

НАЛАЗ *IgG* АНТИТЕЛА У СЕРУМУ БОЛЕСНИКА СА СУМЊОМ НА ЦИСТИЧНУ ЕХИНОКОКОЗУ ЈЕТРЕ

Ивана В. РАДОЊИЋ, Александар М. ЏАМИЋ, Валентина С. АРСИЋ-АРСЕНИЈЕВИЋ,
Слободанка В. ЂУКИЋ, Сања М. МИТРОВИЋ

Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Цистична ехинококоза је паразитска зооноза изазвана пантљичаром *Echinococcus granulosus*. Инфекција јетре је најчешћи клинички облик ехинококозе код људи. Дијагноза ехинококозе јетре може да се утврди на неколико начина: поред добро узете анамнезе и епидемиолошког упитника, важни су клинички статус и клиничка испитивања, као што су рендгенско снимање, преглед ултразвуком, нуклеарна магнетна резонанција, компјутеризована томографија, лабораторијске анализе и испитивања серума. Данас се у дијагностиковању ехинококозе користе различити серолошки тестови: реакција везивања комплемента, имуноелектрофореза, индиректна хемаглутинација, латекс-аглутинација, индиректна флуоресценција и ензимски имунотестови, као што је *ELISA*.

Циљ рада Циљ истраживања је био да се испита присуство анти-*E. granulosus* антитела *ELISA* тестом као допунским лабораторијским методом у дијагностиковању ехинококозе код људи.

Метод рада Испитано је 212 болесника због сумње на цистичну ехинококозу јетре. Коришћен је *ELISA* тест, којим су тражена укупна анти-*E. granulosus IgG* антитела специфична за антиген Б.

Резултати анти-*E. granulosus* антитела су откривена код 26 болесника (12,26%). Код седам болесника код којих је добијен налаз о ултразвучном морфолошком типу цисте класификоване по Гарбију (*Gharbi*) откривена је висока серопозитивност. Граничне вредности теста утврђене су код 15 (7,08%) од 212 испитаника. Код три болесника с граничном вредношћу теста поновљена је анализа из новог узорка серума после 18-22 дана. Код једног болесника тест је поново показао граничну вредност, код другог је потврђена ехинококоза, док је код трећег болесника поновљени узорак показао негативну вредност. Код 171 болесника (80,66%) нису доказана антитела *ELISA* тестом.

Закључак Независно од познатих и већ прихваћених ограничења испитивања серума, резултати откривања антитела су неопходни показатељи у процени болесника за које се сумња да су оболели од цистичне ехинококозе јетре.

Кључне речи: *Echinococcus granulosus*; јетра; дијагноза; серологија

УВОД

Цистична (унилокуларна) ехинококоза је паразитска зооноза изазвана пантљичаром *Echinococcus granulosus*. Најчешћа локализација ларве овог паразита код људи је јетра. Човек се зарази уношењем јаја *E. granulosus* прљавим рукама, загађеном храном и водом или преко прљавих длака пса. Без обзира на законске прописе и примену мера превенције, ехинококоза данас представља велики проблем, како у свету, тако и код нас [1, 2].

Симптоми болести зависе од локализације хидатидне цисте. Недавна истраживања Екерта (*Eckert*) и Депласа (*Deplazes*) [3] показују да се инфекција јавља два и по пута чешће у јетри него у плућима. Постојање или изостанак компликација ехинококне болести јетре одређује специфичну симптоматологију која лекара упућује на могућу дијагнозу. Неспецифични симптоми, као што су надимање, мука, повраћање или бол у горњем делу трбуха, могу бити изазвани било којим обољењем дигестивног тракта, али увећана јетра или опипљива маса у епигастријуму захтева додатна испитивања, укључујући и серолошка, која могу да потврде ехинококозу. Неопходно је напоменути да и најмање тегобе у абдомену особа у ендемским областима захтевају детаљно испитивање на могућу ехинококну инфекцију. Алергијске реакције непознатог порекла удружене с тегобама у трбуху, иктерус са холангитисом или евентуалан налаз делића цисте у столици упућују лекара на могућу ехинококозу. Неспецифични биохемијски налази који могу да се ја-

ве код ехинококозе јетре су леукоцитоза, повишена седиментација, повишене вредности трансаминаза, а код иктеруса вредности билирубина и алкалне фосфатазе. Код 25-45% оболелих особа јавља се еозинофилија преко 8% [4].

