlenirken, ELISA ile 18 (% 24)'ünde "Galactose-Inhibitable-Adherence Protein" (GIAP) antijeni belirlenmiştir. *E.histolytica*'nın tanısında mikroskop incelemesinin başarısızlığına yol açan çeşitli problemler birlikte alınarak, ELISA'nın özellikle *E.histolytica*'nın belirlenmesinde mikroskop incelenmesi ile birlikte kullanılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Entamoeba histolytica*, ELISA.

Summary: Investigation of *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable-adherence protein (GIAP) antigen in faeces by ELISA and comparison of the results by microscopic detection. *E.histolytica* was searched by ELISA and microscopic detection in the faeces of 74 primary school students, all seven 7 years old, in a low socioeconomic region with inadequate sanitation conditions. With microscopic investigation, in three of the samples (40%) *E.histolytica* cysts were seen, where as by ELISA, in 18 (24%) GIAP antigen was detected. When compared with microscopy, sensitivity and specificity of ELISA was 100% and 79%, respectively. Taking into consideration the problems causing unsuccessful microscopic investigations in the diagnosis of *E.histolytica* it was concluded that ELISA showed be used with microscopic detection in the diagnosis of *E.histolytica*.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, ELISA.

Giriş

Entamoeba histolytica, tropikal ve subtropikal bölgelerde daha yoğun olmak üzere dünyada yaygın olarak bulunan bir protozoondur. Sitma ve şistozomiyazdan sonra üçüncü sırada yer alan *E.histolytica* infeksiyonu sonucu dünyada her yıl 40 000-100 000 kişi ölmektedir (1-4). Prevalans sosyoekonomik düzey ve sanitasyona bağlı olarak değişim göstermekte, yurdumuzda Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgeleri başta olmak üzere yaygın olarak bulunmaktadır (5-9). Dünya nüfusunun % 10'unun *E.histolytica* ile infekte olduğu ve her yıl 500 000 000'dan fazla bireyi etkilediği bilindiği halde bu bireylerden sadece % 10'unda semptomatik hastalık (dizanteri, kolit, çeşitli organ ve dokularda amip apseleri) tabloları gelişmektedir. Semptomatik infeksiyonların daha az bireyde görülmesi, *E.histolytica*'nın patojen ve nonpatojen (*Entamoeba dispar*) suşlarının varlığına bağlanmaktadır (10-12).

Son yıllarda *E.histolytica*'nın birçok yüzey antijeni tanımlanmıştır. Bunlardan 170 kDa ağırlığındaki "Galactose-Inhibitable-Adherence Protein" (GIAP)'ın kolon mukusunu aşarak epitel hücrelerine ve konağın inflamasyon hücrelerine yapışmada ve hedef memeli hücrelerinin lizisinde rol aldığı ve patojen suşlarda bulunduğu bildirilmiştir (1,2,12). Ayrıca monoklonal

antikor, DNA hibridizasyon, PCR yöntemleri ve rRNA çalışmaları ile patojen ve nonpatojen suşlar arasındaki farklılıklar genetik düzeyde ortaya konmuştur (1,2,13,14). Yapılan analiz çalışmaları semptomatik invazif hastalıklarda rol oynayan suşlarda, farklı izoenzim (zymodem)'lerin varlığını göstermiştir. Nişasta-jel elektroforezi ile; heksokinaz, fosfoglukomutaz, glukoz fosfat izomeraz, L-malat NADP⁺ oksidredüktaz enzimlerinin pozisyon farklılıklarına göre, *E.histolytica* (patojen) ve *E.dispar* (nonpatojen) suşlarının ayrımı sağlanabilmiştir (1).

Günümüzde amöbyoz tanısı genellikle dışkının mikroskop incelenmesi ile yapılmaktadır. Mikroskop incelemelerinde alınan sonuçlar; trofozoitlerin çok duyarlı olması, kist ve trofozoitlerin aralıklı olarak atılması ve bu nedenle dışkı örneklerinin birkaç kez incelenmesi gerektiği, hastanın kullandığı bazı ilaçların amibin morfolojisini bozabilmesi, deneyimsiz kişilerin lökosit ve makrofaj veya patojen olmayan diğer amipleri *E.histolytica* olarak tanımlayabilmeleri gibi nedenlerle doğru olmamakta yalancı pozitif ve negatif sonuçlar alınmaktadır (15,17). Ayrıca mikroskop incelemesi ile patojen ve nonpatojen suşlar ayrılamamakta, bu da gereksiz tedaviler uygulanmasına yol açabilmektedir (1).

