

Kistik Hidatik Şüpheli Hastaların Tanısında ELISA ve İmmunokromatografik Yöntemin Karşılaştırılması

The Comparison of Immunochromatographic and ELISA Methods on the Diagnosis of Cystic Hydatid-Suspected Patients

Ahmet YILMAZ¹, Murat KARAMEŞE², Önder AKKAŞ³, Hakan USLU⁴

¹Erzurum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Erzurum

²Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kars

³Iğdır Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Iğdır

⁴Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Erzurum

Özet

Kistik ekinokokkozis (KE), *E. granulosus* larvalarının etken olduğu, dünyada ve ülkemizde görülen önemli, zoonotik bir parazit enfeksiyonudur. Parazit karaciğer ve akciğer başta olmak üzere insanda pek çok organa yerleşebilmektedir. Tanıda ve tedavi sonrası takipte özellikle görüntüleme yöntemleri ve klinik bulguların yetersiz olduğu vakalarda seroloji oldukça değerlidir. Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına Kistik Hidatik şüpheli hastalardan gönderilen serum örneklerinde anti-*Echinococcus* IgG antikorlarının ELISA ve İmmunokromatografik yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına farklı kliniklerden gönderilen Kistik Hidatik şüpheli 120 hastaya ait kan örnekleri çalışma kapsamına alındı. Hastalara ait serum örneklerinde anti-*Echinococcus* IgG antikorlarının araştırılması için ELISA yöntemi ile İmmunokromatografik yöntem kit üretici firmaların tavsiye ve önerilerine uyularak yapıldı. Çalışma yaptığımız 120 hastanın 32'si (%26.6) her iki yöntemden en az biriyle pozitif bulundu. Hasta örneklerinin 88'i her iki yöntemle negatif iken 25 örnek iki yöntem ile de pozitif bulundu. ELISA yöntemi ile pozitif bulunan 4 örnek İmmunokromatografik yöntemle negatif idi. İmmunokromatografik yöntemle pozitif olarak değerlendirilen 3 örnek ELISA yöntemiyle negatif bulundu. ELISA yöntemi sonuçları baz alınarak İmmunokromatografik yöntemin duyarlılığı %86.2, özgüllüğü %96.7 ve doğruluk derecesi %94.2 olarak hesaplandı. İmmunokromatografik yöntem test sonuçları ile ELISA yöntem test sonuçları birbirine uyumlu bulunmuştur. İmmunokromatografik yöntem çalışma kolaylığı sağlaması, hızlı sonuç vermesi ve düşük maliyeti nedeniyle diğer serolojik yöntemlerle kombine bir şekilde kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: *Echinococcus granulosus*, ELISA, İmmunokromatografik, Kistik hidatik

Abstract

Cystic Echinococcosis (CE), which is caused by *E. granulosus* larvae, is one of the most important zoonotic parasitic infections in our country and all over the world. The parasite can settle in many human organs especially liver and lung. Serology is a valuable method when the clinical symptoms and screening methods are insufficient after the treatment. In this study, our aim was to investigate the anti-*Echinococcus* IgG antibodies by ELISA and Immunochromatographic methods in serum samples of cystic hydatid-suspected patients. A total 120 blood samples of cystic hydatid-suspected patients, which were sent to Atatürk University, Faculty of Medicine, Medical Microbiology Laboratory from various clinics, were involved in this study. Anti-*Echinococcus* IgG antibodies were investigated by ELISA and Immunochromatographic methods in serum samples of the patients by following the manufacturers' advice and suggestions. Total 32 (26.6%) patients in 120 was found as positive with at least one of the two methods. 88 of patients' samples were found as negative, whereas 25 of total patients' samples were positive with both two methods. Four samples, which were positive by ELISA, were detected negative with Immunochromatographic method. The sensitivity, specificity and degree of accuracy of Immunochromatographic method were 86.2%, 96.7% and 94.2% respectively based on the results of ELISA method. As a conclusion, it was found that the test results from ELISA and Immunochromatographic methods were compatible. Immunochromatographic methods may be used in combination with other serological methods owing to its quick result, low-cost and ease of operation options.

