

Entamoeba histolytica Tanısında Adezin Antijeninin Dışkıda ELISA Yöntemiyle AraştırılmasıDetection of the Adhesin Antigen in Stool for the Diagnosis of *Entamoeba histolytica* with the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) MethodFunda Doğruman Al¹, İlkiz Oğuz¹, Tuncer Özekinci²¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD**ÖZET**

Amaç: Morfolojik olarak benzer ancak immünolojik, moleküler biyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre genetik olarak farklı iki *Entamoeba* türünden invaziv *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) amibik kolit ve karaciğer apseleri oluşturmakta, diğer tür olan *E. dispar* ise non invaziv özellik taşımaktadır. Özellikle yeterli deneyimi olmayan laboratuvar çalışanları tarafından direkt mikroskopide *E. histolytica/dispar*; lökosit, makrofaj ve diğer trofozoitlerle karıştırılmaktadır. Bununla birlikte amipli dizanteri olgularında etken *E.histolytica* olduğu için kesin tanının yapılması tedavi planlanmasında büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda dışkıda *E. histolytica* adezin antijeninin aranması esasına dayanan ELISA yönteminin rutin tanı amacıyla kullanılması değerlendirilmiştir.

Yöntem: Rutin parazitolojik inceleme için laboratuvara gönderilen 553 dışkı örneği nativ lugol yöntemi ve trikrom boyama yapılarak mikroskopik olarak incelenmiştir. Mikroskopik olarak *E histolytica/dispar* kistlerinin görüldüğü dışkı örneklerinde adezin antijeninin varlığı, spesifik monoklonal ELISA (*E.HISTOLYTICA II* Techlab, Blacksburg VA 24060, USA) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. İstatistiksel analizlerde, Fisher ki-kare testi kullanılmıştır.

Bulgular: Nativ lugol boyama yöntemi ile *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapıları saptanan 29 (%5.2) dışkı örneğinin Trikrom boyama ile 22'sinde (%3.9) *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapıları tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile örneklerin 15'inde (%2.7) adezin antijeni pozitif olarak saptanmıştır. ELISA yöntemine göre trikrom boyama yönteminin duyarlılığı %86.6, özgüllüğü %35.7, pozitif prediktif değeri %59, negatif prediktif değeri %71 olarak saptanmıştır. İki yöntem arasında invaziv *E. histolytica* tanısı açısından istatistiksel fark anlamlı olarak saptanmıştır ($p<0.05$).

Sonuç: Patojen *E.histolytica* ile patojen olmayan *E.dispar* ayrımında *E.histolytica*'ya spesifik monoklonal ELISA adezin antijen testinin gereksiz tedavi uygulamalarının azaltılması için yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, amipli dizanteri, dışkı, tanı

Geliş Tarihi: 02.11.2014

Kabul Tarihi: 10.11.2014

ABSTRACT

Aim: *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) and *E. dispar* are morphologically identical but they are genetically distinct according to their immunological, molecular biological and biochemical characteristics. *E. histolytica* is the invasive species that leads to amoebic colitis and liver abscesses and *E. dispar* which exerts non-invasive features. Especially laboratory technicians who are not experienced enough can confuse the *E. histolytica/dispar* with leukocytes, macrophages and other trophozoites under direct microscopy. However, since *E. histolytica* is the reason for amoebic dysentery cases, certain and accurate diagnosis is very crucial in order to plan the treatment. In our study, we have used the ELISA technique which depends on searching the *E. histolytica* adhesin antigen in stool to bring this technique for the routine detection and diagnosis.

Materials and Methods: For the study, native-lugol method and trichrome staining was conducted with 553 stool samples that were sent to laboratory for the routine parasitological examination. Samples were examined microscopically. Stool samples which showed microscopic *E. histolytica/dispar* cysts, presence of adhesin antigen was examined by using specific monoclonal ELISA (*E.HISTOLYTICA II* Techlab, Blacksburg VA 24060, USA) technique. Fisher's exact test was used for statistical analysis.

Results: There were *E.histolytica/E.dispar* cysts and/or trophozoite structures in 22 stool samples (3.9%) with trichrome staining out of 29 stool samples (5.2%) in which *E.histolytica/E.dispar* cysts and/or trophozoite structures had already been detected according to native-lugol method. Adhesin antigen was detected in 15 stool samples (2.7%) according to ELISA technique. With respect to trichrome staining, the detected sensitivity was found as 86.6%, specificity as 35.7%, positive predictive value as 59% and negative predictive value as 71% according to ELISA method. Statistically significant difference was detected between the two methods regarding the diagnosis of invasive *E. histolytica*; $p<0.05$.

