

Çocuk ve Erişkin Yaş Grubunda Lateks Aglütinasyon Yöntemi ve ELISA ile *Helicobacter pylori* İnfeksiyonunun Araştırılması

Recep Öztürk¹, Fehmi Tabak², Nagehan Sezgiç¹, Ali Mert², Sevgi Ergin¹, Tufan Kutlu³, Haluk Şavlı²

Özet: *Helicobacter pylori*'ye karşı oluşan antikorlar, endoskopi uygulanmış 79 (42 hasta-37 kontrol) çocuk yaş grubu ve 71 (43 hasta-28 kontrol) erişkin yaş grubu kişide lateks aglütinasyon yöntemi ve ELISA ile araştırılmıştır. Direkt inceleme ve kültür sonuçları ile karşılaştırma yapıldığında lateks aglütinasyon testi ile çocuk yaş grubunda duyarlılığı % 69, özgüllüğü % 81, erişkin yaş grubunda duyarlılığı % 86, özgüllüğü % 82.1 olarak bulduk. ELISA ile çocuk yaş grubunda duyarlılığı % 88, özgüllüğü % 86.4, erişkin yaş grubunda duyarlılığı % 95.3, özgüllüğü % 89.3 olarak bulduk. ELISA'ya göre lateks aglütinasyon yöntemiyle duyarlılığın ve özgüllüğün daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuçta lateks aglütinasyonu basitçe yapılan ve hızlı sonuç veren bir test olmasına rağmen duyarlılığında ve özgüllüğünde özellikle çocuk yaş grubundaki düşüklük önemli bir sorun olarak görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: *Helicobacter pylori*, lateks aglütinasyonu, ELISA.

Summary: The detection of antibody response against *Helicobacter pylori* infection in childhood and adults by using latex agglutination method and ELISA. Antibodies against *Helicobacter pylori* were detected by ELISA and latex agglutination method in 79 (42 patients-37 controls) children and 71 (43 patients-28 controls) adults who underwent endoscopy. When latex agglutination method was compared with direct histologic examination and cultures, the sensitivity and specificity of latex agglutination method were found to be 69% and 81% in children and, 86% and 82.1% in adults, respectively. The sensitivity and specificity of ELISA were found to be 88% and 86.4% in childhood and, 95.3% and 89.3% in adults respectively. The sensitivity and specificity of ELISA were higher than latex agglutination in both group. In conclusion, although latex agglutination method is simple and rapid to perform, its low sensitivity and specificity, especially, in children seems to be an important problem.

Key Words: *Helicobacter pylori*, latex agglutination, ELISA.

Giriş

1983 yılında ilk olarak izole edilen *Helicobacter pylori* üzerinde o günden bu yana değişik araştırmalar sürdürülmektedir. Otoimmün olmayan B tipi akut kronik gastrit etkeni olarak kabul edilmesi (1), peptik ülser ile olan ilişkisi, eradike edilmesi ile peptik ülser nüksünün azaldığının bildirilmesi (2) ve *H.pylori* ile mide kanseri arasında ilişki olduğunun ileri sürülmesi (3-5) bu bak-teri ile olan infeksiyonların tanınmada değişik araştırmaların yapılmasına neden olmuştur.

Tanımda invazif yöntem gerektiren histolojik inceleme, hızlı üreaz testi, biyopsi kültürü ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi tekniklerin zorluğu yanında hasta uyumu sorunu nedeni ile invazif olmayan metodlara eğilim ortaya çıkmaya başlamıştır (1, 6-8). İnvazif olmayan metodlar arasında bakteriyel aglütinasyon, komplement birleşme reaksiyonu, ELISA ve "immunoblot" gibi serolojik testler yanında karbon izotop solunum testleri de bildirilmiştir (7, 9-11). Bu solunum testi özel cihazlara gereksinim gösteren bir metoddur (1,2).

Serolojik metodlar arasında ELISA ile *H.pylori*'ye karşı oluşan değişik antikorların başarıyla saptanabildiği değişik çalışmalarda bildirilmektedir (1,3,6,11,13-21). ELISA yöntemi, cihaza bağımlılık göstermesi ve en azından metoduna göre 2-6 saat zaman gerektirmesi yanında deneyimli personel de gerektirir. Bu açıdan biz hızlı ve kolay yapılabilen lateks aglütinasyon testinin *H.pylori*'ye karşı oluşan antikorları saptamadaki değerini çocuk ve erişkin yaş grubu üzerinde araştırdık.

