

**CYSTIC ECHINOCOCCOSIS'İN (CE) İNDİREKT FLUORESAN  
ANTİKOR TESTİ (IFAT) İLE TANISINDA KULLANILAN  
ANTİJENLERİN TANI DEĞERLERİNİN ARAŞTIRILMASI\***  
**Investigation of Diagnostic Values of Antigens Used for the  
Diagnosis of Cystic Echinococcosis by IFAT**

Sevinç ŞENER<sup>1</sup>, Süleyman YAZAR<sup>2</sup>, İzzet ŞAHİN<sup>3</sup>

**Özet :** Cystic Echinococcosis(CE); Echinococcus granulosus'un metasestod formunun neden olduğu bir helminto-zoonozdur. Çalışmada, CE olduğu operasyonla kanıtanmış 20, Taenia saginata ile enfekte 20, Hymenolepis nana ile enfekte 6 hasta ve 10 sağlıklı kontrol serumunda; bütün protoskoleks, germinal membran kesiti ve kesit protoskoleks ile hazırlanmış olan antijenlerin kullanıldığı IFAT ve ELISA ile anti-Echinococ antikorları araştırılmıştır. Çalışmada; IFAT için germinal membran kesit antijeninde özgüllük %100, duyarlılık %100, bütün protoskoleks antijeninde özgüllük %80, duyarlılık %95, kesit protoskoleks antijeninde özgüllük %97, duyarlılık %100 olarak saptanmıştır. Hazır ELISA kitinin ise özgüllüğü %70, duyarlılığı %100 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, her üç yöntemle hazırlanan antijenlerin insan CE tanısı için IFAT ta kullanılabilceği fakat germinal membran kesit antijeni ile çapraz reaksiyon görülmemesi ve hazırlanmasının kolay olmasından dolayı bu yöntemle hazırlanan antijenin kullanılmasının büyük avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kistik ekinokokkozis, Antijen, IFAT, ELISA.

Echinococcus granulosus'un larval formunun insanlarda karaciğer ve akciğer başta olmak üzere birçok organa yerleşmesiyle meydana gelen hastalığa kistik ekinokokkozis (cystic echinococcosis=CE) adı verilmektedir. CE tüm dünyada olduğu gibi, büyük bir

<sup>1</sup> Bilim Uzm. Erc. Ün. Sağlık Bil. Ens, Parazitoloji AD, Kayseri

<sup>2</sup> Yrd. Doç. Dr. Erc. Ün. Tıp Fak, Parazitoloji AD, Kayseri

<sup>3</sup> Prof. Dr. Erc. Ün. Tıp Fak, Parazitoloji AD, Kayseri

**Summary :** Cystic echinococcosis (CE) is a helmintho-zoonosis caused by metacestode form of Echinococcus granulosus. At the present study, anti-Echinococ antibodies were investigated using whole protoscolex, cross-section of protoscolex and germinal membrane cross-section antigens by IFAT and also by ELISA in 20 samples with CE proved by operation, 20 samples of patients infected with Taenia saginata, 6 samples of patients infected with Hymenolepis nana and 10 samples as controls. Specificity and sensitivity of each test was calculated and they were found for IFAT as follow; for germinal membrane specificity 100%, sensitivity 100%, for whole protoscolex specificity 80%, sensitivity 95% and for cross-section protoscolex specificity 97% and sensitivity 100%. Commercial ELISA kit's specificity and sensitivity were also obtained as %70 and 100% respectively. These results indicate IFAT antigens prepared with these three methods could be used for the diagnosis of human CE. Uses of germinal membrane cross-section antigens could be more useful than others in IFAT, for it is easier to prepare and there is no cross-reaction seen.

**Key words:** Cystic echinococcosis, Antigen, IFAT, ELISA.

kesimin hayvancılıkla uğraştığı ülkemizde de yaygın bir hastalıktır. Koyun, sığır vb hayvanların kistli organlarının yenmesi sonucunda enfekte olan köpeklerde parazit erişkin forma döner ve yumurtalarının köpek dışkıyla etrafa yayılması sonucu insanlar bu yumurtaları bulaşlı yiyecek ve içeceklerle veya köpek ile temas sonucunda ağız yoluyla alarak enfekte olurlar.

\*Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 02.11.06 nolu proje ile desteklenmiştir.