Дијагноза ехинококозе јетре може да се утврди на неколико начина. Поред добро узете анамнезе и епидемиолошког упитника, важни су клинички статус и клиничка испитивања, као што су рендгенско снимање, преглед ултразвуком, нуклеарна магнетна резонанција, компјутеризована томографија. За потврду дијагнозе неопходно је урадити специфичне лабораторијске анализе којима се откривају специфична антитела или циркулишући антигени паразита. Пункција цисте сумњиве на инфекцију ехинококусом и паразитолошки преглед пунктата се избегавају, нарочито пре хируршког лечења, због опасности од дисеминације садржаја цисте. Данас постоје многи протоколи примене лекова различитих према дози лека, дужини лечења и његовом понављању, који би цисту ослободили инфективних протосколекса пре пункције.

ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је био да се испита присуство анти-*E. granulosus IgG* антитела *ELISA* тестом као допунским дијагностичким лабораторијским методом код болесника са клиничком сумњом на ехинококозу јетре.

МЕТОД РАДА

Од октобра 2001. до децембра 2004. године испитано је 212 болесника за које се сумњало да су оболели од ехинококозе јетре. На основу епидемиолошких података утврђено је да су болесници пореклом из различитих крајева Србије, из градске и сеоске средине. Код седам болесника је претходним клиничким испитивањем утврђен ултразвучни морфолошки тип хидатидне цисте класификоване по Гарбију (*Gharbi*). Код два болесника утврђен је морфолошки тип II, односно код пет болесника морфолошки тип IV хидатидне цисте.

У овом испитивању коришћен је *ELISA* тест, којим су тражена укупна анти-*E. granulosus* IgG антитела специфична за антиген Б (*AgB*) који је добијен из хидатидне течности *E. granulosus*. Солубилне *AgB* везане за зидове микротитрационе плоче, као и контролне серуме теста припремио је произвођач (*Dialab*, Аустрија). Присуство антитела је одређивано мерењем интензитета боје у спектрофотометру уз филтер таласне дужине од 450 nm (*Termo Electron Corporation, Multiscan Ex, USA*).

На основу позитивних и негативних контролних серума и граничних (*cut-off*) вредности теста, резултати су представљени као негативни (<0,9), позитивни (>1,1) и гранични (0,9-1,1). Код граничних вредности саветовано је понављање анализе из новог узорка серума после 2-4 недеље. Према упутству произвођача, вредност из другог, контролног, узорка серума узимана је као валидан налаз.

РЕЗУЛТАТИ

Од 212 испитиваних болесника *ELISA* тестом су анти-*E. granulosus* антитела доказана код 26 болесника (12,26%). Код седам болесника с позитивним налазом серума забележен је налаз о ултразвучном типу цисте по Гарбију. Код ове групе болесника откривена је висока серопозитивност, односно вредности теста су биле у распону од 3,2 до 5,8 (Табела 1). Код преосталих 19 болесника код којих је на основу претходних клиничких испитивања диференцијалнодијагностички разматрана и цистична ехинококоза јетре, *ELISA* тест је показао јасну серопозитивност.

Граничне вредности теста утврђене су код 15 од 212 испитаника (7,08%). Болесницима с граничним

ТАБЕЛА 1. Резултати испитивања серореактивности болесника са сумњом на цистичну ехинококозу јетре.

