

Kistik Ekinokokkozis Tanısında Ticari İndirekt Floresan Antikor (IFA), İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) Testleri ve Laboratuvarımızda Hazırladığımız IFA Testinin Karşılaştırılması

Uysal Elif BİLGE¹, Mehmet ÖZDEMİR², Mahmut BAYKAN²

¹Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Konya,

²Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

ÖZET: Hidatidoz Dünyanın pek çok bölgesinde endemik bir hastalıktır. Birçok tanısıl metodların kistik hidatik tanısındaki etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada ticari Floresan Antikor (IFA), IHA İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) testleri ile in-house IFA testinin tanı değerinin karşılaştırılması amaçlandı. Bu sebeple operasyonla karaciğer kistik hidatidoz tanısı konmuş 100 hastanın serumu çalışıldı. *Echinococcus granulosus* germinal membranından hazırlanan antijenler kullanılarak in-house IFA hazırlandı. Serumlar üç farklı yöntemle çalışıldı. Ticari IFA, IHA ve in-house IFA testlerinin spesifiteleri %100, sensitiviteeleri ise sırasıyla %87,7, %74,6 ve %83,3 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak in-house IFA testinin laboratuvarında rutin çalışmada kullanılabilir maliyeti düşük bir test olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: *Echinococcus granulosus*; hidatidoz; tanı; IFA

Comparison of Commercial IFA, IHA and In-House IFA Tests in the Diagnosis of Cystic Echinococcosis

SUMMARY: Hydatidosis is an endemic illness in many regions of world. Several serodiagnostic techniques have been evaluated for the diagnosis of cystic hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus*. The aim of this study was to assess the efficiency of the commercial florescent antibody test (IFAT), indirect hemagglutination test (IHAT) and in-house IFA tests. For this purpose sera from one hundred patients who had been given a diagnosis of hydatid cyst by surgery were used. In-house IFA was developed using the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* and sera were studied by the three different methods. As a result, the specificity of commercial IFA, IHA and in-house IFA was found to be 100% and sensitivities of these tests were 87.7%, 74.6% and 83.3% respectively. In conclusion, in-house IFA test is a useful and cost effective but difficult test to prepare for the routine laboratory.

Key Words: *Echinococcus granulosus*, hydatidosis, diagnosis, IFA

GİRİŞ

Kistik Ekinokokkozis (KE) hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde daha çok olmak üzere tüm dünyada görülen, sıklıkla karaciğer ve akciğerde yerleşim gösteren, önemli ölçüde sağlık sorununa ve ekonomik kayıplara sebep olan *Echinococcus granulosus*'un oluşturduğu hastalığa denir.

KE erişkini köpek ve kurt başta olmak üzere değişik karnivorların ince bağırsağında yaşar. Son konağın dışkıyla atılan infektif yumurtalar koyun, sığır ve insan gibi parazitin yaşam döngüsündeki arakonakçılar tarafından çiğ olarak tüketilen

veya iyi yıkanmamış meyve, sebze ayrıca kontamine içme suları ile alınır (18). Arakonakçıların çeşitli organlarında KE'ye dönüşür. Mezbahalarda ve diğer hayvan kesim yerlerinde infekte olan organların imha edilmemesi ve atılması ile de parazit son konak tarafından alınır.

KE insanlarda farklı klinik tablolarda, ayrıca her yaşta ve her organda görülebilmektedir. Klinik tanı, invaziv olmayan görüntüleme teknikleri ile yer kaplayan diğer lezyonların ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve ameliyat sonrası hasta takibi amacı ile de serolojik tekniklerin kullanımını gerektirmektedir. Çalışmamızda *E. granulosus*'un koyun karaciğerinde oluşturduğu hidatik kistte bulunan germinal membran kullanılarak IFA Tekniği için hazırlanan antijenli lamlar, operasyonla KE olduğu kanıtlanmış hasta serumları ile çalışıldı. Ayrıca hasta serumları ticari IFA ve ticari IHA testleri ile de çalışılarak her üç testin spesifite ve sensitivite sonuçları karşılaştırıldı. Bu çalışma ile laboratuvarında

Makale türü/Article type: **Araştırma / Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 19 Mart/19 March 2009