Çalışmamızda GIAP antijenine özgül monoklonal antikor içeren ELISA (Alexon) kiti kullanılarak, sosyoekonomik düzeyi düşük ve yetersiz alt yapı koşullarına sahip bir bölgede bulu-

Tablo 1. Dışkıda *E.histolytica*'nın Belirlenmesinde ELISA'nın Duyarlılık ve Özgüllük Yönünden Mikroskop İncelemesi ile Karşılaştırılması

	Mikroskop İncelemesi Pozitif	Mikroskop İncelemesi Negatif	Toplam
ELISA ile pozitif	3 (a)	15 (b)	18
ELISA ile negatif	0 (c)	56 (d)	56
Toplam	3	71	74
Duyarlılık: $\frac{a}{a+c} 100 \rightarrow \frac{3}{3+0} 100 = \% 100$			
Özgüllük: $\frac{d}{d+b} 100 \rightarrow \frac{56}{56+15} 100 = \% 79$			

nan Büyük Halkalı İlkokulu'nun yedi yaş grubundan 74 öğrencisinin dışkı örneklerinde GIAP antijeni aranmış, bu sonuçlar mikroskopik inceleme sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Yöntemler

Yedi yaş grubundaki 74 öğrenciden alınan taze dışkı örnekleri iki ayrı kabı bölünmüştür. Bir kaptaki dışkı örneklerinden direkt fizyolojik tuzlu su preparasyonları ile *E.histolytica* kistlerinin yoğunlaştırılması için önerilen formol-eter çöktürme yöntemi uygulanarak konsantrasyon Lugol çözeltisi ile boyalı preparasyonlar hazırlanmış ve mikroskopta incelenmiştir (17,18). Diğer kaptaki dışkı örnekleri ELISA ile GIAP antijeni aranmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiş ve 48 saat içinde incelenmiştir.

Sonuçlar

74 dışkı örneğinin, fizyolojik tuzlu su ve formol-eter ile çöktürme yöntemi ile hazırlanan preparasyonlarında, *E.histolytica* trofozoiti belirlenmemiş, üçünde ise (% 4) *E.histolytica* kistleri görülmüş, bu örneklerde ELISA ile de GIAP antijeni saptanmıştır. Mikroskop incelemesinde *E.histolytica* kist ve trofozoiti belirlenmeyen 71 dışkı örneğinin 15'inde (% 21) ELISA ile *E.histolytica* antijeni belirlenmiştir. Mikroskop incelenmesinde 12 *Entamoeba coli* kisti belirlenen dışkı örnekleri ELISA ile negatif sonuç vermiştir. Ayrıca *Giardia intestinalis* (n=13), *Ascaris lumbricoides* ve *Trichuris trichiura* (n=18), *Enterobius vermicularis* (n=5), *Hymenolepis nana* (n=9) belirlenmiş olan dışkı örneklerinde de ELISA ile negatif sonuçlar alınmıştır.

Dışkıda *E.histolytica*'nın gösterilmesinde ELISA sonuçları mikroskop incelemesi ile karşılaştırıldığında, duyarlılığının % 100, özgüllüğünün % 79 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

İrdeleme

Barsak amöbyazı, basilli dizanteri, ülseratif kolit, Crohn hastalığı gibi barsak hastalıkları ile benzer yakınmalara ve klinik bulgulara neden olmakta, ayrıca barsak amöbyazının farklı bir şekli olan amöboma, barsak karsinomu ile karıştırılabilmektedir (19,22). Oluşturduğu infeksiyonlar tedavi edilmediğinde ciddi sonuçlara yol açabilen *E.histolytica*'nın doğru laboratuvar tanısı çok önemlidir. Amöbyaz tanısında kesin kriter, amibin trofozoit ve kist şekillerinin görülmesi olmakla beraber, bu yolla *E.histolytica* ve *E.dispar*'ın ayırt edilememesi, dış ortam ko-