CE tanısının günümüzde radyolojik tanı yöntemleriyle konmaya çalışılmasına rağmen kistin tümör, abse, basit kist gibi diğer yer kaplayan olgularla ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve operasyon sonrası nükslerin daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için ön tanının serolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda *Echinococcus granulosus* 'un metasesod formunda bulunan farklı antijenik yapılar (bütün protoskoleks, protoskoleks kesiti ve germinal membran kesiti) kullanarak hazırladığımız IFAT antijen preparatları ile anti-echinococ antikorları, hazır ELISA kiti paralellğinde araştırılmış ve farklı antijenik yapılarla elde edilen sonuçların duyarlılığının ve özgüllüğünün karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya alınan 56 olgudan 20'si Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Kayseri SSK Hastanelerine müracaat ederek operasyon ile CE kesin tanısı olanlardan, çapraz reaksiyonun araştırıldığı *Taenia saginata* 'lı 20, *Hymenolepis nana* 'lı 6 hastadan ,10'u ise sağlıklı insanlardan oluşmaktadır.Bu olgulardan yaklaşık 5cc kan alınıp 3000 devir/dak da santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve kullanılmaya kadar -70 °C de saklanmıştır.

**IFAT için Antijen Hazırlanması :** *Echinococcus granulosus* 'un metasesod formunda bulunan farklı yapılar kullanılarak IFAT için antijen hazırlanmıştır.

**Bütün protoskoleks antijeninin hazırlanması:** Kistlerden aspire edilen sıvı, protoskolekslerin ve diğer partiküllerin çökmesi için 30 dakika bekletilmiş ve 1000 devir/dak da 15 dakika santrifüj edilerek parazit yoğunluğu arttırılmıştır. Daha önce 1 saat alkol eter karışımında bekletilmiş, adhesiv hale getirilmiş teflon baskılı lamaların her bir çukuruna 10-15 protoskoleks düşecek şekilde yayılmıştır. Oda ısısında kurutulan lamalar pelur kağıdına sarılarak kullanılmaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

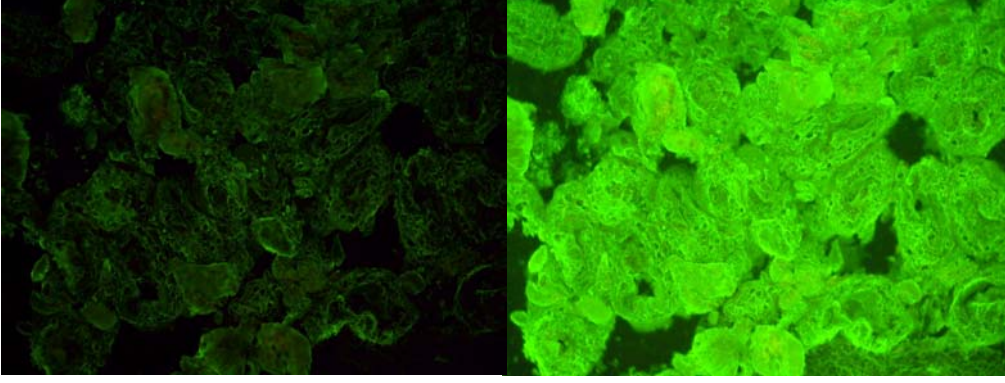
**Protoskoleks kesit antijeni:** Steril tüp içerisine alınan protoskoleksler fizyolojik tuzlu su ile 3-4 kez yıkandıktan sonra fareden elde ettiğimiz ve temizlemiş olduğumuz ince bağırsak içine enjektör yardımıyla doldurularak barsak parçasının iki ucu bağlandı ve -20°C saklandı. Doku kesiti alma yöntemlerinden parafine gömme metodunda yüksek ısı olduğundan antijenik yapının bozulabileceği düşüncesiyle frozen mikrotom (Shandon Cryotome 77210160GB) yöntemi kullanıldı ve 8µm kalınlığında kesitler alınıp teflon baskılı lamlara implante edilerek kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

**Çimlenme zarı (Germinal membran) kesit antijeninin hazırlanması:** Kist içinden elde edilen germinal membran homojenizatörle (IKA Model T 25, Ultra-Turax) parçalandı. Fareden elde edilen bağırsağa doldurulup frozen mikrotom (Shandon Cryotome 77210160GB) ile 8µm kalınlığında kesitler alınıp teflon baskılı lamlara implante edilerek kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