Yöntemler

Fakültemizin İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroentero-Hepatoloji Bilim Dalına başvuran ve endoskopi yapılan hastaların kanları alınıp, serumları steril şekilde ayrılmıştır.

Çalışmaya yaşları 2-14 arasında değişen çocuk yaş grubundan toplam 79 kişi (hasta grubu 42, kontrol grubu 37), yaşları 15-72 arasında değişen erişkin yaş grubundan toplam 71 kişi (hasta grubu 43, kontrol grubu 28) alınmıştır. İlgili hastaların herbirinden alınan iki biyopsi örneği fosfat tamponlu su (PBS) içine koyularak hızla laboratuvara gönderilmiştir. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında ilgili biyopsi örnekleri Gram boyaması ve kültür yapılmak üzere incelemeye alınmıştır. Materyal, Yücel ve Sezgiç (20) tarafından geliştirilen, Unat'ın balıklı agar besiyerine koyun kanı (% 10), maya özü (5 gr/l), 2.3.5-trifenil-4-etrazolium klorür (TTC) (40 mg/l), vankomisin (6 mg/l), nistatin (12 500 U/l), nalidiksik asid (20 mg/l) ilave edilerek yapılan vasata ekilip Camp Gas Pak (Oxoid) ile mikroaerofil ortam sağlanan kavanozda 7 gün üretim sonucu değerlendirilmiştir.

Endoskopi yapılan hastalardan elde edilen serumlarda antikor aramak amacıyla Pyloriset (Orion Diagnostica, Finlandiya) lateks aglütinasyon yöntemi ve ELISA IgG (Helico-G, Orion Diagnostica, Finlandiya) yöntemi kullanılmıştır. Kitler firmanın önerisi doğrultusunda çalışılmıştır.

Sonuçlar

Biyopsileri incelenen çocuk yaş grubunda 79 olgunun 42'sinde kültürde üreme olmuştur. Bu olguların hepsinde Gram preparasyonunda *H.pylori* benzeri bakteriler görülmüştür. Bu grup, çocuk hasta grubumuzu oluşturmuştur. 37 olgu da direkt Gram inceleme ve kültür negatif sonuç vermiş, bunlar da çocuk kontrol grubunu

(1) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

(2) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

(3) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

Tablo 1. Çocuk Yaş Grubunda Alınan Sonuçlar.

	Kontrol (n= 37)		Hasta (n=42)		D*	Ö*
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		
Gram	0	37	42	0	100	100
Kültür	0	37	42	42	100	100
Lateks Agl.	7	30	29	13	69	81
ELISA	5	32	37	5	88	86.4

*D: Duyarlılık, Ö: Özgüllük

oluşturmuştur. Kontrol grubunda lateks aglütinasyonu 7 hastada, ELISA 5 hastada pozitif sonuç vermiştir. Böylece lateks aglütinasyon testinin özgüllüğü % 81, ELISA'nın özgüllüğü ise % 86.4 olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda duyarlılık lateks aglütinasyonla % 69, ELISA ile % 88 olarak saptanmıştır (Tablo 1).

Erişkin yaş grubunda 43 hasta, 28 kontrol toplam 71 olgu incelenmiştir. Burada hasta grubunda kültürde üreme olan olguların hepsinde Gram boyama yöntemi ile *H.pylori* benzeri bakteriler görülmüştür. Duyarlılık % 100 olarak bulunmuştur. Hasta grubunda iki hastada ELISA negatif sonuç vermiş, kontrol grubunda ise üç olguda ELISA pozitif sonuç vermiştir. Dolayısıyla ELISA yönteminin duyarlılığı % 95.3, özgüllüğü % 89.2 olarak bulunmuştur. Lateks aglütinasyon yönteminde ise duyarlılık % 86 özgüllük % 82.1 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

İrdeleme

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de *H.pylori* toplumda yaygındır (17,18). Girişte de belirtildiği gibi invazif bir işlem olan endoskopiye gerek gösteren üreaz, kültür gibi yapım zorluğu ve her yerde yapılabileceği olmayan yöntemler nedeniyle tanımda zorluklar oluşabilmektedir.

Değişik araştırmacıların saptadığı gibi *H.pylori* infeksiyonu sonrasında organizmada IgG, IgA ve IgM antikorları oluşmaktadır. Bunlardan özellikle IgG ve daha az önemde olmak üzere IgA araştırılması serolojik tanımda değerli bulunmuştur (1-4,9,12-17,19-26).