şullarına çok duyarlı olan trofozoitlerin çabuk bozulabilmesi, kist ve trofozoitlerin aralıklı atılması, benzer başka hücrelerle karıştırılabilmesi tanıda yanlışlara yol açmaktadır (16,17). Mikroskop incelemesinin başarısını araştırmaya yönelik bir çalışmada günde bir çalışmada günde 100 000 kist çıkaran bir bireyde kistlerin mikroskopta görülme şansını % 50, günde 1000 kist çıkaran bir bireyde ise bu şansın % 0.45 olduğu bildirilmiştir (23).

Diğer bir çalışmada, *E.histolytica*'nın tanısında, mikroskop incelemesinin altı ve dokuz ayrı dışkı örneği ile çalışıldığında başarı oranlarının sırası ile % 72 ve % 76 olduğu bildirilmiştir (24). Winayak ve arkadaşları (25), mikroskop incelemesinin barsak amöbyazının tanısında klasik bir yöntem olduğunu, ancak klinik olarak şüpheli olgularda % 30-40'lara varan yalnızca negatif sonuçlar alınabildiğini saptamışlardır. Çalışmamızda 74 öğrenciden alınan birer dışkı örneği incelenmiş, mikroskop incelenmesinde sadece 3 (% 4)'ünde *E.histolytica* kistleri belirlenmiştir.

E.histolytica'nın mikroskop tansındaki problemler son yıllarda dışkıda spesifik antijen belirlenmeye yönelik ELISA kitlelerinin geliştirilmesi ile çözülmeye başlamıştır. *E.histolytica*'nın barsak mukozasına invazyonu dört aşamada gerçekleşmektedir (2): [1] kolon mukozasına N-asetil-D-galaktozamin lektini ile aderans; [2] salgıladıkları katepsin B proteinaz, asidik proteinaz, kollagenaz, nötral proteinaz enzimleri ile barsak mukus bariyerini aşma; [3] epitel hücrelerine invazyon; [4] barsak epitel hücrelerinin lizisi.

İnvazyonun birinci aşaması için gerekli olan *E.histolytica*, galaktoz-spesifik adezini 260 kDa ağırlığında bir yüzey proteindir. Bu protein 170 kDa ve 35 kDa ağırlığında iki altbirimden oluştuğu, 170 kDa'luk altbirimin aderans-inhibitör monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalarda yapışmada esas rolü üstlendiği bildirilmiştir (1). GIAP olarak adlandırılan bu yüzey antijeninin, antijenik epitoplarmın patojen ve nonpatojen suşlarda farklı olduğu bildirilmiştir (12). *E.histolytica* trofozoitlerinin Çin hamsteri ovaryum hücrelerine, insan kolon münisine in vitro aderansının GIAP proteinine bağlı olduğu, ayrıca bu aderans lektininin insan lökositleri, sıçan ve insan kolon mukoza ve submukozasına, insan eritrositlerine, opsonize olmuş yüzey lipopolisakaridlerinde galaktoz bulunan bakterilere tutunabilme özelliğinde olduğu bildirilmiştir (1).

Çalışmamızda GIAP antijenine karşı monoklonal antikor içeren ELISA kiti ile çalışılmıştır. İncelenen 74 dışkı örneğinin sadece 3 (% 4)'ünde *E.histolytica* kisti belirlenirken, ELISA ile bu oran % 24'e yükselmiştir. ELISA'nın duyarlılığının % 100, özgüllüğünün ise % 79 olduğu belirlenmiştir.

Gastrointestinal semptomları olan 150 hastanın dışkı örneklerinde ELISA ile GIAP antijeninin araştırıldığı bir çalışmada, tek dışkı örneği ile ELISA'da 116 örnekte antijen belirlenirken, üçer rektosigmoidoskopi ve dışkı örneklerinin mikroskop incelenmesinde sadece 52'sinde *E.histolytica* kist/trofozoiti saptanmıştır (25).

