



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*'A KARŞI OLUŞAN
ANTİKORLARIN İHA, İFA VE ELİSA İLE TESBİTİ
VE WESTERN BLOT İLE ANTİKOR
ÇEŞİTLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Sadık AKGÜN
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Tekin KARSLIGİL**

ARALIK 2008

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*'A KARŞI OLUŞAN
ANTİKORLARIN İHA, İFA VE ELİSA İLE TESBİTİ
VE WESTERN BLOT İLE ANTİKOR
ÇEŞİTLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Sadık AKGÜN
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Tekin KARSLIGİL**

Bu tez Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 03-2008/39 proje numarası ile desteklenmiştir.

I. ÖNSÖZ

Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen bu projeyle dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunan ve parazitolojik problemlerin önemli nedenlerinden biri olarak gösterilen ve kistik ekinokokoz etkeni olan *Echinococcus granulosus*'un ne oranda bulunduğu, pozitif saptanan hastaların yaş, cinsiyet, yerleşim yeri, laboratuvar bulguları ve diğer kronik hastalıklarla ilişkisi araştırılmıştır. Hastalığa karşı oluşan antikorların hastalığın tanısında çok önemli bir role sahip olduğu ve çeşitli yöntemlerle hızlı ve kolay bir şekilde tanıya gidilerek hastalığın tedavisine katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Bu amaçla çalışmada farklı yöntemler kullanılarak (IHA, IFA, ELISA) bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü araştırılmıştır. Yine parazitin patojenitesinde önemli rol oynayan ve hastalarda antikor üretimine neden olan paraziter antijenlerin (özellikle protoskolekslere ait) hangilerine karşı antikor geliştiği Western Blot yöntemiyle değerlendirilmiş, bunun hastalığın yerleşimi, biyokimyasal ve radyolojik tetkikler ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Uzmanlık eğitimim süresinde en iyi şekilde yetişmem için çalışan, başta Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. İclal Balcı hocama tez çalışmamda büyük emeği geçen ve katkısı olan Doç. Dr. Tekin Karslıgil'e, yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayşen Bayram'a, Yrd.Doç.Dr. Fahriye Ekşi'ye, laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarıma ve sabırlarından dolayı eşim ve çocuklarıma çok teşekkür ederim.

Dr. Sadık Akgün
Gaziantep 2008

II. İÇİNDEKİLER

Sayfa

I.	ÖNSÖZ.....	I
II.	İÇİNDEKİLER.....	II
III.	ÖZET.....	IV
IV.	ABSTRACT.....	VI
V.	KISALTMALAR.....	VIII
VI.	TABLO LİSTESİ.....	IX
VII.	ŞEKİL LİSTESİ.....	X
VIII.	RESİM LİSTESİ	X
1.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.	GENEL BİLGİLER.....	4
2.1	Kistik ekinokoz (Hydatidosis).....	4
2.1.1	Sınıflandırma.....	6
2.2	<i>Echinococcus granulosus</i>	7
2.2.1	Morfolojisi.....	7
2.2.2	Evrimi.....	7
2.2.3	Kistik ekinokozun gelişimi.....	9
2.3	<i>Echinococcus alveolaris</i>	10
2.4	<i>Echinococcus multilocularis</i>	10
2.5	Patogenez.....	11
2.6	İmmunolojik Yanıt.....	12
2.7	Klinik.....	15
2.8	Tanı.....	15
2.8.1	Casoni cilt testi.....	16
2.8.2	Serolojik tanı yöntemleri.....	16
2.8.2.1	Kistik ekinokoz tanısında kompleman fiksasyon reaksiyonu (KFR)....	17
2.8.2.2	Kistik ekinokoz tanısında IHA Yöntemi.....	18
2.8.2.3	Kistik ekinokoz tanısında IFA Yöntemi.....	18
2.8.2.4	Kistik ekinokoz tanısında ELISA Yöntemi.....	20

