

Radyolojik olarak aktif hidatik kisti olan olgulardan perkütan aspire edilen kist sıvılarında protoskoleks varlığı ile pcr sonuçları arasındaki korelasyonun araştırılması\*

Investigation of correlation between the protoscolex existence and pcr results in aspirated cyst contents from patients with radiologically diagnosed active hydatid cysts\*

Serra Örsten<sup>1</sup>, Emre Ünal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Ankara

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Serra Örsten orcid.org/ 0000-0002-9216-5413

Emre Ünal orcid.org/ 0000-0002-1520-2487

## Öz

**Amaç:** Kistik Ekinokokkozis, Echinococcus cinsi parazitlerin larva formunun insanlarda neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Tanı temelde invaziv olmayan görüntüleme tekniklerine dayanmaktadır. Tedavide görüntüleme eşliğinde yapılan perkütan girişimler büyük öneme sahiptir. Tedavi sırasında elde edilen kist içeriğine yapılan protoskoleks incelemesi tanının doğrulanmasında kullanılmaktadır. Ancak, negatif sonuç alınması tanıyı dışlamamaktadır. Bunun yanı sıra, moleküler yöntemler de kullanılmakta ancak her zaman saptanabilir DNA elde edilememektedir. Bu çalışmada, perkütan aspire edilmiş kist sıvılarında protoskoleks varlığı ile PCR sonuçları arasındaki korelasyonun araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya, görüntüleme yöntemleri ile aktif hastalık tanısı almış ve perkütan girişim sırasında, diğer bir canlılık bulgusu olan, kaya suyu barındırdığı saptanan kistler dahil edilmiştir. Toplamda aspire edilen 71 hidatik kist sıvısı protoskoleks varlığı açısından incelenmiş, sonrasında ise mitokondriyal bir gen olan sitokrom oksidaz 1'i hedefleyen PCR gerçekleştirilmiştir. PCR sonucu pozitif olan tüm örnekler dizi analizi ile doğrulanmıştır.

**Bulgular:** Protoskoleks incelemesine göre, 71 kist örneğinin, 32 (%45) tanesinin pozitif, 39 tanesinin negatif olduğu saptanmıştır. Yapılan PCR sonucu örneklerin 54 (%76) tanesinde pozitif, 17 tanesinde negatif sonuç izlenmiştir. İki inceleme karşılaştırıldığında, protoskoleks varlığı ile pozitif PCR sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p < 0.05$ , Ki-Kare testi).

**Sonuç:** Bu çalışma sonucunda, aktif hidatik kist varlığının tanınmasında PCR analizinin protoskoleks incelemesine göre daha yüksek doğruluk oranına sahip olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, protoskoleks varlığının pozitif PCR sonucu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır. Ancak protoskoleks negatif olan olgularda izlenen PCR pozitifliği, mikroskopik olarak negatif bulunan örneklerin moleküler yöntemlerle de parazit DNA'sı açısından incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hidatik kist, tanısal görüntüleme, girişimsel radyoloji, echinococcus granulosus, pcr

## Abstract

**Objective:** Cystic Echinococcosis is a zoonotic disease caused by larval form of Echinococcus parasites in humans. The diagnosis is primarily made by imaging. Percutaneous interventions have a significant role in treatment. Protoscolex examination of the cyst content aspirated during treatment, could be performed to confirm microbiological diagnosis, however negative results do not exclude the disease. Molecular methods could be used for the diagnosis, however DNA is not always detectable. The aim of this study was to investigate the correlation between the protoscolex existence and PCR results in percutaneously aspirated cyst contents.

**Material and Methods:** The study consisted of radiologically diagnosed active hydatid cysts containing rock water (sign of disease activity) found during percutaneous treatment. A total of 71 hydatid cysts were examined for protoscolex existence, thereafter a PCR protocol which is targeting cytochrome oxidase 1 gene was performed. All positive amplicons were characterized by sequencing.

**Results:** According to examination of protoscolex existence, of the 71 cyst specimens, 32 (45%) were positive and 39 were negative. In PCR study, 54 (76%) samples were positive and 17 samples were negative. There was a statistically significant correlation between the presence of protoscolex and PCR positivity ( $p < 0.05$ , Chi square test).

**Conclusion:** This study demonstrated that PCR analysis had a higher accuracy rate for the diagnosis of active hydatid disease. Nevertheless, there was a statistically significant correlation between the protoscolex existence and PCR positivity. However, PCR positivity found in samples with lack of protoscolex pointed out the necessity of molecular studies in case of negative microscopic examination.