Düzeltilme tarihi/Revision date: 21 Nisan/21 April 2009

Kabul tarihi/Accepted date: 21 Nisan/21 April 2009

Yazışma /Corresponding Author: Mehmet Özdemir

Tel: - Fax: -

E-mail: mehmetozdem@yahoo.com

rutin çalışmada kullanılabilir bir test geliştirilmesi ve ticari IFA, IHA testleri ile laboratuvarımızda hazırlanan in-house IFA testinin tanı değerinin karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Servisi'nde ve Konya Numune Hastanesi Genel Cerrahi Servisi'nde operasyonla karaciğer kist hidatik olduğu saptanmış 100 hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubundaki kişinin kanı alındı. Hastaların kanı operasyondan sonraki 1 hafta içinde alındı. Kanlar 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

İndirekt floresan antikör testi için ticari Echinococcosis IFA kiti (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Kit firma önerilerine uygun olarak çalışıldı. Floresan mikroskopunda (Euroimmun EUROStar-1, Almanya) x40 büyütmede 460-490nm dalga boyunda iki farklı kişi tarafından değerlendirildi. Bakıda 1/100 titrasyonda parlak yeşil floresan veren örnekler pozitif, hiç floresan vermeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi.

İndirekt Hemaglütinasyon testi için ticari Echinococcosis IHA kiti (Fumouze Diagnostics, Fransa) kullanıldı. Önerilere uygun olarak çalışılan test sonucunda kuyucuklarda nokta şeklinde görülen reaksiyon negatif, kuyucuğun zemininde yaygın şekilde görülen aglütinasyon pozitif olarak değerlendirildi. KE açısından 1/320 ve üzeri titrasyonda pozitif çıkan örnekler değerlendirmeye alındı.

Laboratuvarda hazırladığımız IFA testi (in-house IFA) için lamalar şu şekilde hazırlandı: Et entegre tesislerinde kesilen ve karaciğerinde KE olduğu saptanan koyunların karaciğerleri bekletilmeden laboratuvara getirildi. Kist içindeki sıvı enjektörle tamamen aspire edildi. Bistüri ile kist kesilerek içinden germinal membran bir penset yardımı ile alındı ve serum fizyolojik bulunan steril petri kutusuna konularak germinal membran üzerinde protoskoleks kalmayıncaya kadar yıkandı. Germinal membrandan frozen cihazı ile 8 µm kalınlığında kesitler alındı. 24 saat eter alkol karışımında bekletilmiş lamlara, her bir lamda ikişer kesit olacak şekilde yapıştırıldı. Aseton bulunan küvette 10 dakika tutularak lamalar tespit edildi. Kesitlerin etrafı suda çıkmayan cam yazar kalem ile çizildi ve numaralandırıldı. Lamalar kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı. Her hasta için PBS (Fosfat Buffer Saline) ile 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 olmak üzere 4 dilüsyon hazırlandı. Her bir kesite, dilüe edilen hasta serumlarından 25 µL konuldu. 37 °C'lik etüvde 30 dakika inkübe edildi. PBS ile shaker kullanılarak yıkandı. Konjugat hazırlanması sırasında en iyi görüntünün PBS ile 1/100 oranında dilüe edilen fluorescein-işaretli IgG globulin (Biomerieux, Fransa) olduğu görüldüğünden her bir kesite 25 µL hazırlanan konjugattan konuldu. 37 °C'lik etüvde 30 dakika inkübe edildi. PBS ile shaker kullanılarak tekrar yıkandı. Kapatma solüsyonu olarak gliserin damlatılıp lamalar 24x60 mm'lik lamellerle kapatıldı. Lamalar floresan mikroskopunda (Euroimmun EUROStar-1, Almanya) x40

büyütmede 460-490 nm dalga boyunda iki farklı kişi tarafından değerlendirildi. Bakıda 1/32 dilüsyonda parlak yeşil floresan veren örnekler pozitif olarak değerlendirildi. 1/8, 1/16, 1/32 dilüsyonda floresan vermeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi. Çalışmamızda istatistik analizi için χ^2 testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamıza alınan operasyonla KE olduğu saptanmış 100 hastanın yaşları 15 ile 77 arasında olup ortalama yaşları 42,0 idi. Bu hastaların 65'i kadın, 35'i erkekti. Kontrol grubuna alınan 30 hastanın yaşları ise 17 ile 77 arasında olup ortalama yaşları 40,0 idi.