Keywords: Cystic hydatid, *Echinococcus granulosus*, ELISA, Immunochromatographic

Başvuru Tarihi / Received: 14.12.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 28.04.2016

Giriş

Kistik ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*) larvalarının etken olduğu, dünyada ve ülkemizde görülen önemli, zoonotik bir parazit enfeksiyonudur(1,2). Günümüze kadar *Echinococcus* cinsine ait altı tür tanımlanmış olup, *E. granulosus* ve *E. multilocularis* (alveolar ekinokokkoz etkeni)

insanlarda hastalık yapan iki önemli türdür (3,4). Bütün türler için, kesin konaklar etobur hayvanlar olup ara konaklar ise parazitin larvasının yerleştiği memelilerdir. İnsanlar, ara konak olmayıp tesadüfi konak olarak değerlendirilir (5,6). Kistik Hidatik (KH), insanda karaciğer (%50-70) başta olmak üzere, akciğer (%20-30), beyin, kalp ve kemik gibi organlara da (%10) yerleşim gösterebilmektedir. Serebral KH, oldukça nadir olup vakaların (%0.9-4)'ünü oluşturmaktadır⁷. Günümüzde yaygın olarak KE tanısının radyolojik tanı yöntemleriyle yapıldığı bilinmektedir. Ancak, ön tanının serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesinin önemli olduğu da bildirilmektedir (8,9). Tedavi sonrası hastaların takiplerinde ise radyolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı, özellikle serolojik tanı yöntemleriyle

Adres / Correspondence : Murat KARAMEŞE
Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kars
e-posta / e-mail : murat_karameşe@hotmail.com

hastaların takibinin önemli olduğu ifade edilmektedir (1,8). KE tanısında genellikle Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blot, İndirekt Hemaglutinasyon Assay (IHA) ve İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) gibi serolojik yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1,9,10).

Çalışmamızda, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına Kist Hidatik şüpheli hastalardan gönderilen serum örneklerinde anti- *Echinococcus* IgG antikorlarının ELISA ve İmmunokromatografik (ICT) yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına Ocak-Nisan 2015 tarihleri arasında farklı kliniklerden gönderilen Kist Hidatik şüpheli 120 hastaya ait kan örnekleri çalışma kapsamına alındı. Aynı hastalara ait birden fazla kan örneği laboratuvarımıza ulaştığında bu örneklerden sadece bir tanesi çalışmamıza dâhil edildi. Kan numunelerinden elde edilen serum örnekleri, çalışma yapılacak ana kadar -20 C°'de bekletildi. Çalışma öncesi oda sıcaklığına getirilen serum örneklerinde anti-*Echinococcus* IgG antikorlarının araştırılması amacıyla ELISA yöntemi (NovaLisa *Echinococcus* IgG-ELISA, NovaTec, Germany) ve İmmunokromatografik yöntem (*E.granulosus*'un 5/B antijenini içeren kit) (Virapid Hydatidosis, Vircell Microbiologists, Spain), kullanılarak üretici firmaların tavsiye ve

önerilerine uyularak çalışma yapıldı. ELISA yönteminde cut-off değeri 0.53 olup, cut-off değerinden küçük sonuçlar negatif, cut-off değerinden büyük sonuçlar pozitif kabul edildi. İmmunokromatografik yöntemde ise antijen test kartında yalnız kontrol bandının oluşması negatif, kontrol bandının yanında ikinci bir bandın oluşması durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirildi.

Sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir. İstatiksel analizde SPSS 17.0 (IBM, New York, ABD) programı kullanılarak McNemar ve Kappa analizleri yapılmıştır.

Bulgular

Çalışma kapsamında yer alan, yaşları 0 ile 80 arasında değişen, 120 hastanın 71'i (%59.2) kadın ve 49'u (%40.8) erkek idi. Bu hastaların 28 tanesi (%23.3) 0-14 yaş grubunda, 83 tanesi (%69.2) 15-65 yaş grubunda, 9'u da (%7.5) 65 yaş ve üzeri grupta yer almaktaydı. Çalışma yaptığımız 120 hastanın 32'si (%26.6) her iki yöntemden en az biriyle pozitif bulundu. Çalışma grubunda yer alan hasta sonuçlarına göre; 120 hastanın 25'i (%20.8) her iki yöntem ile pozitif, 88 hasta örneği (%73.3) ise iki yöntemle birden negatif bulundu. İki yöntem ile de pozitif bulunan olguların 14'ü (%11.7) kadın, 11'i (%9.2) erkek idi. ELISA yöntemi ile pozitif bulunan 4 örnek İmmunokromatografik yöntemle negatif olarak tespit edildi. İmmunokromatografik yöntemle pozitif olarak değerlendirilen 3 örnek ise ELISA yöntemiyle negatif bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. Sonuçların Yöntemlere göre, yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı

Test/Sonuç	Pozitif(+)/Negatif(-) Sayı	0-14	15-65	≥65	Kadın	Erkek
		Yaş	Yaş	Yaş üstü	Sayı	Sayı
ICT*(+), ELISA(+)	25	4	20	1	14	11
ICT(-), ELISA (-)	88	23	58	7	54	34
ICT(-), ELISA (+)	4	2	2	-	-	4
ICT (+) ELISA (-)	3	-	3	-	3	-
Toplam	120	29	83	9	71	49

* İmmunokromatografik

İmmunokromatografik yöntemle test edilen serum örnekleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Negatif serum örneklerinde, yalnız kontrol çizgisinde reaksiyon oluşurken (Şekil 1 B), pozitif serum örneklerinde ise kontrol çizgisinin yanında ikinci bir çizgide de reaksiyon oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 1 A). ELISA yöntemi sonuçları baz alınarak İmmunokromatografik yöntemin duyarlılığı %86.2, özgüllüğü %96.7 ve doğruluk derecesi %94.2 olarak hesaplandı (Tablo 2).

Tartışma

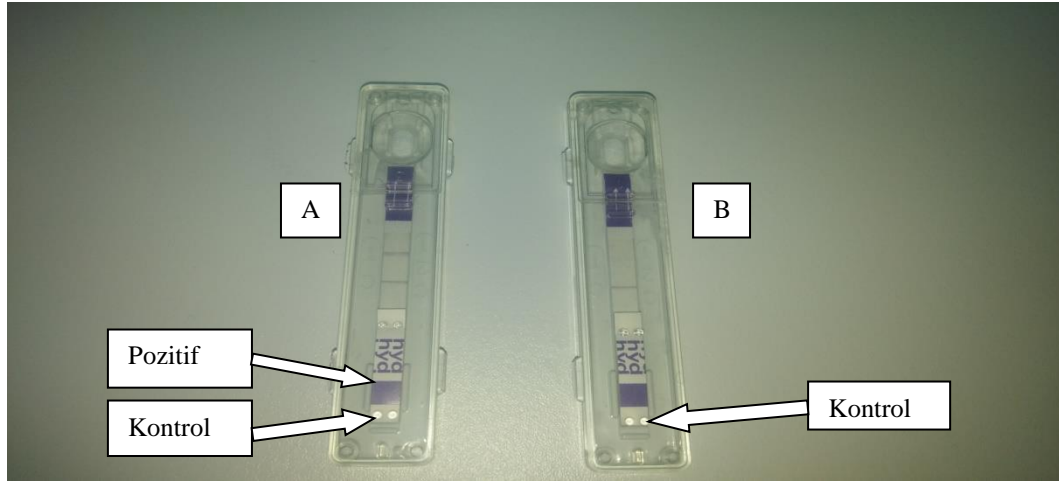
Dünyada oldukça yaygın bir şekilde *E.granulosus*'un neden olduğu KE görülmekte, ülkemizde ise, veteriner kontrolünde olmayan sokak köpeklerinin fazlalığı ve gerekli önlemlerin

alınmaması sonucu oldukça sık rastlanmaktadır (11,12). Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre 1987-1994 yılları arasında Türkiye'de operasyonla doğrulanmış 21303 KE'li hastanın bulunduğu, her yıl 2000-2500 civarında yeni vakanın eklendiği bildirilmektedir (13).

Dünyada, yeni antijenlerin ve metotların kullanılması ile tanı testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü artmıştır. KE'nin tanısı için çok sayıda serolojik test geliştirilmiştir (14-17). Ülkemizde KE üzerine yapılan çalışmalar, son 40 yılda ivme kazanmıştır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde IHA, ELISA ve IFAT yöntemlerinden yararlanılarak gerçekleştirilen araştırmalarda KE seropozitifliğinin %2.7 ile %54.1 arasında değişen oranlarda bulunmuştur (7,18-20). Yapmış olduğumuz bu

araştırmada da 120 hastanın 32'sinde (%26.6) iki

yöntemin herhangi birisiyle pozitiflik bulunmuştur.