Sharma ve arkadaşları (26), gastrointestinal yakınmaları olan 102 hastanın dışkı örneklerini mikroskopi ve ELISA ile incelenmişler, ELISA'nın duyarlılığını % 100, özgüllüğünün ise % 93 olduğunu bildirmişlerdir.

Venezuela'da yapılan bir çalışmada, 177 dışkı örneği yine aynı yöntemlerle incelenmiş, yalnız ELISA'da 96 kDa'luk yüzey antijeni proteinine karşı elde edilen monoklonal antikorlar

kullanılmıştır. ELISA'nın duyarlılığı % 94.4, özgüllüğü ise % 98.3 olarak belirlenmiştir (27).

Vonsit ve arkadaşları (28), üç gruba ayırdıkları hastaların dışkı örneklerinde ELISA ile *E.histolytica* antijeni araştırmışlardır. Birinci grupta dışkı örneklerinde *E.histolytica* kist/trofozoitleri bulunan 40, ikinci grupta dışkılarında *E.histolytica* dışında diğer parazitler bulunan 48, üçüncü grupta parazit taşımayan 36 hastada ELISA ile pozitiflik oranlarını sırası ile % 77.5, % 2.1, % 2.7 olarak belirlemişler, yöntemin özgüllüğünün birinci grup için % 97.6, ikinci grup için % 93.9, üçüncü grup için % 91.1 olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar patojenik adezinin 170 kDa (GIAP)'luk alt-biriminde altı farklı antijenik epitop olduğunu, epitop 1 ve 2'nin tüm türlerde ortak, 3 ve 6'nın sadece *E.histolytica* lektininde bulunduğu bildirmişlerdir. Bu epitoplara özgül monoklonal antikorların ELISA'da kullanılması ile *E.histolytica* ve *E.dispar* ayrımının daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. 202 diyareli dışkı örneğinin incelediği çalışmalarında mikroskop incelemesi vekültür yöntemlerinin % 60 duyarlı, % 79 özgül olduğunu, bana karşılık dışkıda ELISA ile antijen aranmasının % 80 duyarlı, % 99 özgül olduğunu bildirmişler, *E.histolytica* ve *E.dispar* suşlarının ayırımında ELISA'da 3. ve 6. antijenik epitoplara karşı monoklonal antikorların kullanılması ile ayırımın % 95 duyarlı, % 93 özgül olduğunu göstermişlerdir (29). Çalışmamızda ELISA'nın duyarlılığı diğer araştırmalardakine benzer olarak % 100 bulunurken, olasılıkla incelenen dışkı sayısının azlığına bağlı olarak özgüllük (% 79) daha düşük bulunmuştur.

Dışkı örneklerinde GIAP antijeninin ELISA ile araştırılmasına yönelik olarak ülkemizde ilk kez yapılan bu çalışmamın sonuçları, bugüne değin yalnız mikroskop incelemesine dayalı olarak saptanan prevalansın gerçeği tam olarak yansıtmadığını, *E.histolytica* infeksiyonu tanısında mikroskop incelemesine ELISA'nın eklenmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