2.8.2.5. İmmundiffüzyon ve immunelektroforez.....	21
2.8.2.6. Western blot (immunoblotting).....	22
2.8.3 .Moleküler tanı yöntemleri.....	24
2.8.3.1. Proteinlerin analizi ve (SDS-PAGE).....	24
2.8.4. Kültürde izolasyon.....	25
2.9. Tedavi.....	26
2.10. Epidemiyoloji.....	26
2.11. Korunma ve kontrol.....	27
2.12. Kistik ekinokokozda aşı.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1 Gereç.....	30
3.2. Kullanılan metodlar.....	30
3.2.1. İndirekt hemaglütinasyon (IHA) kitleri.....	30
3.2.2. İndirekt floresan antikor (IFA) yöntemi.....	31
3.2.3. ELISA yöntemi.....	33
3.2.4. Western blot yöntemi.....	34
3.3. İstatistik.....	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR.....	59

III. ÖZET

***ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*'A KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN İHA, İFA VE ELISA İLE TESBİTİ VE WESTERN BLOT İLE ANTİKOR ÇEŞİTLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Sadık AKGÜN

Uzmanlık tezi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Tekin KARSLIGİL

Aralık 2008, 66 sayfa

Kistik ekinokoz, *Echinococcus granulosus*'un metasestod formunun sebep olduğu bir helminto-zoonozdur. Kistik ekinokoz'da klinik özelliklere dayanarak tanı koymak zor olmakta; tanı, görüntüleme yöntemleri ve spesifik antikor yanıtının saptanmasını amaçlayan serolojik yöntemlerle desteklenmektedir. Bu çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na Mayıs 2007-Temmuz 2008 tarihleri arasında kist hidatik ön tanısıyla gönderilen 163 hasta serolojik yönden değerlendirildi.

Hastalara ait serum örneklerinde ticari indirekt hemaglutinasyon (İHA), indirekt floresan antikor (İFA) ve enzim immuno assay kitleri ile *E. granulosus*'a karşı oluşan Ig G tipi antikorlar araştırıldı. Sonuçlar Western blot yöntemiyle doğrulandı. Buna göre toplam 163 hastanın 83'ünde (%51) İHA testi ile, 85'inde (%53) İFA testi ile, 70'inde (%42.95) ELISA testi ile pozitiflik tespit edildi. Western blot doğrulama testine göre İHA testinin duyarlılığı %88.76, özgüllüğü %94.59, İFA testinin duyarlılığı %89.89, özgüllüğü %93.24, ELISA testinin duyarlılığı %78.65, özgüllüğü %100 olarak saptandı. Western blot yöntemiyle antijenik bantlara karşı oluşan antikorlar saptanarak, bunun kistin lokalizasyonu ve biyokimyasal değerlerle ilişkisi araştırıldı.

Western blot yöntemiyle 163 serum örneği araştırıldığında, serolojik yöntemlerle (İHA, İFA, ELISA) negatif saptanan 69 örnekte herhangi bir bant saptanmazken pozitif saptanan 94 serum örneğinde ise olguların 66'sı p7 kDa bandının varlığı nedeniyle pozitif, 23'ü p7 kDa bandı olmayıp, p16/18, p24/26 ve p39 kDa bantların varlığı nedeniyle şüpheli/sınırdaki ve 5'i de sadece p39 kDa bandının varlığı nedeniyle negatif

olarak değerlendirildi. Negatif bulunan 5 örneğin dördü IHA ile beşi ise IFA yöntemi ile pozitifdi. Pozitif olarak değerlendirilen 71 olguda kist hidatik olduğu operasyonla doğrulandı. Ancak operasyonla kist hidatik saptanan 17 karaciğer ve 6 akciğer olgusunda p7 ve p16-18 kDa bantları saptanamazken diğer bantlar bulunmaktaydı. Bu olgular şüpheli pozitif olarak değerlendirildi. Oluşan bantlarla kistin lokalizasyonu ve biyokimyasal değerler arasında belirgin bir ilişki saptanamadı.