Bizde mevcut serolojik testlerden lateks aglütinasyon yöntemi ve ELISA yöntemini çocuk ve erişkin yaş grubu olgularda ayrı ayrı inceledik. Kültür sonuçlarını altın standard olarak kabul ettiğimizde çocuk yaş grubunda ELISA yöntemi % 88 duyarlılık, % 86.4 özgüllük göstermiştir. Aynı grupta lateks aglütinasyon yöntemi ile duyarlılık % 69, özgüllük % 81 olarak bulunmuştur. Erişkin yaş grubu olgularda ELISA yöntemi ile duyarlılık % 95.3, özgüllük % 89.2 olarak; lateks aglütinasyon yöntemi ile duyarlılık % 86, özgüllük % 82.1 olarak bulunmuştur.

Tüm serolojik testlerde olduğu gibi oluşan antikorları saptamada kullanılan antijenin niteliği ve kullanılan yöntem büyük önem arz etmektedir. Burada daha hassas bir yöntem olan ELISA duyarlılık ve özgüllük bakımından her iki grupta lateks aglütinasyonuna göre üstünlük gösteriyordu. Değişik araştırmacılar ELISA yöntemi ile duyarlı sonuçlar elde etmişlerdi. Özgüllük kullanılan antijenin niteliğine bağlı olarak sorun oluşturmuştur. Saflaştırma metodları uygulanarak özgüllük sorunu kısmen çözülmüştür (11,14-

Tablo 2. Erişkin Yaş Grubunda Alınan Sonuçlar.

	Kontrol (n= 37)		Hasta (n=42)		D*	Ö*
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		
Gram	0	28	43	0	100	100
Kültür	0	28	43	0	100	100
Lateks Agl.	5	23	37	6	86	82.1
ELISA	3	25	41	2	95.3	89.2

*D: Duyarlılık, Ö: Özgüllük

16). Duyarlı test olmasına rağmen ELISA kullanılan kitle göre 2-6 saat zaman almaktadır. Üstelik bir ELISA okuyucusuna ve deneyimli personele gereksinim göstermektedir.

Hızlı bir test olan lateks aglütinasyon yöntemi hakkındaki yayınlar az sayıdadır. Westblom ve arkadaşları (26) kültür sonuçlarına göre lateks aglütinasyon yönteminin duyarlılığını çocuk yaş grubunda % 36, erişkin yaş grubunda % 92, özgüllüğünü ise erişkin yaş grubunda % 66 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda çocuk yaş grubundaki duyarlılık daha yüksek saptanmıştır.

Taha ve arkadaşları (21) nonsteroid antiinflamatuar ilaç alanlarda ELISA Helico-G yönteminin duyarlılığını % 71, özgüllüğünü % 61 olarak; lateks aglütinasyon yönteminin duyarlılığını % 63, özgüllüğünü % 67 olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar çalışmalarında bizim kullandığımız asid ekstrakt antijenini kullanmıştır. Sonuçları bizimkinden kısmen farklıdır.

Hirschl ve arkadaşları (22), erişkin yaş grubunda lateks aglütinasyon yönteminin duyarlılığını % 90, özgüllüğünü tedavi edilmişlerde % 75 olarak bulmuşlardır. Sonuçlarımız kısmen uyumaktadır.

ELISA yöntemi ile alınan duyarlılık sonuçları % 70-100 arasında değişmektedir (14,15,19,20,23,25). Biz de ELISA yöntemi ile literatürde bulunan verilere yakın sonuçlar elde ettik.

Çocuk yaş grubunda gerek ELISA, gerek lateks aglütinasyon yöntemi erişkin yaş grubuna göre daha düşük bir duyarlılık göstermiştir. Özellikle lateks aglütinasyon yöntemi çocuk yaş grubunda % 69 gibi düşük bir duyarlılık göstermiştir. Yalancı pozitif sonuçlar her iki yöntemde de sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yalancı pozitiflik çapraz reaksiyonlara bağlı olabilir; nitekim kullandığımız antijenler tam purifiye antijenler değildir. Çalışmada çapraz reaksiyon verebilecek *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerle serum absorpsiyonu uygulamadık. Bu uygulama belki testlerin özgüllüğünü artırabilir. Ayrıca yalancı pozitifliğin bir nedeni antrumda yamalı bir dağılım gösteren *H.pylori*'ye yapılan biyopsilerle rastlanamaması olabilir. Bu durumda temelde bir infeksiyon olduğu halde çalışmamızda yalancı pozitifliğe neden olmuş olabilir.