Conclusion: Eventually, monoclonal ELISA technique which specifically detects the *E.histolytica* adhesin antigen and distinguishes the pathogenic *E.histolytica* from non-pathogenic *E.dispar* should be used to decrease the unnecessary treatments.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, amebic dysentery, stool, diagnosis

Received: 02.11.2014

Accepted: 11.10.2014

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr.Funda Doğruman-Al, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 06500 Beşevler, Ankara Türkiye, E-posta: alfunda@yahoo.com

©Telif Hakkı 2015 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2015 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2015.06>

Entamoeba cinsi insan barsak lümeninde yerleşen bir protozoonur. Bilinen altı türü bulunmaktadır. Bu türler; *E.histolytica*, *E.dispar*, *E.moshkovskii*, *E.polecki*, *E.coli* ve *E.hartmanni*'dir. İnsanlarda amebiyaz enfeksiyonunu oluşturan tek patolojik tür olarak *E.histolytica* gösterilirken, diğerleri non-patojen olarak kabul edilmektedir. Amebiyaz, tüm dünyada yaygın olarak görülen önemli bir parazit enfeksiyonu ve halk sağlığı sorunudur. Gelişmekte olan ülkeler için halen önemli bir halk sağlığı sorunu olan amebiyazın kısa zamanda ayırıcı tanısının yapılması tedavi açısından önem taşımaktadır (1).

Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık %10'unun *E.histolytica/E.dispar* ile enfekte olduğu ve enfekte kişilerin %90'ında, etkenin *E.dispar* olduğu tahmin edilmektedir (2). Ülkemizdeki amip prevalansının ortalama %0.4-18.4 arasında olduğu ve Güney/Güneydoğu Anadolu bölgelerinde endemik olarak görüldüğü ifade edilmektedir. Tanıda en sık kullanılan yöntem direkt mikroskopi olmakla birlikte, patojen olmayan *E.Dispar* ile ayırımının yapılamaması, etkenin saptanmasına yönelik daha güvenilir yöntemlerin kullanımını gündeme getirmiştir. Bu amaçla, trikrom boyama ve kültür gibi yöntemlerin yanı sıra, ELISA ile dışkıda amip antijeni aranması ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemlerin, direkt mikroskopik bakı ile birlikte uygulanmasının tanıya önemli katkılar sağlayabileceği ileri sürülmüştür (3).

Antijen saptayan ELISA testlerinin; *E.histolytica* ve *E.dispar*'ı ayırt edebilmesi, duyarlılık ile özgüllüklerinin yüksek olması, ucuz, sonuçların objektif olarak değerlendirilebilmesi, deneyim gerektirmemesi ve çok sayıda örneğin aynı anda değerlendirilebilmesi gibi avantajları vardır (4).

Çalışmamızda *E.histolytica* adezin antijeninin aranması esasına dayanan ELISA yönteminin rutin tanı amacıyla kullanılması değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çeşitli kliniklerden rutin parazitolojik inceleme için laboratuvara gönderilen 553 dışkı örneği nativ lugol yöntemi ve trikrom boyama yapılarak mikroskopik olarak incelenmiştir. Dışkı örneklerinden kuru ependorf tüplerine ayrılarak ELISA çalışılncaya kadar -20°C'de çalışılncaya kadar saklanmıştır. Mikroskopik olarak *E.histolytica/dispar* kistlerinin görüldüğü dışkı örneklerinde adezin antijeninin varlığı, spesifik monoklonal ELISA (*E.HISTOLYTICA II* Techlab, Blacksburg VA 24060, USA) yöntemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. İstatistiksel analizlerde Fisher kesin ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Nativ lugol boyama yöntemi ile *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapıları saptanan 29 (%5.2) dışkı örneğinin trikrom boyama ile 22'sinde (%3.9) *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapıları tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile örneklerin 15'inde (%2.7) adezin antijeni pozitif olarak saptanmıştır. ELISA yöntemine göre trikrom boyama yönteminin duyarlılığı %86.6, özgüllüğü %35.7, pozitif prediktif değeri %59, negatif prediktif değeri %71 olarak saptanmıştır. İki yöntem arasında invaziv *E.histolytica* tanısı açısından istatistiksel fark anlamlı olarak saptanmıştır (p<0.05).