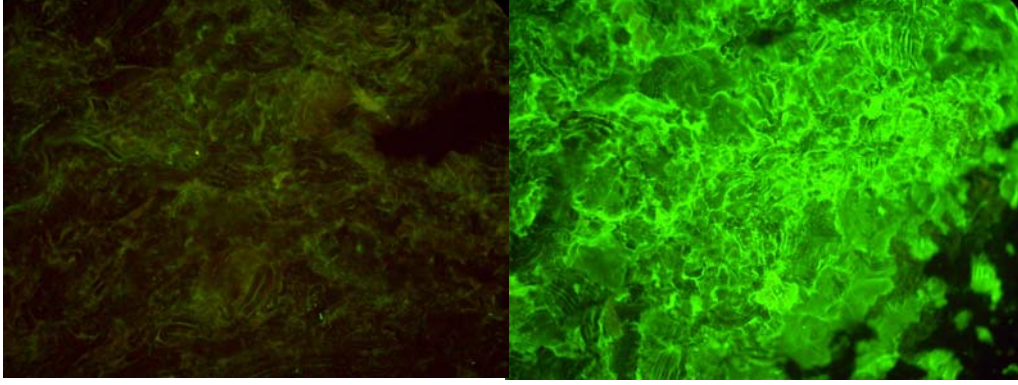
**Testin Uygulanışı :** Serum sulandırılmaları 1/8' den başlayarak seri halinde 1/1024 'e kadar yapılmış ve her bir antijen ile test ayrı ayrı çalışılmıştır(1). Optimal görüntü kalitesini elde etmek için bir seri denememizden sonra; bütün protoskoleks antijenleri için konjuge %0.01'lik Evans blue ile, protoskoleks kesit antijeni ve çimlenme zarı kesit antijeni için ise distile su ile sulandırılmıştır. Prosedüre uygun hazırlanan preparatlar Fluoresan mikroskopunda (Nikon E 600) x100 büyütmede ışık kaynağı olarak civa buharlı ampül ve mavi band filtre seti kullanılarak 450-490nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

Çalışmada IBL Immuno Biologigcal Laboratories markalı ELISA kiti de kullanılmıştır.Testte üretici firma tarafından önerilen test prosedürü uygulanmıştır.

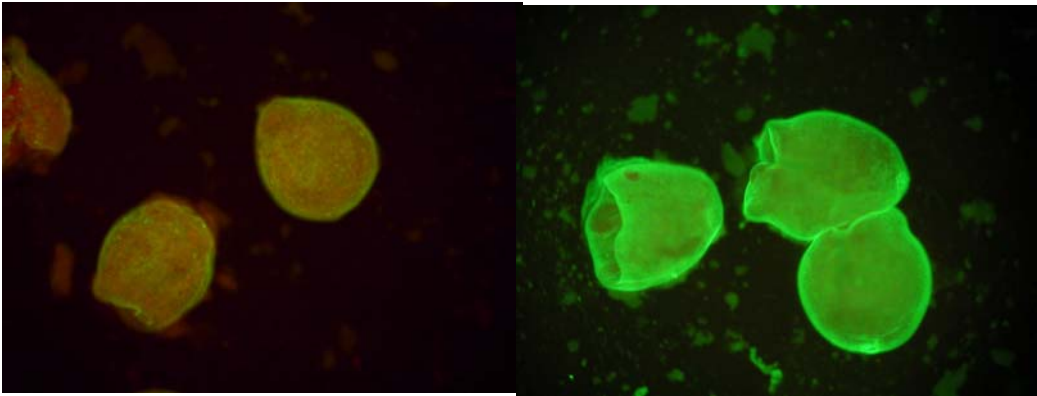
**Sonuçların Değerlendirilmesi :** Parlak sarı-yeşil fluoresans verenler pozitif, soluk veya hiç fluoresans vermeyenler, portakal renkli görünümde olanlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1,2,3).



Şekil 1. Protoskoleks kesit antijeni ile negatif ve pozitif preparat (A: negatif, B: pozitif)



Şekil 2. Germinal membran kesit antijeni ile negatif ve pozitif preparat (A: negatif, B: pozitif)



Şekil 3. Bütün protoskoleks antijeni ile negatif ve pozitif preparat (A: negatif, B: pozitif)

## BULGULAR

Çalışmamızda IFA testinde bütün protoskoleks, kesit protoskoleks ve germinal membran kesit antijenleri kullanılmıştır. Operasyonla CE olduğu doğrulanmış 20 hasta germinal membran kesit antijeni ve kesit protoskoleks antijeni ile yapılan IFA testinin hepsinde pozitif sonuç verirken, bütün protoskoleks ile yapılan IFA testinde bir hasta da yalancı negatiflik saptanmıştır. Çapraz reaksiyonun araştırıldığı *Taenia saginata*'lı 20 serumun hepsi germinal membran kesit antijeni ile negatif reaksiyon; kesit protoskolekslerin kullanıldığı IFA testinde ise 1 hastada pozitif sonuç; bütün protoskoleks antijeni ile 15'i negatif 5 hasta serumun da ise düşük dilusyonlarda pozitif sonuç

alınmıştır. *Hymenolepis nana*'lı 6 hasta serumu germinal membran ve kesit protoskoleks antijenleriyle negatif sonuç verirken; bütün protoskoleks antijenleri ile 2 hasta pozitiflik vermiştir. Sağlıklı 10 kişiden alınan serum örnekleri her üç antijenin üçünde de negatif sonuç elde edilmiştir (Tablo I).