Kaynaklar

1. Radvin JI, Petri WA Jr. Entamoeba histolytica (amebiasis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:2395-408
2. Smith LA. Diagnostic parasitology. In: Mahon CR, Manuseelis G, eds. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. London: Saunders, 1995:735-40
3. Abd-Alla MD, Jackson TFHG, Gathiram V, El-Hawey AM, Radvin JI. Differentiation of pathogenic Entamoeba histolytica infections from nonpathogenic by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J Clin Microbiol* 1993;31:2845-50
4. Gonzales-Ruiz A, Haque R, Rehman T, et al. A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of Entamoeba histolytica. *J Clin Microbiol* 1992;30:2807-13
5. Daldal N. Parazitoloji poliklinik laboratuvarına başvuran kişilerde barsak protozoonlarının dağılımı. *Türk Parazitol Derg* 1986;9(1-2):5-11
6. Saygı G, Yılmaz M, Özçelik S. Sivas kapalı cezaevi hükümlü, tutuklu ve personelinde barsak parazitlerinin araştırılması. *Türk Parazitol Derg* 1991;15(1):67-75
7. Şimşekcan D, Toker R, Ersöz V, Coşkun S, Keskin M. İzmir ilinde resmi ve özel kuruluşlara ait 327 mutfak personelinde barsak parazitleri araştırılması. *Türk Parazitol Derg* 1991; 15(3-4):67-74
8. Unat EK, Akaslan I, Akaslan S, et al. Şanlıurfa'da dört ilkökuldaki öğrencilerin dışkılarının parazitoloji açısından incelenmesi sonuçları. *Türk Parazitol Derg* 1989;17(3-4):75-80
9. Tanyüksel M, Ergüven S, Tanrıöver B, Baylan O, Gün H. Amebiasis tanısında kullanılan mikroskopinin serolojik yöntemlerle (IFA, ELISA) karşılaştırılması. *Türk Parazitol Derg* 1995;19:476-82
10. Haque R, Kress K, Wood S, et al. Diagnosis of pathogenic Entamoeba histolytica infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J Infect Dis* 1993;167:247-9
11. Irusen EM, Jackson TFHG, Simjee AE. Asymptomatic intestinal colonisation by pathogenic Entamoeba histolytica in amoebic liver abscess; prevalence, response to therapy and pathogenic potential. *Clin Infect Dis* 1992;58:1802-6
12. Petri WA Jr, Jackson TFHG, Gathiram V, et al. Pathogenic and non-pathogenic strains of Entamoeba histolytica can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990;58:1802-6
13. Burchard GD, Hufert FD, Mirelman D. Characterization of 20 Entamoeba histolytica strains isolated from patients with HIV infection. *Infection* 1991;19:164-8
14. Tannich E, Burchard GD. Differentiation of pathogenic from non-pathogenic Entamoeba histolytica by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol* 1991;29:250-5
15. Krogstad D, Spencer H, Healy G. Current concepts in parasitology: amebiasis. *N Engl J Med* 1987; 298:262-5
16. Petterson M, Schoppe LE. The presentation of amoebiasis. *Am Med News* 1981;27:659-62
17. Smith JW, Bartlett MS. Diagnostic parasitology: introduction and methods. In: Balows A, Housler WJ, Herrmann KL, Iseberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1991:701
18. Esterez EG, Levine AG. Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of the direct wet mount. *J Clin Microbiol* 1985;22:666-9
19. Clark CG, Diamond LS. The Laredo strain and other "Entamoeba-like" amoebae are Entamoeba moshkovskii. *Mol Biochem Parasitol* 1991;46:11-5
20. Speelman P, Mc Glaughlin R, Kabir I, Bufler T. Differential clinical features and stool findings in shigellosis and amoebic dysentery. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:549-51
21. Tucker PC, Webster PD, Killpatric M. Amebic colitis mistaken for inflammatory bowel diseases. *Arch Intern Med* 1975;135:681-4
22. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. *Clinical Parasitology*. Ninth ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1984:33-8
23. Marsden APH, Smith HF. The detection of the cysts of E.histolytica in the feces by microbiology examinations. *Med J Ant* 1946;11:915-9
24. Stamm WP. The laboratory diagnosis of clinical amebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1957;51:306-12
25. Merino E, Glander W, del-Muro R, Ortiz L. Evaluation of the ELISA test for detection of Entamoeba histolytica in feces. *J Clin Lab Anal* 1990;4:39-42
26. Sharma M, Reed SL, Singh S, Talwar GP, Ghosh S. Characterization of monoclonal antibodies to conserved antigens of Entamoeba histolytica and E.dispar and development of a stool ELISA. *Hybridoma* 1994;13:123-30
27. Urdaneta H, Rangel A, Martinsky MS, Munoz JF, Hernandez M. Entamoeba histolytica: fecal antigen capture immunosay for the diagnosis of enteric amebiasis by a monoclonal antibody. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996;38:39-44
28. Wonsit R, Thammapalerd N, Tharavani J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of Entamoeba histolytica antigens in fecal specimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:166-9
29. 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;33:2558-61