Şekil 1: Pozitif ve negatif hasta serumlarına ait iki İmmunkromatografik test sonucu. **A:** Pozitif hasta serumu, **B:** Negatif hasta serumu

Hastalığın erken tanısında ve aynı zamanda uygulanan tedavinin takibinde serolojik test sonuçları oldukça önemlidir. Serolojik yöntemlerle görüntüleme yöntemlerinin kombine kullanılması, tanıda hassasiyeti artırmaktadır (21,22). Şöyle ki, İtalya da Di Palma ve ark.'nın 1991 de yaptıkları çalışmada 120 KE'li hastanın %61'inde bilgisayarlı tomografi (BT) ile doğru tanı koyabildiklerini, bu oranın seroloji ile kombine edildiğinde %94'e

ulaştığını bildirilmiştir (23,24). Tanıda kullanılan serolojik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğü kullanılan yöntemle, testte kullanılan antijenin özelliğine ve hastanın immün yanıtına göre değişkenlik gösterebilmektedir (25,26). Force ve arkadaşları 131 hastada KE'nin pre-operatif tanısı için 8 farklı test kullanmış, en duyarlı (%94) ve en özgül (%99) testin IgG ELISA olduğunu bildirmişlerdir (27).

Tablo 2. ELISA sonuçları baz alınarak ELISA sonuçları ile İmmunkromatografik yöntem sonuçlarını karşılaştırılması.

Test edilen	ELISA Pozitif (+)	ELISA Negatif (-)	Toplam
ICT pozitif	25	3	28
ICT negatif	4	88	92
Toplam	29	91	120

McNemar P=1.00

Sako ve arkadaşlarının Japonya'da 50 AE'li, 24 KE'li ve 20 sağlıklı insandan elde edilen serum örnekleri üzerinde yürüttükleri çalışmada ICT yönteminin duyarlılığını %94, özgüllüğünü %95.4 olarak bulmuşlardır (28). Çin'de yapılan bir çalışmada Wang ve arkadaşlarının 195 KE'li hasta serumlarında ICT ve ELISA yöntemiyle yapılan çalışma sonucunda ICT yönteminin duyarlılığı %91 özgüllüğü ise %96.9 olarak bulundu ve test sonuçları arasında önemli bir fark olmadığını tespit edilmiştir (29). Tamer ve arkadaşlarının toplam 190 serum örneğinde yaptığı ICT yöntemin ELISA yöntemiyle karşılaştırıldığı farklı bir çalışmada ise ICT'nin duyarlılığı %96.8, özgüllüğü %87.5 bulunmuştur (30). Buna ilaveten, aynı marka kitler ile ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada (7) anti-*Echinococcus* IgG seropozitifliği mevcut çalışmadan elde edilen yüzdeye yakın olarak tespit edilmiştir (%35.5).

Bizim yaptığımız çalışmada ELISA yöntemi sonuçları baz alınarak, İmmunkromatografik

yöntemin duyarlılığı %86.2, özgüllüğü ise %96.7 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar, daha önce yapılan çalışma sonuçlarıyla benzerlik arz etmektedir. Çalışmamızda iki test (ELISA /İmmunokromatografik) sonucu McNemar testi kullanılarak karşılaştırılmış ve p=1.00 bulunmuştur. Sonuç olarak iki tanı testi sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Yine kappa denetlemesinde elde edilen katsayı ($\kappa=0.839$), iki test arasında yüksek oranda bir uyumun olduğunu göstermektedir. Kappa değeri 0.81 ile 1.00 arasında olması, "neredeyse mükemmel uyuma olması" anlamına gelmektedir. Çalışmamızdan elde edilen kapa değeride ELISA ve ICT metodları arasındaki uyumun derecesini göstermektedir.

Sonuç olarak, immunokromatografik yöntem test sonuçları ile ELISA yöntem test sonuçları birbirine yüksek oranda uyumlu bulunmuştur. İmmunokromatografik yöntemin yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması kolay kullanımının olması, maliyetinin düşük olması ve hızlı sonuç

vermesi gibi avantajları nedeniyle özellikle ekinokokkozisin endemik olduğu bölgelerde tarama amacıyla rahatlıkla kullanılabilir. Bunun yanında görüntüleme yöntemlerini desteklemek için diğer serolojik yöntemlerle birlikte kullanılabilir.

Etik Kurul Onayı: Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 16 no'lu kararı ile onay alınmıştır.