**Key words:** Hydatid cyst, diagnostic imaging, interventional radiology, echinococcus granulosus, pcr

## Giriş

Kistik Ekinokokkozis (KE) veya Kist Hidatik, Echinococcus granulosus sensu lato s.l. adlı parazitin larva formunun neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur. KE dünya genelinde en yaygın zoonotik enfeksiyonlardan biri olup, özellikle kırsal kesimlerde besi hayvanları ve köpeklerle yakın temasta olan kişilerde görülmektedir. Echinococcus cinsinin yaşam döngüsü temel olarak köpekgiller ve otobur hayvanlar arasında devam etmekte, insan bu döngüde rastlantısal olarak yer almaktadır. Morfolojik özellikler, konak özgülüğü ve coğrafi dağılım gibi özellikler açısından incelendiğinde E.granulosus s.l. türü içerisinde, azımsanmayacak ölçüde genetik varyant olduğu gösterilmiştir (1,2). Buna göre; E. granulosus s.l. türü kompleksi içerisinde Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s) (genotipler G1-G3), Echinococcus felidis, Echinococcus equinus (G4), Echinococcus ortleppi (G5) ve Echinococcus canadensis (G6/G7, G8, G10) yer almaktadır (1-4). Coğrafi dağılım olarak incelendiğinde KE, Avustralya, Asya, Güney Amerika ve Akdeniz ülkelerinin özellikle kırsal alanlarında endemik bir enfeksiyon olup, hala önemli bir halk sağlığı problemidir (5). Ülkemizde de KE, en önemli helmintik enfeksiyonların başında yer almakta ve eski çağlardan bu yana varlığını sürdürmektedir (6). Enfeksiyon asemptomatik başlayıp, sonrasında yavaş büyüyen kistler ile kendini göstermektedir. KE için klinik semptomlar çeşitlilik göstermekle birlikte patognomonik olmayıp, yıllarca sessiz kalabilmektedir (7). E.granulosus s.l.'un etken olduğu kistlerin farklı ultrasonografi (US) görünümleri temel alınarak, Dünya Sağlık Örgütü'nün Ekinokokkozis çalışma grubu (WHO-IWGE), karaciğer hidatik kisti için hastalığın aktivitesini baz alan bir sınıflama yayınlamıştır (8,9). Bu sınıflandırmaya göre; kistik lezyon (CL), tip 1 (CE1), tip 2 (CE2), tip 3A ve tip 3B (CE3a-CE3b), tip 4 (CE4), tip5 (CE5) şeklinde kategorize edilmiştir.

KE tanısı temelde ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (BT), röntgen ve manyetik rezonans (MR) gibi invaziv olmayan görüntüleme tekniklerine dayanmakta olup, karakteristik olmayan görüntüleme bulgularının varoldu-

ğu olguların tanısında serolojik testler kullanılmaktadır. Tanının doğrulanması amacıyla, görüntüleme eşliğinde perkütan tedavi sonrası elde edilmiş hidatik kist sıvısında karakteristik protoskoleks incelemesi ışık mikroskobu ile yapılmakta ancak steril kistlerin varlığında tanı mikrobiyolojik olarak doğrulanamamaktadır (8). Bunun yanı sıra günümüzde moleküler yöntemler, elde edilmiş kist materyalinde tanıyı doğrulama, tür ve suş düzeyinde ayırım yapılabilmesini sağlamakta olup, yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla sıklıkla mitokondriyal genler olan sitokrom oksidaz 1 (cox1) ve nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz alt ünite 1 (nad1) genlerinin kısmi dizileri hedeflenmektedir. Ancak PCR yaklaşımları kist canlılığını değerlendirememekte ve negatif PCR sonucu hastalığı ekarte edememektedir (8). Yapılan çalışmalarda, PCR sonuçlarının değişken olması mikrobiyolojik açıdan karmaşa yaratmaktadır (10). Bu çalışmadaki amaç, radyolojik olarak aktif hidatik kisti olan olgulardan, perkütan aspire edilmiş kist sıvılarında protoskoleks varlığı ile PCR sonuçları arasında bir korelasyon olup, olmadığının araştırılmasıdır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma kapsamına, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Non Vasküler Girişimsel Radyoloji bölümünde aktif KE tanısı konan ve perkütan tedavisi yapılan 71 hastanın (71 kist) hidatik kist örneği dahil edildi. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 2019/20-17 sayılı karar ile etik açıdan uygun bulundu.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar USG tetkiki ile değerlendirildi ve kistlerin tipleri, lokalizasyonları ve boyutları tespit edildi. Kist tiplerinin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü'nün karaciğer hidatik kisti için hastalığın aktivitesini baz aldığı sınıflama kullanıldı (8).