Elde edilen sonuçlara göre çalışılan 100 hastanın 66'sında IHA testi 1/320 ve/veya ileri titrasyonlarda pozitif iken 34'ü negatifti. IFA testinde 86 hasta 1/100 titrasyonda pozitifken 14 hasta negatif idi. In-house IFA testinde ise çalışılan 80 hasta 1/32 ve/veya pozitif çıktığı halde, 20 hasta negatif idi. Kontrol grubuna alınan 30 hastanın serumu her üç testle de negatif sonuç verdi. Bu sonuçlara göre hesaplanan in-house IFA, ticari IFA ve ticari IHA testlerinin spesifite, sensitivite, pozitif prediktif değeri, negatif prediktif değerleri tabloda görülmektedir.

Tablo 1. Çalışılan hastaların spesifite, sensitivite, PPD, NPD oranları

	In-house IFAT	IFAT	IHAT
Spesifite	100	100	100
Sensitivite	83,3	87,7	74,6
PPD	100	100	100
NPD	60	68,1	46,8

IHA, IFA ve in-house IFA testlerindeki pozitif sonuçların değerlendirilmesinde yapılan χ^2 testinde; genel $\chi^2 = 10.765$, tablo $\chi^2 = 5.991$ 'dir. Bulunan χ^2 değeri, tablo χ^2 değerinden büyük olduğu için IHA, IFA, in-house IFA testleri arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır. Bu farklılığın sebebi IHA testidir. Bu test hariç tutularak IFA ve in-house IFA testleri arasındaki farkın χ^2 testi ile anlamlı olup olmadığı hesaplandığında $\chi^2 = 0.884$, tablo $\chi^2 = 3.841$ 'dir. IFA ve in-house IFA testi için yapılan χ^2 testinde bulunan χ^2 değeri, tablo χ^2 değerinden küçük olduğu için IFA ve in-house IFA testi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

TARTIŞMA

E. granulosus'un larva (metasestod) formunun neden olduğu KE hem hayvanlarda hem insanlarda sağlığı tehdit eden, dünyada ve Türkiye'de önemli ekonomik kayıplara neden olan bir zoonozdur (3, 12, 19). Ülkemizde zoo-coğrafi yapının farklılık göstermesi, iklim koşulları, toplumun sosyoekonomik düzeyi, halkın eğitim eksikliği gibi nedenlerle KE geniş bir yayılım göstermektedir (3). Alkan ve ark. yaptıkları bir çalışmada kırsal alanda kist hidatik prevalansını serolojik olarak 100.000'de 585 olarak bulmuşlardır (2). Merdivenci ve

Aydinoğlu da prevalansı yılda 100.000'de 0.87-6.6 olarak bildirmişlerdir (10). Hidatik kist ön tanılı olarak hastaneye başvuranlar arasında yapılan çalışmalarda ise Daldal ve ark. (3) %40, Karaman ve ark. (8) %7,8, Aldemir ve ark. (1) %0,28, Akisü ve ark. (4) %73,7, Polat ve ark. (13) %4,85 pozitiflik bulmuşlardır.

KE her toplumda ve her yaşta, genellikle oyun çocukluğu veya ilkököl çağında alınmaktadır. Yapılan değişik çalışmalarda kist hidatiğin görüldüğü yaş grupları farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda ise KE'in en sık görüldüğü yaş grubu %45 ile 40-59 arasındadır. KE'in kadın ve erkekler arasında görülme oranının eşit olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte KE hastaların değişik ülkelerde kadın ve erkekte değişik oranlarda bulunması, kişilerin içinde yaşadıkları çevre ile olan ilişkilerine ve köpekle olan yakın temaslarına göre değişebilmektedir. Bizim çalışmamızda da hastalarımızın %65'ini kadınlar, %35'ini erkekler oluşturmaktadır. Karaman ve ark. ise kadınlarda daha fazla görülmesinin sebebini kadınların köpeklerin bakımını ve temizliğini üstlenmelerinin yanı sıra yemek ve temizlik işleri ile ilgili olmalarını göstermektedir (9). Doğal olarak köpeğin bulunduğu çevrede yaşamının bu hastalık bakımından riski büyük olmaktadır (14, 21).

KE'te tanı, radyolojik tanı yöntemleri ile konulmaya çalışılmasına rağmen kistin diğer yer kaplayan lezyonlarla ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve operasyon sonrası nükslerin daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için radyolojik tanının serolojik tanı yöntemleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Serolojik tanının diğer önemli bir yönü de asemptomatik kist taşıyıcılarının belirlenmesinde ön tarama testi olmasıdır. Bu araştırmalar ile tespit edilecek kişiler ileri tetkikler için hastanelere sevkedilebilir ve gerekli tedaviyi görebilirler (18). Laboratuvarında rutin çalışmada en sık uygulanan serolojik yöntemler IFA, IHA ve ELISA'dır.