TARTIŞMA

Barsak yüzeyindeki *E.histolytica* enfeksiyonları genellikle asemptomatik seyreder, parazitin yerleştiği bireylerin %85-90'ında herhangi bir klinik belirti ortaya çıkmaz (5). Dünya Sağlık Örgütü, 1997 yılında *E.dispar*'lı olguların tedavi edilmemesi, semptomu olsun olmasın kesin olarak *E.histolytica* tanısı alan hastaların ise mutlak tedavi edilmesini gerektiğini belirtmiştir (6). Ülkemizde bu konuda yapılan çok farklı çalışmalarda *E.histolytica/E.dispar* yaygınlık oranı değişkenlik göstermekte ve bu oran %0,5-17,6 gibi bir aralıkta yer almaktadır (7).

Delialioğlu ve ark. yaptıkları çalışmada ishali hastalara ait 272 dışkı örneğinde trikrom boyama ile %8.8 oranında *E.histolytica/E.dispar* saptarken, spesifik antijen ELISA yöntemi ile %7.7 oranında *E.histolytica* pozitifliği saptamışlardır (8). Tüzemen ve Doğan çalışmalarında 354 olguya ait dışkı örneğinin 84 (%23.7)'ünde direkt mikroskopi, 61 (%17.2)'inde trikrom boyama, 46 (%12.9)'sında kültür, 31 (%8.7)'inde ELISA ve 9 (%2.5)'unda PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Direkt mikroskopide şüpheli amip kist/trofozoitleri görülen örneklerden; %54.7 (46/84)'si trikrom boyama, %39.3 (33/84)'ü kültür, %15.5 (13/84)'i ELISA ve %7.1 (6/84)'i PCR ile pozitif olarak saptanmıştır (9).

Geleneksel mikroskopi yönteminin düşük duyarlılığı ve özgüllüğü tanıda önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Dışkıda lökosit, makrofaj varlığının yanında, *E.dispar* ve *E.moshkovskii* gibi patojen olmayan türlerin bulunması yanlış pozitifliklere neden olmaktadır. Direkt mikroskopinin duyarlılığının en iyi koşullarda %10-60 arasında değiştiği bildirilmiştir. Tuncay ve arkadaşları, saptadıkları 41 *E.histolytica/E.dispar* olgusundan ancak 25 (%61)'ini mikroskopik inceleme ile tanımlayabilmişlerdir (10). Zeyrek ve ark.nın çalışmasında, direkt mikroskopi ile şüpheli bulunan 87 dışkı örneğinin %21.7'sinde ELISA ile, %26.4'ünde ise trikrom boyama yöntemi ile *E.histolytica/E.dispar* pozitifliği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, *E.histolytica/E.dispar* sıklığını trikrom boyama ile %1.4 (23/1600), ELISA yöntemiyle %1.2 (19/1600) olarak bildirmişlerdir(11). Tanyüksel ve ark.nın yaptığı çalışmada da, ülkemizin Van ve Şanlıurfa'da 380 dışkı örneği direkt mikroskopi ve ELISA yöntemi ile araştırılmış; örneklerin %24'ü trikrom boyama, %13'ü ELISA ile pozitif bulunmuştur. Mikroskopi ile pozitif bulunan 91 örneğin 14 (%15)'ü ELISA ile pozitif sonuç vermiştir (12).

Brezilya'da 6-14 yaş arası değişen 1403 çocuğa ait dışkı örneklerinin mikroskopik incelenmesinde %5.7 oranında *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapılarını tespit edilmiş, her iki türü saptayan ELISA yöntemi ile %15.7, sadece *E.histolytica*'ya özgül ELISA yöntemi ile bu oran %3.1 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle *E.histolytica*'yı saptayan ELISA yöntemlerinin kullanılması gereksiz tedaviyi engellemiş olacaktır (13). Diğer bir çalışmada rastgele seçilen çocuk yaş grubundan 500 olguda mikroskopik olarak %6 oranında belirlenen *E.histolytica/E.dispar* pozitifliği antijen saptayan ELISA ile %3.2 oranında saptanmıştır (14). Mohanty ve ark.nın Hindistan'da yaptıkları çalışmalarında inceledikleri 167 dışkı örneğinin %9'unda (n=15) mikroskopik olarak *E.histolytica/E.dispar/E.moshkovskii* saptarken antijen spesifik ELISA ile *E.histolytica* oranını %6 (n=9) olarak belirlemişlerdir. Bulgularına göre mikroskopik incelemenin duyarlılığını %47.3 özgüllüğünü ise %95.7, pozitif prediktif değeri %60, negatif prediktif değeri %93.4 olarak belirlemişlerdir (15).

Sağlık Bakanlığı, tanı için geçerli laboratuvar tetkikleri olarak; klinik tanılamaya uygun olguların taze/sıcak dışkısının trikrom boyama ile mikroskopik incelemesinde eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin gözlenmesi ve dışkı örneklerinden spesifik epitoplara karşı monoklonal antikorların kullanıldığı ELISA yöntemi ile *E.histolytica* ve *E.dispar* ayırımı yapılarak *E.histolytica* için elde edilen pozitif sonuç şartlarını aramaktadır (16).