Sonuç olarak kistik ekinokokozun serolojik tanısında IFA ve IHA yöntemlerinin benzer şekilde duyarlı ve özgül olduğu, ancak ELISA yönteminin bu iki yönleme göre daha yüksek özgülüğe sahip olduğu (%100) saptandı. Bununla birlikte IHA yönteminin kullanım kolaylığı ve ucuzluğu açısından uygulanabilir olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Kistik ekinokokoz, IHA, IFA, ELISA, Western Blot

IV. ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIBODIES AGAINST *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS* USING IHA, IFA AND ELISA AND DIFFERENTIATION OF THESE ANTIBODIES BY WESTERN BLOT

Dr. Sadık AKGÜN

Residency Thesis

Department of Microbiology and Clinical Microbiology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL

December 2008, 66 Pages

Cystic echinococcosis is a helmintho-zoonosis caused by metacestode form of *Echinococcus granulosus*. The diagnosis of cystic echinococcosis is difficult by clinical features; it is supported by imaging techniques combined with serological methods that aim the determination of specific antibody response. In this study, 163 patients who referred with the suspicion of cystic echinococcosis to the Central Laboratory at Gaziantep University Şahinbey Research Hospital between May 2007 and July 2008 were evaluated serologically.

Type Ig G antibodies against *E. granulosus* in serum samples of patients were investigated by a commercial indirect hemagglutination (IHA) test, by an indirect fluorescence antibody (IFA) test, and by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results were confirmed by Western blot method. Out of 163 patients, 83 (51%) were positive with IHA, 85 (53%) were positive with IFA, and 70 (43%) were positive with ELISA. According to Western blot test, sensitivity and specificity of IHA test were 88.76% and 94.59%, respectively, for IFA sensitivity was 89.89% and specificity was 93.24%, and for ELISA sensitivity was 78.65% and specificity was 100%. Using Western blot technique, presence of antibodies against antigenic bands were determined, and their relationship to cystic localization and biochemical parameters were investigated.

As 94 out of 163 serum samples, which were positive with serological methods (IHA, IFA, ELISA) were studied with Western blot method; 66 of the cases were positive due to the presence of p7 kDa band, 23 were suspicious/intermediate due to the absence of p7 kDa band, but the presence of p16/18, p24/26 and p39 kDa bands, and 5 were negative due to the presence of p39 kDa band only. Four of these five negative cases were positive by IHA, and all of them was positive by IFA technique. Sixty-nine cases which were negative with serological methods (IHA, IFA, ELISA), were negative with Western blot also. In 71 positive cases cystic echinococcosis was confirmed with surgery. However, although in 17 hepatic and six pulmonary cases, which were surgically proven, p7 and p16-18 kDa bands were not determined, other bands were found. These cases were evaluated suspiciously positive. No relationship between the bands and cystic localization and biochemical parameters was found.

As result, IFA and IHA methods were found equally sensitive and specific in the serological diagnosis of cystic hydatidosis, but ELISA method was found more specific (100%) when compared to these two methods. In addition to that, due to its application facility and low cost, IHA method was found suitable to use.

Key words: Cystic echinococcosis, IHA, IFA, ELISA, Western Blot

V. KISALTMALAR

KE: Kistik ekinokokoz
HIV: İnsan İmmun yetmezlik virusu
IGA: İmmunoglobulin A
IgG: İmmunoglobulin G
IgM: İmmunoglobulin M
kDa: Kilo dalton
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
KFR: Kompleman fiksasyon reaksiyonu
IHA: İndirekt hemaglutinasyon yöntemi
IFA: İndirekt immunofluoresans tekniği
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
EIA: Enzyme immuno assay
LA: Latex aglutinasyon testi
IE/IEP: İmmunelektroforez
PHA: Pasif hemaglutinasyon
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
ALP: Alkali fosfataz
ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı
LDH: Laktat dehidrogenaz
DM: Diabetes mellitus
HT: Hipertansiyon
KOAİ: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
VUR: Veziko üreteral reflü