In-house IFA testi için çeşitli araştırmacılar tarafından değişik şekillerde antijenli lamlar hazırlanmıştır. Şener ve ark. (16) germinal membran kesit antijeni ile yaptıkları çalışmada spesifite ve sensitiviteyi %100, Şenlik (17) 300 koyun üzerinde protoskoleks kullanarak hazırladığı IFAT çalışmasında ise spesifiteyi %92,57, sensitiviteyi %78,95 olarak bulmuşlardır. Yapılan bir çalışmada operasyonla KE teşhisi konan hastalarda bütün protoskoleks antijeni ile %83,3 pozitiflik bulunmuştur (22). Parafine gömülmüş protoskolekslerin antijen olarak kullanıldığı başka bir çalışmada da sensitivite %83,3 olarak bulunurken %2,2 çapraz reaksiyon olduğu görülmüştür (7). Gore ve ark. (6) IFA testi için hem skoleksleri hem hidatik sıvıyı kullanmışlar ve sonuçta skoleksler ile %82, hidatik sıvı ile %87 pozitiflik elde etmişlerdir. Florez (5) yaptığı immünlüresan çalışmasında sensitivite oranını %96 olarak rapor etmiştir. Bizim çalışmamızda da operasyonla KE olduğu kanıtlanmış hastaların serumları *E.granulosus*'un metacestod formunun germinal membranından hazırlanan antijenli lamlar ile çalışıldığında spesifite %100, sensitivite %83,3 olarak bulunmuştur.

Ticari IFA testi kullanarak kist hidatik olduğu kanıtlanmış bir hasta grubunda yapılan çalışmada sensitivite %82,5, spesifite %100 olarak rapor edilirken (15), operasyonla kist hidatik olduğu doğrulanmış hastalarda ticari IFA ile yapılan başka bir çalışmada %97,1 sero-pozitiflik saptanmıştır (20). Bizim çalışmamızda da ticari IFA testi ile spesifite %100, sensitivite %87,7 olarak bulunmuştur.

KE'li hastaların serumları IHA testi ile çalışıldığında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Koç ve ark. (11) KE kesin olan hastalarda IHAT'nin sensitivitesini %90,5, spesifitesini %90 olarak bulurken, Şenlik (17) koyun serumlarını kullandığı çalışmasında IHAT'nin spesifitesini %77,03, sensitivitesini %78,28 olarak rapor etmiştir. Bizim çalışmamızda ise KE olduğu kanıtlanmış hastalarda IHA testinin spesifitesi %100, sensitivitesi %74,6 olarak bulundu. Testlerdeki bu farklılık çalışılan IHA kitinin farklılığından, kistin yerleşim yerinden ve sayısından kaynaklanabilir.

Araştırmamızın bir başka amacı da KE tanısında laboratuvarında hazırlayıp rutin çalışmada kullanabileceğimiz bir test geliştirmektir. Hazırladığımız in-house IFA testinden elde ettiğimiz sonuçların ticari IFA testinden farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ve maliyet olarak test başına hem IFA hem de IHA testlerinden çok daha ucuz olduğunu görüldü. Bu sonuca göre in-house IFA testi laboratuvarında rutin çalışmada kullanılabilir bir testtir. Bununla birlikte yalancı negatif sonuçların olabilmesi nedeni ile başka bir serolojik yöntemle desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Aldemir OS, Baykan M, Gökçen A**, 2000. Konya Numune Hastanesinde 1986-1998 Yılları Arasındaki Kist Hidatik Olgularının Retrospektif Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitol Derg*, 24(1): 73-75
2. **Alkan MZ**, 1994. Kist Hidatikte Seroepidemiolojik Araştırmalar. *Türkiye Parazitol Derg*, 18(3): 302-307.
3. **Daldal N, Aycan ÖM, Atambay M, Karaman Ü**, 2004. Helmint Saptanan Hastalarda İndirekt Hemaglutinasyon Tekniği ile Kistik Ekinokokkozis Seropozitifliğinin Araştırılması. *İnönü Üniv. Tıp Fak. Derg*, 11(3): 151-154.
4. **Delibaş SB, Özkoç S, Şahin S, Aksoy Ü, Akisü Ç**, 2006. Evaluation of Patients Presenting with a Suspicion of Cystic Echinococcosis to the Laboratory of the Parasitology Department of Dokuz Eylül University Medical Faculty. *Türkiye Parazitol Derg*, 30 (4): 279-281
5. **Flórez G, Sanchez C, Albala F**, 1978. Immunological Diagnosis of Echinococcosis. *Childs Brain*, 4(4): 189-94
6. **Gore RW, Sadun EH, Hoff R**, 1970. *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* Soluble Antigen Fluorescent Antibody Test. *Experimental Parasitology*, 28: 272-279
7. **Guisantes JA, Vicente F**, 1983. Paraffin Embedded "*Echinococcus granulosus*" Protoscoleces as Suitable Antigen in the Indirect Immunofluorescence test for Human Hydatid Disease. *Boll Ist Sieroter Milan* 62(1): 85-90.
8. **Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M, Miman Ö, Daldal N**, 2005. Malatya Temizlik İşçilerinde Antiekinokok Antikorlarının Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 29(4): 244-246