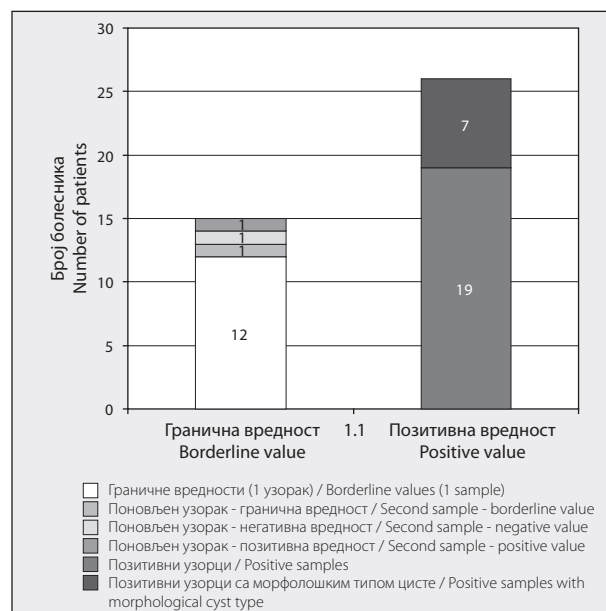
TABLE 1. Seroreactivity in patients with suspected cystic liver echinococcosis.

Резултат теста Test results	Број болесника (%) Number of patients (%)	Вредност теста Test value
Позитиван Positive	26 (12.26)	1.12-5.80
Гранична вредност Borderline	15 (7.08)	0.9-1.1
Негативан Negative	171 (80.66)	<0.9
Укупно Total	212	-

вредностима препоручен је преглед новог узорка серума, који је испитиван после 18-22 дана. Нажалост, од 15 болесника с граничним вредностима теста само код три је поновљена анализа. Код једног од њих тест је поново показао граничну вредност, код другог је потврђена ехинококоза, док је код трећег испитаника поновљени узорак показао негативну вредност (Графикон 1). Код 171 болесника (80,66%) ни су доказана анти-*E. granulosus* антитела *ELISA* тестом (Табела 1).

ДИСКУСИЈА

Данас се у дијагностиковању ехинококозе јетре користе различити серолошки тестови који имају своје предности и мане. Реакција везивања комплемента је врло прихватљив тест, чија је осетљивост 70-80%, али налази немају високу поузданост због лажно позитивних резултата [5]. Реакција везивања комплемента је значајна у надгледању болесника после операције јер брзо постаје негативна, па позитивност теста годину дана после хируршке интервенције указује на могући рецидив болести. Имуноелектрофореза је позитивна у 80-90% случајева и користи се у надгледању оперисаних болесника, а позитивност две године после операције указује на могући рецидив [5]. Индиректна хемаглутинација има осетљивост до 85%, али даје лажно позитивне резултате због могуће унакрсне реактивности са шистозомама и нематодама [6]. Латекс-аглутинација се примењује у примарној дијагностици и не даје унакрсне реакције с антигенима других паразита, међутим, није погодан тест за надзор болесника јер је позитиван дуго након операције. Индиректна имунофлуоресценција је тест који је брз и лак за извођење, његова осетљивост је 78% и погодан је за примарну дијагностику ехинококозе [5, 7, 8]. Недостатак овог теста је у томе што даје позитиван налаз две-три године после операције. Погодност



ГРАФИКОН 1. Приказ болесника с граничним и позитивним вредностима *ELISA* теста.

GRAPH 1. Patients with borderline and positive values of *ELISA* test.

ELISA теста је у томе што је лак и једноставан за извођење и што има задовољавајућу осетљивост од 80 до 90% и специфичност од 75 до 90% [9]. Међутим, постоје различите болести и стања где може да се јави унакрсна серореактивност, као што су цистицеркоза, шистозомоза, онкоцеркоза, токсоплазмоза, лајшманиоза, тенијаза, цисте и болести јетре друге етиологије, малигна обољења и хронични имуни поремећаји [9]. У литератури нема података о унакрсној серореактивности између цистичне и алвеоларне ехинококозе која је изазвана врстом *E. multilocularis*. Нека истраживања указују на то да би претходно наведени имунодијагностички тестови могли да се користе као почетне анализе после којих треба урадити неки од потврђених тестова, као што су имуноелектрофореза или имуноблот [10].