VI. TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.Hastaların cinsiyet ve IHA pozitifliğine göre dağılımı.....	38
Tablo 2.Hastaların yaşa ve IHA pozitifliğine göre dağılımı.....	39
Tablo 3.Hastaların başvurduğu üniteye (poliklinik/servis) göre dağılımı.....	40
Tablo 4.Hastalarda semptomların bulunma yüzdeleri.....	41
Tablo 5.Hastaların geldikleri coğrafi konuma göre dağılımı.....	41
Tablo 6.Hastalarda hidatik kistlerin tuttuğu organa göre dağılımı.....	42
Tablo 7.IHA test sonuçlarına göre hastaların dağılımı.....	44
Tablo 8.IHA test sonuçlarının serum dilüsyonuna göre dağılımı.....	44
Tablo 9.IFA test sonuçlarına göre hastaların dağılımı	44
Tablo 10.IFA test sonuçlarının dağılımı.....	45
Tablo 11.ELISA test sonuçlarına göre hastaların dağılımı	45
Tablo 12.Western blot test sonuçlarına ve antijen bantlarına göre dağılım.....	46
Tablo 13.Western blot testi sonucuna göre diğer testlerin dağılımı.....	46
Tablo 14.Western blot test sonuçları ile IHA yönteminin karşılaştırılması.....	47
Tablo 15.Western blot test sonuçları ile IFA yönteminin karşılaştırılması.....	47
Tablo 16.Western blot test sonuçları ile ELISA yönteminin karşılaştırılması.....	48
Tablo 17.IHA ve ELISA testlerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 18.IHA ve IFA testlerinin karşılaştırılması	48
Tablo 19.IFA ve ELISA testlerinin karşılaştırılması.....	49
Tablo 20.Operasyonla doğrulanan ve radyolojik olarak saptanan olguların testlerde pozitiflik sonucuna göre dağılımı.....	49
Tablo 21.Kistin lokalizasyonuna göre serolojik testlerin değerlendirilmesi.....	50
Tablo 22.Western blot ile saptanan antijen bantlarının diğer testlere göre dağılımı.....	50

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.Yetişkin tip (adult) <i>E. granulosus</i> ve <i>E. multilocularis</i>	7
Şekil 2. <i>Echinococcus granulosus</i> 'un (koyun tipi) yaşam çemberi.....	9

VIII. RESİM LİSTESİ

Sayfa

Resim 1.Bütün protoskoleks antijeni ile negatif preparat	32
Resim 2.Bütün protoskoleks antijeni ile pozitif preparat	32
Resim 3.Western blot testine alınan bir grup hastanın sonuç görüntüsü.....	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Giriş

Hipokrattan beri bilinen kist hidatik, özellikle tarım ve hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde sık görülen, çoğunlukla köpek dışkısı ile insana bulaşan bir sestoğ'un neden olduğu paraziter bir hastalıktır (1).

Sestoğ'lar Helmint'lerin önemli bir sınıfıdır. Serbest dönemlerinin olmaması, erişkin şekillerinin omurgalıların bağırsaklarında, larva şekillerinin omurgalı ve omurgasızların dokularında parazitlenmesi hem sağlık, hem de ekonomik açıdan önemlerini arttırmıştır (2).

Echinococcus granulosus erişkin halinde köpeklerin ve köpekgillerin ince barsağında, sulu kist denen larva halinde ise koyun, sığır gibi otçullar başta olmak üzere çeşitli memelilerin ve insanın çeşitli organlarında parazit olarak yaşamaktadır. Sulu kist veya hidatik kist yurdumuzun en önemli hastalıklarından birisidir ve bunun hemen hemen her organa yerleşme örnekleri bildirilmiştir (3).

Yaşam siklusunun iki aşamasında da segmente kurtlar veya şeritler (barsak kurtları) insanlarda hastalığa sebep olmakta, semptom ve bulguların çoğunluğu yetişkin formların yerleştiği gastrointestinal (GI) sistemden kaynaklanmaktadır. Yetişkin parazitin memelilerin değişik dokularında büyüyerek genişlemiş larval kistleri bu semptom ve bulguları oluşturmaktadır (4).

Hidatik kist, zoonotik bir enfeksiyondur. Son konak tarafından dış ortama atılan parazit yumurtalarının koyun, keçi, sığır ve insan tarafından sindirim veya solunum yolu ile alınmasıyla enfeksiyona sebep olmaktadır. *Echinococcus granulosus*'un (son

konak) köpek, kurt, tilki sırtlan ve pars gibi etçil hayvanlardır. Koyun, sığır ve insanlar ise parazitin yaşam döngüsünde arakonakçılardır..Parazitin başta karaciğer olmak üzere, akciğer, böbrek, dalak, beyin, kemik ve kalp gibi hemen her organa yerleşebildiği bildirilmiştir (5-7).

Kistik ekinokoz tüm Akdeniz ülkelerinde bölgenin en önemli parazitik hastalığı olarak halk sağlığını ve ulusal ekonomiyi etkileyerek ciddi problemler oluşturur. Akdeniz ülkelerinin hepsinde *E. granulosus* bulunur. Tunus, Güney Fransa ve Türkiye de ise *E. multilocularis* de saptanmıştır. *E. granulosus* çeşitli hayvanlarda konak olması nedeniyle daha yaygındır (5,6).