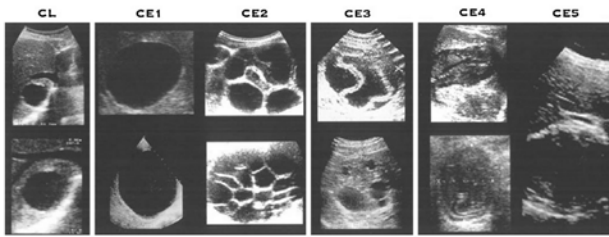
Aspire edilmiş kist sıvısından 2mL alınarak yeni bir tüpe aktarıldı, 3 dakika 3000 g'de santrifüj edildikten sonra çökelti protoskoleks varlığı açısından ışık mikroskobu ile incelendi. Mikroskopik incelemenin ardından kist sı-

*Radyolojik olarak aktif hidatik kisti olan olgulardan perkütan aspire edilen kist sıvılarında protoskoleks varlığı ile pcr sonuçları arasındaki korelasyonun araştırılması - Örsten S. ve Ünal E.*

vıları moleküler testler çalışılncaya kadar -80 °C'de saklandı. Hidatik kist sıvısından DNA ekstraksiyon işlemi, ticari bir kit olan "GeneJet Genomic DNA Purification Kit" (Thermo Fisher®, ABD) ile üretici firma talimatları doğrultusunda yapıldı. Elde edilen DNA'lara, cox 1 genini hedefleyen PCR protokolü uygulandı. Bu amaçla kullanılan primer dizileri F: 5' - TTG AAT TTG CCA CGT TTG AAT GC - 3' ve R: 5' GAA CCT AAC GAC ATA ACA TAA TGA 3' şeklindedir (11). PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntüledi ve ~828bp'lik bantlar pozitif olarak kabul edildi. Pozitif ürünler dizi analizine alındı, ardından BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) algoritması yoluyla tanımlandı. Elde edilen veriler, SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile Ki-Kare testi kullanılarak test edildi ve p≤ 0.05 istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## Bulgular

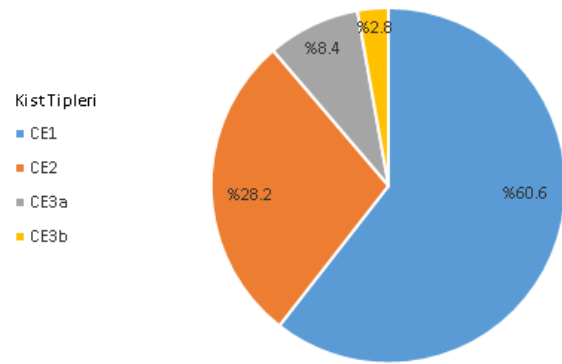
Çalışmaya 71 hastada tespit edilmiş olan 71 kist dahil edildi. Kistlerin tiplerine göre dağılımı şu şekilde idi: 43 (%60.6) CE1, 20 (%28.2) CE2, 6 (%8.4) CE3a ve 2 (%2.8) CE3b (Şekil 1). Bu kistlerden 55 (%77.5)'i karaciğer sağ lob, 9 (%12.7)' u karaciğer sol lob, 2 (%2.8)' si böbrek, 2 (%2.8)' si kas içi, 1 (%1.4)' i dalak, 1 (%1.4)' i mezenter ve 1 (%1.4)' i de intraperitoneal yerleşimli idi. Kist boyutları 14 (%19.7) tanesi 5 cm'den küçük, 41 (%57.8) tanesi 5-10 cm aralığında ve 16 (%22.5) tanesi 10 cm'den büyük olarak tespit edildi.



Protoskoleks varlığı açısından incelenen 71 kist örneğinin, 32 (%45) tanesinin pozitif, 39 (%55) tanesinin negatif olduğu saptandı. Yapılan cox1 hedefli PCR sonucu örneklerin 54 tanesinde pozitif, 17 tanesinde negatif sonuç izlendi (Tablo 1). PCR pozitif olan tüm örnekler dizi analizi sonucu BLAST algoritmasıyla E. granulosus s.l. olduğu doğru-

landı. Protoskoleks açısından pozitif olan 32 örnekten 29 tanesi PCR pozitif sonuç verdi, 3 tanesinin PCR sonucu negatif olarak saptandı. Protoskoleks negatif olan 39 örneğin 25'i (%64.1) PCR testinde pozitif sonuç verdi, 14 tanesi PCR'da da negatif olarak izlendi. Protoskoleks varlığı ile pozitif PCR sonucu arasındaki ilişki araştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05).