Kaynaklar

1. Sari C, Ertug S, Karadam SY, et al. The comparative evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Hemagglutination Test (IHA) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) in the diagnosis of cystic echinococcosis. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2009;33:73-6.
2. Altıntaş N. Past to present: echinococcosis in Turkey. *Acta Tropica*. 2003;85:105-12.
3. Tunger O. Epidemiology of Cystic in the World. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2012;37:47-52.
4. Grosso G, Gruttadauria S, Biondi A, et al. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World journal of gastroenterology WJG*. 2012;18:1425-37.
5. Yılmaz G, Babur C. Diagnosis of Echinococcosis. *Türk Hijyen ve Biyoloji Dergisi*. 2007;64:35-44.
6. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Micro Rev*. 2004;17:107-35.
7. Aydın M, Adıyaman G, Doğruman-Al F, et al. Determination of anti-echinococcus IgG antibodies by ELISA in patients with suspected hydatid cyst. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2012;36:61-4.
8. Biava MF, Dao A, Fortier B. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. *W J Sur*. 2001;25:10-4.
9. Zarzosa MP, Orduna Domingo A, Gutierrez P, et al. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diag Micro Inf Dis*. 1999;35:255-62.
10. Yazar S. Cystic echinococcosis'in tanısında SDS-PAGE ve Western Blot yönteminin diğer serolojik tanı yöntemleri ile karşılaştırılması. In: Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İzmir: Ege Üniversitesi; 1998.
11. Tevfik M, Aldemir O, Karadas K, et al. Mlatya Bölgesinde Uniloküler Kistik Ekinokokkozis. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2000;24:33-36.
12. Karadağ A, Yanık K, Unal N, et al. Evaluation of materials sent due to suspected cystic echinococcosis to the parasitology laboratory of Ondokuz Mayıs University Medical School between the Years 2005-2011. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2013;37:28-31.
13. Beyhan YE, Babur C, Mungan M, et al. Evaluation of Cystic Echinococcosis Suspected Patients Applied to National Parasitology Reference Laboratory of Public Health Institution of Turkey Between 2009-2013. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2015;39:17-21.
14. Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immun Med Microbiology*. 2006;47:24-41.
15. Carmena D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection: An update. *Acta Tropica*. 2006;98:74-86.
16. Feng X, Wen H, Zhang Z, et al. Dot immunogold filtration assay (DIGFA) with multiple native antigens for rapid serodiagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Acta Tropica*. 2010;113:114-20.
17. Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, et al. Immunodiagnosis of Echinococcus infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. *J Clin Microbiology*. 2000;38:3718-21.
18. Yılmaz H, Cengiz ZT, Cicek M. Unilocular cyst hydatid cases diagnosed between 1998-2005 in the Parasitology Laboratory of Yuzuncu Yil University Research and Training Hospital. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2013;37:249-51.
19. Esgin M, Aktas M, Coskun S. The investigation of antibody presence in the sera of patients with a suspicion of cystic echinococcosis by using indirect hemagglutination test (IHA). *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2007;31:283-7.
20. Yazar S, Yaman O, Cetinkaya F, et al. Cystic echinococcosis in Central Anatolia, Turkey. *Saudi Med J*. 2006;27:205-9.
21. Babba H, Messedi A, Masmoudi S, et al. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50:64-8.
22. Kilimcioglu AA, Girginkardesler N, Korkmaz M, et al. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. *Acta Tropica*. 2013;128:578-83.
23. Garcia L. Tissue cestodes. DC: ASM Press; 2001.
24. Ammann RW, Eckert J. Cestodes. Echinococcus. *Gastroent Clin North Am*. 1996;25:655-89.
25. Abdel Aal TM, el-Hady HM, Youssef FG, et al. Studies on the most reactive purified antigen for immuno-diagnosis of hydatid disease. *J Egyptian Soc Parasitol*. 1996;26:297-303.
26. Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin Micro Rev*. 1992;5:248-61.
27. Force L, Torres JM, Carrillo A, et al. Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. *Clin Inf Dis*. 1992;15:473-80.
28. Sako Y, Fukuda K, Kobayashi Y, et al. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. *Journal of clinical microbiology* 2009;47:252-4.
29. Wang JY, Gao CH, Steverding D, et al. Differential diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis using an immunochromatographic test based on the detection of specific antibodies. *Parasitol Res* 2013;112:3627-33.
30. Tamer GS, Dundar D, Uzuner H, et al. Evaluation of immunochromatographic test for the detection of antibodies against Echinococcus granulosus. *Med. Sci. Mon* 2015;21:1219-22.