Germinal membran ile hazırlanan IFAT'ın özgüllüğü %100, duyarlılığı %100; bütün skoleks ile hazırlanan IFAT'ın özgüllüğü %80, duyarlılığı %95; kesit skoleks ile hazırlanan IFAT'ın özgüllüğü %97, duyarlılığı %100 olarak hesaplanırken, çalışmada kullanılan ELISA'nın ise özgüllüğü %72, duyarlılığı %100 olarak hesaplanmıştır (Tablo II).

**Tablo I.** Çalışmaya alınan olgular ve elde edilen sonuçlar

Gruplar	n	Germinal Membran		Kesit protoskoleks		Bütün protoskoleks		ELISA	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
<b>CE'li hastalar</b>	20	-	20	-	20	1	19	0	20
<i>Taenia saginata</i> 'lı hastalar	20	20	-	15	5	19	1	12	8
<i>H. nana</i> 'lı hastalar	6	6	-	6	-	4	2	4	2
<i>Sağlıklı insan serumları</i>	10	10	-	10	-	10	-	10	-

**Tablo II.** Farklı Antijenlerle Hazırlanan IFAT'ın ve ELISA'nın Özgüllük ve Duyarlılıkları

Yöntem	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)
IFAT, germinal membran	100	100
IFAT, bütün protoskoleks	91	95
IFAT, kesit protoskoleks	86	100
ELISA	72	100

## TARTIŞMA

İnsan CE'inde tanı koydurucu spesifik klinik bulguların olmaması, hastalığın tanısında klinik bulgulardan çok laboratuvar bulgularından yararlanılmasına neden olmuştur. Diğer taraftan günümüzde hastalığın tedavisinde medikal tedavinin yetersizliği nedeniyle cerrahi tedavinin tercih edilmesi ve CE cerrahisinin bazı komplikasyonları beraberinde getirmesi ihtimali de CE'de tanının önemini arttırmaktadır. Günümüzde CE tanısında bilinen hemen bütün serolojik yöntemler kullanılabilir. Kullanılan immunolojik tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıklarının farklı olması ve optimal uygulama şartlarına sahip olan testlerin %100 güvenilir sonuç verememesi, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan immunolojik tanı yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir.

Hidatidozun IFAT ile teşhisinde, antijen olarak; dondurulmuş parazitli doku kesitleri, protoskoleks ve kistik membranların kullanıldığı çalışmalardan olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (2,3).

Altıntaş (4), operasyon ile doğrulanmış CE olgularında yaptığı çalışmada, operasyon öncesi bütün protoskolekslerin kullanıldığı IFA testi ile %62.7 oranında pozitif sonuç aldığını bildirmiştir. Hidatidozun teşhisi amacı ile kist sıvısı ve donmuş protoskoleks kesitleri antijen olarak kullanıldığı bir çalışmada; IFAT'ın duyarlılığı %70, özgüllüğü %80 olarak saptanmıştır (5).

Doğanay A ve ark (6); IFAT'da protoskoleks kesit antijenlerini kullanarak IFAT'ın, insanlarda özgüllüğü %80, duyarlılığını %70, koyunlarda ise hem özgüllüğü hem de duyarlılığı %90 olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda IFA testinde bütün protoskoleks, kesit protoskoleks ve germinal membran kesit antijenleri kullanılmıştır. Operasyonla CE olduğu doğrulanmış 20 hasta kesit protoskoleks antijeni ve germinal membran kesit antijeni ile yapılan IFA testinin hepsinde pozitif sonuç verirken, bütün protoskoleks ile yapılan IFA testinde bir hasta da yalancı negatiflik saptanmıştır. Çapraz reaksiyonun araştırıldığı *Taenia saginata*'lı 20 serumun hepsi germinal membran kesit antijeni ile negatif