Збихи (*Sbihi*) и сарадници [11] су истраживали присуство анти-*E. granulosus* антитела *ELISA* тестом коришћењем различитих антигена. Раније поменути аутори су испитивали болеснике са хидатидозом, цистицеркозом, токсоплазмозом и лајшманиозом применом различитих антигена, као што су хомогенат протосколекса, хидатидна течност, гликопротеинска фракција из хидатидне течности и *Ag5/B* фракција из хидатидне течности. Најбољи резултати, односно најмања унакрсна реактивност добијена је коришћењем *Ag5/B* фракције из хидатидне течности. Руководећи се претходним подацима, аутори су изабрали тест у којем се као антиген користи *AgB*.

ELISA тестови у којима се користе непрерађени цистични антигени, као што је рађено и у овом истраживању, имају осетљивост 80-90%, па је за одређени проценат неоткривених инфекција одговорна осетљивост теста [12]. У овом раду су тестирани серуми болесника за које се сумњало да су оболели од ехинококозе јетре, али је 80,66% болесника било серонегативно. Разлози серонегативности могу бити многобројни. Различита испитивања показују да имуна толеранција на антигене ехинокока оставља око 30% болесника имунолошки немим, односно да се, без обзира на инфекцију, производња анти-*E. granulosus* *IgG* антитела открива код 60-80% болесника. Аутори овог рада наводе случај болеснице из 2000. године која је оперисана због ехинококне цисте јетре пречника од шест центиметара, код које у два узорка серума пре операције нису откривена анти-*E. granulosus* антитела (необјављени подаци). Узрок серонегативности може да буде и формирање имуних комплекса. Крејг (*Craig*) [13] је још 1986. године показао да циркулишући паразитски антигени могу да „заробе” антитела, која у том случају не могу да се открију *ELISA* тестом.

Роган (*Rogan*) и Крејг (*Craig*) [14] су 1997. године показали да на серореактивност која се открива *ELISA* тестом утиче ултразвучни морфолошки тип цисте класификоване по Гарбију. Постоје мишљења да ови морфолошки типови представљају напредне развојне облике хидатидне цисте, од високо вијабилне унилокуларне цисте (типови *I* и *II*) ка септираним и хетерогеним цистама (типови *III* и *IV*), односно калцификованим цистама (тип *V*). Утврђено је да се серопозитивност повећава како се циста развија и да нагло пада код типа *V*. Антиген Б, који је коришћен у овом испитивању, јесте антиген избора за откривање специ-

фичних изотипова *IgG* антитела која су јасно повезана с напредним облицима ехинококне цисте [10]. И даље се мало зна о имуним механизмима који утичу на овакав развој серореактивности, али се претпоставља да важну улогу имају *CD4+* Т лимфоцити [14].

Један проценат серума испитиваних *ELISA* тестом показује граничне вредности титра антитела [6]. Претпоставља се да се граничне вредности јављају на почетку инфекције, када је количина антитела мала, или зато што је ниво специфичних антитела променљив у зависности од локализације и развојног стадијума цисте. Ниво специфичних антитела је знатно виши када се циста налази у јетри, док цисте других локализација доводе до слабијег хуморалног имуног одговора. Код болесника код којих је утврђена гранична вредност титра антитела предлаже се понављање анализе из новог узорка серума после 2-4 недеље. Очекује се да ће за то време, ако болест постоји, титар специфичних антитела достићи ниво који може да се открије *ELISA* тестом [15].

ЗАКЉУЧАК

Дијагноза ехинококозе код људи је сложена због тога што ниједан дијагностички преглед не открива све инфициране болеснике. Независно од познатих и већ прихваћених ограничења анализа серума, резултати испитивања присуства и количине специфичних антитела су неопходни показатељи у процени болесника за које се сумња да су оболели од цистичне ехинококозе јетре. Прихваћен је став да се, ради превазилажења проблема у серодијагностици ехинококозе, користи комбинација различитих типова имунолошких тестова.

ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујемо Вељку Страјини, студенту четврте године Медицинског факултета у Београду, на техничкој помоћи у припреми рада.

ЛИТЕРАТУРА

- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartelely PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003; 362:1295-304.
- Seimenis A. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Tropica* 2003; 85:191-5.
- Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:107-35.
- Safioleas M, Misiakos E, Manti C. Diagnostic evaluation and surgical management of hydatid disease of the liver. *World J Surg* 1994; 18:859-65.
- Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid diseases. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:18-36.
- Poretti D, Felleisen E, Grimm F, et al. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:193-98.
- Milićević M. Hydatid disease. In: Blumgarth LH, editor. *Surgery of the liver and biliary tract*. Churchill Livingstone; 1994. p.1121-50.
- Kranjčić-Zec I. Uпоредно испитивање вредности RVK i indirektnog imunofluorescentnog testa u slučajevima humane ehinokokoze [magistarski rad]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 1978.

9. Shambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Tropica* 1997; 64:53-63.
10. Ortona E, Rigano R, Buttari B, et al. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Tropica* 2003; 85:165-71.
11. Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24:205-11.
12. Babba H, Messadi A, Masmoudi S, et al. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. *J Trop Med Hyg* 1994; 50:64-8.
13. Craig PS. Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme immunoassay. *Parasite Immunol* 1986; 8:171-88.
14. Rogan MT, Craig PS. Immunology of *Echinococcus granulosus* infections. *Acta Tropica* 1997; 67:7-17.
15. Schantz PM, Gottstein B. Immunodiagnosis of parasitic diseases. In: Schantz PM, editor. *Helminths Diseases*. Academic Press; 1986. p.69-107.

IgG SERUM ANTIBODY RESPONSES IN SUSPECTED LIVER CYSTIC ECHINOCOCCOSIS PATIENTS

Ivana V. RADONJIĆ, Aleksandar M. DŽAMIĆ, Valentina S. ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ, Slobodanka V. ĐUKIĆ, Sanja M. MITROVIĆ
Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade

Introduction Cystic echinococcosis is a parasitic zoonosis caused by a tapeworm *Echinococcus granulosus*. Liver infection is the most common form of human echinococcosis. Diagnosis of liver echinococcosis could be made by different methods. It is very important to have good anamnesis and epidemiological evaluation, clinical status and clinical investigations such as X-ray examination, ultrasonography, nuclear magnetic resonance, computerized tomography, laboratory analysis and serology. Different serologic tests could be used for diagnosis of echinococcosis: complement fixation test, immunoelectrophoresis, indirect haemagglutination, latex agglutination, indirect fluorescence test and enzyme immunoassays such as ELISA test.

Objective The aim of this study was to investigate anti-*E. granulosus* antibodies by ELISA test as a complementary laboratory method in the diagnosis of human echinococcosis.

Method In this study, we investigated 212 patients of suspected liver cystic echinococcosis. ELISA test was used for detection of whole anti-*E. granulosus* IgG antibodies specific for AgB.

Results Out of 212 patients, in 26 (12.26%) patients echinococcosis was confirmed by ELISA test. In 7/26 patients who had data about the ultrasonographic morphological type of cyst according to Gharbi, high values of seropositivity were

found. Borderline values were found in 15/212 (7.08%) patients. In three patients with borderline values, second sera samples were examined after 18-22 days. In one patient, the test showed the same value, in the second patient echinococcosis was confirmed while in the third, the test showed a negative value. In 171 (80.66%) patients, anti-*Echinococcus* antibodies were not found by ELISA test.

Conclusion It has already been known that serological investigation has some limitations, but detection of specific antibodies remains an indispensable mark in evaluation of suspected liver cystic echinococcosis patients.

Key words: *Echinococcus granulosus*; liver; diagnosis; serology

Ivana V. RADONJIĆ
Laboratorija za parazitologiju
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Tel/faks: 011 268 5584
E-mail: medparbg@eunet.yu