Kültürün halen altın standard test olarak kabul edildiği günümüzde, Gram boyaması ile direkt incelemenin de % 100 duyarlılıkla tanıma yardımcı olduğu ve özgüllüğünün de % 100 bulunduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

Sonuç olarak *H.pylori*'nin serolojik tanımında lateks aglütinasyon yönteminin çocuk yaş grubunda düşük duyarlılık gösteren bir test olduğu; erişkin yaş grubunda ise hızlı sonuç veren bir ön tarama olarak kabul edilebilecek duyarlı sonuçlar sağlayabildiği gösterilmiştir.

Kaynaklar

- Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*. 19th ed. Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange, 1991: 234-5
- Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titers after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992; 339:893
- Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D Northfield TC. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adults life. *Lancet* 1992; 339: 896-7
- Nomura A, Stemmerma GN, Chyau PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blasser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 321: 1132
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* and risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 256-7
- Skirrow MB. *Campylobacter and Helicobacter infections of man and*

- animals. In: Smith GR, Easman CSF, eds. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. 8th ed. Vol II. London: Edward Arnold, 1990: 537-40.
8. Westblom TU, Phadnis S, Yang P, Czinn SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 367-71
 9. Feigin RD, Martin AB. *Helicobacter pylori* (Campylobacter pyloridis). In: Behrman RE, Kliegman RM, Nelson WE, Vaughan III VC, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: WB Saunders, 1992; 758-9
 10. Jones DM, Elridge J, Fox AJ, Sethi P, Whorewell PJ. Antibody to the gastric Campylobacter-like organisms (Campylobacter pyloridis): clinical correlation and distribution in the normal population. *J Med Microbiol* 1986; 22: 57-62
 11. Von Wulffen H. An assessment of serological tests for detection of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 577-82
 12. Barthel JS, Everett ED. Diagnosis of Campylobacter pylori infections: The "gold standard" and the alternatives. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl 1): 107
 13. Blaser MJ. Campylobacter species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990: 1655-6
 14. Crabtree JE, Shallicross TM, Heatlye RV, Wyatt JI. Evaluation of a commercial ELISA for serodignosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol* 1991; 44: 326-8
 15. Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Klein PB. A sensitive and spesific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection. *Gastroenterology* 1989; 96: 1004
 16. Feulde M, Schröder JP, Sobe D. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections by detection of immunoglobulin G antibodies using an immunoblot technique and enzyme immunoassays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 589-94
 17. Güral Mİ, Babacan F. *Helicobacter pylori*'ye bağlı gastrit tanısında serum immunoglobulin G düzeylerinin bir ELISA sistemi ile araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1992; 22: 10-5
 18. Karabiber N, Türek S, Ülker A, Onaran L. Gastritisli ve peptik ülserli hastaların endoskopik biopsi örneklerinden *Helicobacter pylori* izolasyonu ve serolojik çalışmaları. *Doğa Turk J Med Sci* 1992; 16: 483-8
 19. Oderda G, Vaira D, Holton J, Dowsett JF, Ansaldi N. Serum pepsinogen I and IgG antibody to Campylobacter pylori in nonspecific abdominal pain in childhood. *Gut* 1989; 30: 912-6
 20. Paterak E, Mentis A, Spiliadis C, Sophianos D, Stergiatou I, Skandalis N, Weir DM. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Greece. *FEMS Microbiol Immunol* 1990; 2: 129-36
 21. Taha AS, Boothman P, Nakshaband I, Reid J, Morran C, Gemmel CG, Lee PD, Sturrock RD, Russel RI. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: comparison and influence of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Pathol* 1992; 45: 709-12
 22. Hirschl AM, Hirschl MM, Berger J, Rotter ML. Evaluation of a commercial latex test for serological diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in treated and untreated patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 971-4
 23. Perez-Perez GI, Dworkin SM, Chodos JE, Blaser MJ. Campylobacter pylori antibodies in humans. *Ann Intern Med* 1988; 109: 11-7
 24. Sezgiç N. *Helicobacter pylori*'nin geliştirilmiş balıklı besiyerinde üretilmesi ve diğer besiyerlerindeki üretimle karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1993
 25. Thomas JE, Watmore AM, Barer MR, Eastham EJ, Kehoe MA. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection in child-hood. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2641-6
 26. Westblom TU, Madan E, Gudipatis S, Midkiff BR, Czinn SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* in adult and pediatric patient by using Pyloriset, a rapid latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 96-8