reaksiyon; bütün skoleks antijeni ile 15'i negatif 5 hasta serumun da ise düşük dilusyonlarda (4 hasta 1/8, 1 hasta 1/16) pozitif sonuç; kesit skolekslerin kullanıldığı IFA testinde ise 1 hastada 1/8 dilusyonda pozitif sonuç alınmıştır. *Hymenolepis nana*'lı 6 hasta serumu germinal membran ve kesit skoleks antijenleriyle negatif sonuç verirken; bütün skoleks antijenleri ile 2 hasta serumu 1/8 sulandırımında pozitiflik vermiştir. Ayrıca sağlıklı 10 kişiden alınan serum örnekleri her üç antijenin üçünde de negatif sonuç elde edilmiştir. Germinal membran ile hazırlanan IFAT'ın özgüllüğü %100, duyarlılığı %100; bütün skoleks ile hazırlanan IFAT'ın özgüllüğü %80, duyarlılığı %95; kesit skoleks ile hazırlanan IFAT'ın özgüllüğü %97, duyarlılığı %100 olarak hesaplanmıştır. IFAT çalışılan bütün serumlar, karşılaştırma amacıyla IBL (Immuno Biological Laboratories) firmasından temin edilen Echinococcus IgG-ELISA kiti ile de çalışılmış; Özgüllük %72 duyarlılık ise %100 olarak bulunmuştur.

Siracusano ve arkadaşları (7), özgüllükde görülen farklılıkların antijen hazırlama şekli ve populasyonlardaki çevresel faktörlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada; insan hidatik kist hastalığının tanısında IFAT için antijen olarak parafine gömülmüş *Echinococcus granulosus*'un protoskoleksleri kullanılmıştır. IFA testinde duyarlılık %83.3 olarak hesaplanırken, %2.2 oranında çapraz reaksiyon saptanmışlardır (8).

Çalışmamızda, Her üç yöntemle hazırlanan IFA testinde yüksek duyarlılığının elde edilmiş olması bu testlerin insan CE tanısında kullanılabileceğini göstermekle beraber; bütün protoskoleks ve kesit protoskoleksle elde edilen çapraz reaksiyonlara karşın germinal membran kesit antijeni ile her hangi bir çapraz reaksiyon olmaması; ayrıca antijen hazırlamak için germinal membran temininin protoskoleks temininden çok daha kolay olması ve hatta bir kist içinden çıkarılacak germinal membran ile yüzlerce test yapılabilecek antijen hazırlama olanağının olması nedeniyle; CE tanısında IFAT için germinal membran kesit antijenlerinin kullanılmasının büyük avantajı olacağı kanaatindeyiz.

#### KAYNAKLAR

1. Yazar S. *Cystic echinococcosis (CE)*'nin tanısında SDS-PAGE ve western blot yönteminin diğer serolojik tanı yöntemleri ile karşılaştırılması. (Doktora tezi), Ege Üniv Tıp Fak Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, 1998.
2. Coudert J, Ambroise-Thomas P, Despeignes J, Cadi-Soussi M, Kien-Truong T. Serologic diagnosis of alveolar echinococcosis by immunofluorescence. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1966, 59:859-865.
3. Coudert J, Ambroise-Thomas P, Kien-Truong T, Pothier MA. 1st results concerning the serologic diagnosis of hydatid cyst by a new technic of immunofluorescence on slides. *Bull Soc Path Exot Filiales* 1967, 60:555-563.
4. Altıntaş N. Kist Hidatik ve iç organlar larva göçü hastalıklarında immunolojik tanı yöntemleri ve değerleri, (Doktora tezi), Ege Üniv Tıp Fak Parazitoloji Bilim Dalı, İzmir, 1985.
5. Hardy WD Jr. General principles of retrovirus immuno detection tests. *J Am Vet Med Assoc* 1991, 199:1282-1287.
6. Doğanay A, Burgu A, Tanyüksel M, Sarımehtemetoğlu O, Gönenç B, Kozan E, Yıldırım A. İnsan ve koyunlarda hidatidozun indirekt floresan antikor tekniği ile teşhisi, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu 2000-08-10-023 nolu projesi kesin raporu, Ankara, 2001.
7. Siracusano A, Ioppolo S, Notargiacomo S, Ortona E, Rigano R, Teggi A, De Rosa F, Vicari G. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by immunoblotting. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991, 85: 239-243.
8. Guisantes JA, Vicente F. Parafin embedded *Echinococcus granulosus* protoscoleces as suitable antigen in the indirect immunofluorescence test for human hydatid disease. *Boll Ist Sieroter Milan* 1983, 62:85-90.