**Şekil 1.** Çalışmaya dâhil edilen kist örneklerin kist tiplerine göre yüzde dağılımı.



**Tablo 1.** Protoskoleks varlığı ve PCR sonuçlarının dağılımı.

	PCR Sonucu		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Protoskoleks Varlığı	29	3	32
	25	14	39
Toplam	54	17	71

## Tartışma ve Sonuç

KE, kozmopolitan yayılım gösteren bir zoonoz olup, günümüzde halk sağlığı problemi yaratmaya devam etmekte ve dünya çapında yaklaşık 1.5 milyon kişiyi etkilemektedir. Bulaş sonrası hidatik kistin büyüme oranı net bilinmemekte olup, gelişme hızı yılda yaklaşık 1 cm olarak belirtilmektedir (12). Ayrıca kistler genellikle 5 cm çapa ulaşınca kadar belirti göstermemekte, bu nedenle hastaların %40-60'ı herhangi bir şikayeti olmadan yaşamlarını devam ettirmektedir (13-15). Literatürde özellikle

uniloküler kistlerin uzun süre asemptomatik kalabildikleri (16,17) bilgisi mevcut olup, çalışmamıza dahil edilen olguların da çoğunluğunun kist büyüklüğünün 5 cm'in üzerinde kaydedildiği ve uzun süre asemptomatik kaldıklarına dair hipotezi destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Kist tiplerine göre dağılım incelendiğinde, çoğunluğun CE1 (%60.6) kist tipi olduğu görülmüş ve bunu, CE2 (%28.2), CE3a (%8.4) ve CE3b (%2.8) takip etmiştir. Olgularımızın çoğunluğunun CE1 veya CE2 kist tipine sahip olmaları, WHO-IWGE önerisine göre inaktif olarak sınıflandırılan CE4 ve CE5 tiplerinde tedavisiz izlem stratejisi uygulamasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Literatürde, hidatik kistlerin organlara göre dağılım yüzdeleri karaciğerde %58, akciğerde %27, diğer organlarda ise %15 olarak bildirilmiştir (18). Çalışmamızda incelenen kistlerin organ tutulumları da literatürle uyumlu olup, en sık karaciğer sağ lobda (%77.5) yerleşim gösterdiği saptanmış, bunu karaciğer sol lob (%12.7) takip etmiştir.

Hidatik kistlerde, protoskoleks gelişimi için gerekli minimum süre bilinmemekle birlikte, yapılan hayvan temelli çalışmalar sonucu enfeksiyondan sonra 10 ay ve üzeri bir süre gerektiği düşünülmektedir (12). Yapılan çalışmalar, kist sıvısında protoskoleks görülme oranının, %31-34 olduğunu ve incelenen materyalin miktarı ve saklama koşullarının mikroskopik incelemeyi etkileyebileceğini belirtmiştir (19,20). Protoskoleks görülme oranı literatürde %50'in altında saptanmış olmasına karşın, yapılan bir çalışmada insanlarda karaciğer yerleşimli kistlerde fertilité oranı %57,1 ve görülen protoskolekslerin canlılık oranı %42 olarak bildirilmiştir (21). Ayrıca aynı hastada hem fertil (protoskoleks pozitif) hem de steril (protoskoleks negatif) kistler görülebileceği belirtilmiştir (12). Bizim çalışmamızda, insan kaynaklı hidatik kist sıvısında yapılan inceleme sonucu, protoskoleks görülme oranı %45.1 olarak saptanmıştır.

Tanıda özellikle steril kistlerde kullanılabilir daha ileri teknikler olarak, sıvıdaki spesifik E. granulosus antijenlerinin araştırılması ve kist sıvısı ve/veya parazit dokusundaki DNA'nın gösterilmesi (ör; PCR) sayılmaktadır (7). Bu çalışmada, ışık mikroskopisiyle protoskoleks görülmeyen 39 örnekten 25'i (%64.1) PCR pozitif olarak izlenmiştir. Bu sonuç, ışık mikroskopisiyle negatif bulunan örnekler moleküler yöntemler ile de bakılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Protoskoleks pozitif olarak izlenen yalnızca 3 örnek PCR negatif olarak sonuç vermiştir. Bu da

ekstraksiyon yönteminin varolan parazit DNA'sının miktarında azalmaya sebep olabileceği veya uzayan saklama koşulları nedeniyle DNA degradasyonu yaşanmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (10,22).