9. **Karaman Ü, Daldal N, Atambay M, Aycan MÖ**, 2002. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1999-2002 Tarihleri Arasında İncelenen Hidatik Kist Ön Tanılı Olguların Serolojik Sonuçları. *İnönü Üniv. Tıp Fak. Derg*, 9(4): 233-235.
10. **Karaman Ü, Mıman Ö, Kara M, Gıcık Y, Aycan MA, Atambay M**, 2005. Kars Bölgesinde Hidatik Kist Prevalansı. *Türkiye Parazitol Derg*, 29(4): 238-240
11. **Koç NA, Kılıç H, Sözüer E, Taheri DJ**, 1996. Kist Hidatik Tanılı Olgularda İndirekt 157 Hemaglutinasyon Yönteminin Önemi ve Seropozitiflik Oranı. *T Parazitol Derg*;20(1):57-60.
12. **Kuman HA**, 1997. Kompleman Fiksasyon Reaksiyonu. Özcel MA, Altıntaş N,eds. *Parazit Hastalıklarında Tanı*. İzmir: Türk Parazitoloji Derneği Yayını;15;183-192.
13. **Polat E, Aslan M, Aygün G, İsenkul R, Sağlam GM ve ark**, 2003. Çiğçilik Yapan İnsanlarda Kistik Ekinokokkozis IgG Antikorlarının Yaygınlığının ELISA ile Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 27(1): 21-23
14. **Sahip N, Uysal H, Öztoprak A, Ögüt T, Şengür G, Öner YA**, 2001. 1993-2000 yılları Arasında İstanbul Tıp Fakültesinde İncelenen Kist Hidatik Ön Tanılı Olguların Serolojik Sonuçları. *Türkiye Parazitol Derg*, 25(3): 236-238.
15. **Sarı C, Ertuğ S, Ertabaklar H**, 2003. Kistik Ekinokokkozis'in Serolojik Tanısında ELISA, IHA, IFAT ve Western Blot Yöntemlerinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi. 13.Ulusal Parazitoloji Kongresi. 8-12 Eylül, Konya.
16. **Şener S, Yazar S, Şahin İ**, 2004. Cystic Echinococcosis'in (CE) İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) ile Tanısında Kullanılan Antijenlerin Tanı Değerinin Araştırılması. *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Derg*, 13(1): 1-6
17. **Şenlik B**, 2000. Koyunlarda Hidatidoz'un Teşhisinde İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) ve İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) Testlerinin Kullanımı. *Türkiye Parazitol Derg*, 24(4): 408-413.
18. **Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M**, 1995. *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. 5.Baskı. İstanbul. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları:15; s: 440-453.
19. **Yazar S**, 2005. Kayseri'de Kistik Ekinokokkozisin Son Altı Yıldaki Durumu. *Türkiye Parazitol Derg*, 29(4): 241-243.
20. **Yazar S, Altıntaş N**, 1999. Cystic Echinococcosis (CE)'in Serolojik Tanısında Karşılaşılan Çapraz Reaksiyonların Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*,23(2): 129-132.
21. **Yazar S, Altıntaş N**, 1999. İnsanda Cystic Echinococcus Tedavisi. *Türkiye Parazitol Derg*, 23(3): 255-261.
22. **Yılmaz E, Gün H, Kocabeyoğlu Ö, Güngör S, Baydar İ, Güney Ç**, 1988. Kistik Hidatidoz Tanısında İmmünofloresan Yönteminin Değeri. *Türk Hij Der Biyol Derg*, 45(2): 161-162.