Çalışmamızda nativ-lugol boyama yöntemi ile *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapıları saptanan 29 (%5.2) dışkı örneğinin trikrom boyama ile 22'sinde (%3.9) *E.histolytica/E.dispar* kist ve/veya trofozoit yapıları tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile örneklerin 15'inde (%2.7) adezin antijeni pozitif olarak saptanmıştır. Bulgularımız bu konuda yapılan diğer çalışmaların bulgularıyla uyumlu olarak gözlenmiştir.

Rutin tanısal incelemede, mikroskopik incelemenin farklı bir yöntemle doğrulanması ve dışkı örneklerinde *E.histolytica*'nın *E.dispar*'dan ayırt edilebilmesi, olguların tedavilerinin doğru yönlendirilebilmesi ve bulaş açısından son derece önemlidir. *E.histolytica* enfeksiyonunda yanlış tanı oranı oldukça yüksektir. Patojen *E.histolytica* ile patojen olmayan *E.dispar* ayırımında *E.histolytica*'ya spesifik monoklonal ELISA adezin antijen testinin gereksiz tedavi uygulamalarının azaltılması için yapılması gerekmektedir.

SONUÇ

Yanlış tanı oranının düşürülmesine ve gereksiz tedavi uygulamalarının engellenmesine katkıda bulunmanın yanı sıra, diğer hastalıklarla amebiyazın ayırıcı tanısına yardımcı olması nedeniyle, ucuz, hızlı ve deneyimli personel gerektirmeyen, *E.histolytica* monoklonal ELISA adezin antijen testinin kullanılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- 1.Fotedar R, Stark D,Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev 2007;20: 511-32.
- 2.Tanyüksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 713-29.
- 3.Uyar Y, Taylan Ozkan A. Antigen detection methods in diagnosis ofamebiasis, giardiasis and cryptosporidiosis. Türkiye Parazitoloj Derg 2009; 33: 140-50.

21 Doğruman-AI ve ark. Entamoeba histolytica tanısı

- 4.Tuncay S, Inceboz T, Over L, Yalcin G, Usluca S, Sahin S, et al. The evaluation of the techniques used for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in stool specimens. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007; 31: 188-93.
- 5.Haque R, Petri W. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch Med Res*. 2006;37:273-6.
- 6.WHO. World Health Organization report of a consultation experts on amoebiasis. *Weekly Epidemiol Rep* 1997; 72: 97-100.
- 7.Malatyalı E, Özcelik S, Celiksoz A, Değerli S, Yildirim D. The frequency of intestinal parasites in primary school children in urban and rural regions. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2008; 32: 54-8.
- 8.Delialioğlu N, Aslan G, Ozturk C, Ozturhan H, Sen S, Emekdas G. Detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples in Mersin, Turkey. *J Parasitol* 2008; 94:530-2.
- 9.Tüzemen NÜ, Doğan N. *Entamoeba histolytica*'nın tanısında direk mikroskopi, kültür, ELISA ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bul* 2014;48 :114-22.
- 10.Tuncay S, Inceboz T, Över L ve ark. Dışkıda *Entamoeba histolytica*'nın saptanmasında kullanılan yöntemlerin birlikte değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2007; 31: 188-93.
- 11.Zeyrek FY, Özbilge H, Yüksel MF ve ark. Şanlıurfa'da parazit faunası ve ELISA yöntemi ile dışkıda *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* sıklığı. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2006; 30: 95-8.
- 12.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: 322-6.
- 13.Pereira VV, Conceicao Ada S, Maximiano LH, Belligoli Lde Q, Silva ES. Laboratory diagnosis of amebiasis in a sample of students from southeastern Brazil and a comparison of microscopy with enzyme-linked immunosorbent assay for screening of infections with *Entamoeba* sp. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47: 52-56.
- 14.Al-Braiken FA, Salem HS. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* in symptomatic children, Jeddah City, Saudi Arabia. *Egypt J Immunol* 2008; 15: 85-92.
15. Mohanty S, Sharma N, Deb M. Microscopy versus enzyme linked immunosorbent assay test for detection of *Entamoeba histolytica* infection in stool samples. *Trop Parasitol* 2014; 4: 136-8.
- 16.Sağlık Bakanlığı Bulaşıcı Hastalıklar Surveyansı ve Kontrol Esasları Yönetmeliği Resmi Gazete: 30.5.2007 - 26537.