Sonuç olarak, radyolojik tanının mikrobiyolojik olarak doğrulanması doğru epidemiyolojik bilgi açısından kritik önem taşımaktadır. Ayrıca E.granulosus s.l.'nin çeşitlilik araştırmalarında PCR metodu yaygın olarak kullanılmakta ancak bazı durumlarda tüm örneklerde DNA izolasyonu gerçekleştirilememektedir. Bu çalışma sonucunda, en yaygın kullanılan mikrobiyolojik yöntem olan ışık mikroskopisiyle protoskoleks varlığının pozitif bulunmasının PCR sonucunun pozitif olma ihtimalini yükselttiğini göstermiştir. Ancak protoskoleks negatif izlenen örneklerde de PCR pozitifliğinin yüksek olması mikroskopik olarak negatif bulunan örneklerin moleküler yöntemlerle de parazit DNA'sı açısından incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

## Kaynaklar

1. Romig, T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of Echinococcus granulosus sensu lato. Vet Parasitol 2015; 213: 76-84.
2. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. Exp. Parasitol. 2008; 119: 439-46.
3. Nakao M, McManus DP, Schantz, PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes", Parasitology 2007; 134: 713-22.
4. Hüttner M, Nakao M, Wassermann T et al. Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. Int J Parasitol 2008; 39: 861-8.
5. Tünger O. Dünyada Kistik Ekinokokkoz Epidemiyolojisi. Türkiye Parazit Derg 2013; 37: 47-52.
6. Altıntaş N. Past to present: echinococcosis in Turkey. Acta Trop 2003; 85: 105-12.
7. Pawłowski ZS, Eckert J, Vuitton DA et al. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. WHO/OIE Manuel on Echinococcosis in humans and animals. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE) and World Health Organization (WHO) 2001; 21-69.
8. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Trop 2010; 114: 1-16.
9. Sever A, Elmas A. Echinococcosis'de görüntüleme yöntemleri. Echinococcosis. İzmir: Hidatidoloji Derneği Yayınları 2004; 203-18.

10. Mansoor Jadaan Ali Alkhaled. Molecular detection of Hydatid cyst isolated from Goats in AL-Qadisiya province by Polymerase Chain Reaction. Kufa J Vet Sci 2015; 6: 191-5.
11. Nakao M, Sako Y, Yokoyama N, Fukunaga M, Ito A. Mitochondrial genetic code in cestodes. Mol Biochem Parasitol 2000; 111: 415-24.
12. Agudelo Higuaita NI, Brunetti E, McCloskey. Cystic Echinococcosis. J Clin Microbiol 2016; 54: 518-23.
13. Karaman Ü, Daldal N, Atambay M, Aycan Ö. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1999-2002 tarihleri arasında incelenen hidatik kist ön tanılı olguların serolojik sonuçları. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 233-5.
14. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 107-35.
15. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. Int J Infect Dis 2009; 13: 125-33.
16. Canda MS, Canda T. Ekinokokkozis: 47 Olgunun Sunumu ve Türkiye'nin Ekinokokkozis Sorunu. T Parazit Derg 1995; 19: 64-82.
17. Beyrouti MI, Beyrouti R, Abes I et al. Acute rupture of hydatid cysts in the peritoneum: 17 cases. Presse Med 2004; 33: 378-84.
18. Reyhan G. Tek ve Çoğul Tutulumlu Akciğer Kist Hidatik Olgularında Morbiditeyi Etkileyen Faktörler. Uzmanlık Tezi. T.C. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne, 2010.
19. Hasanoglu A, Bülbüloğlu E, Baysal T, Sahin M, Ertas E. A huge hydatid Cyst of Liver: A case report. Ann Med Res 1996; 3: 127-9.
20. Miman Ö. Kistik Ekinokokkozis Olgularının İrdelenmesi ve Histopatolojik İncelemede Nekrozun Tanısal Önemi. Doktora Tezi. T.C. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2007.
21. Manterola C, Vial M, Melo A, Oberg C, Fonseca F. Viability and fertility of humanhepatic hydatid cysts. World J Surg 2006; 30: 227-32.
22. Furrows SJ, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. J Clin Pathol 2004; 57: 1264-6.