Dünyada her iklimde yaygınlık gösteren kistik ekinokoz olgusuna ülkemizde de oldukça sık rastlanmaktadır (8). Hidatik kist bulaşımında, köpeklerle yakın teması olan avcı, kasap, çiftçi ve çobanlar daha fazla risk altındadır. Ayrıca çevreye yayılan yumurtaların sindirim veya solumun yolu ile bulaşması göz önüne alınarak ayakkabı tamircileri de bu hastalık bakımından risk grubu olarak görülmüştür (9,10).

Kist hidatik tanısında çeşitli serolojik yöntemlerden yararlanılmıştır. İlk kez 1957’de indirekt hemaglutinasyon (IHA) Garabedian ve ark.(11) tarafından uygulanmış, kolay uygulanırlığı ve güvenilirliği yönünden tanıda yardımcı bir test olduğu belirtilmiştir. Daha sonra birçok araştırmacı bu testi kullanmış, %52-93 arasında değişen duyarlılığın kistin yerleşimi ve konağın biyolojik aktivitesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar ise enfeksiyonun patojenitesi ile testin duyarlılığının uyumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Diğer bir yöntem olan indirekt floresan antikor testi (IFA), etkensel tanısı zor olan parazit hastalıklarının teşhisine büyük katkı sağlayan serolojik tanı yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Uygulanışı kolay olduğu, kısa zamanda sonuç alındığı, sonuçları çok duyarlı ve spesifik bulunduğundan dolayı kist hidatik tanısında da tercih edilen bir testtir (12).

Kistik ekinokoz tanısında enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ya da enzyme immuno assay (EIA) yöntemleri de kullanılmakta olup duyarlılığının yüksek olduğu fakat *cysticercosis* ile çapraz reaksiyon verdiği bildirilmektedir (13).

Tanının doğrulanması amacıyla Western blot yönteminden yararlanılmaktadır. Bu yöntemde stripler üzerine blotlanmış bantlar bulunmakta ve enfeksiyöz etkeninin seçilmiş

proteinine karşı konakta oluşan immun yanıt belirlenmekte ve böylece oluşan antikor çeşitliliği saptanabilmektedir. Western blot tekniği, hastalıkların prognozunu anlamada diğer serolojik testlerin pek çoğuna göre daha faydalı veriler sunmaktadır (14,15).

Tanıda daha hızlı ve etkin identifikasyon yöntemleri arayışı mikrobiyolojinin öncelikli konularından birisidir. Bu bakımdan, moleküler biyolojideki gelişmelerin mikrobiyolojiye yansımaları neticesinde geliştirilen moleküler tanı metotları gün geçtikçe daha da önemli hale gelmektedir.

Bu çalışmada, kist hidatik ön tanılı serumlarda IHA, IFA ve ELISA yöntemleri ile antikor varlığı araştırılmış ve Western blot yöntemi ile bu yöntemlerin birbirine karşı üstünlüğü değerlendirilmiştir. Ayrıca Western blot tekniği ile saptanan antikorların öncelikle hangi antijenlere karşı geliştiği araştırılmış ve bunun kistin yerleşimi ve hastanın kliniği ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kistik ekinokokoz (Hydatidosis)

Kistik ekinokokoz hastalığı, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* ve *E. oligarthrus*'un oluşturduğu, daha çok hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde olmak üzere tüm dünyada görülen, sıklıkla akciğer ve karaciğerde yerleşim gösteren önemli bir zoonotik hastalıktır (16,17).

Kistik ekinokokoz insan ve hayvanların parazitik bir hastalığıdır. Bir çok ülkede insanların sahip olduğu koyun, köpek gibi hayvanlarla yakın temasları parazitin hayat zincirinin kalıcı olmasını sağlar. Kist hidatik tüm Akdeniz ülkelerinde bölgenin en önemli parazitik hastalığı olarak halk sağlığını ve ulusal ekonomiyi etkileyerek ciddi problemler oluşturur (18).

Genellikle köpeklerin bazen kurt, çakal gibi etobur hayvanların ince bağırsağında yaşayan *Echinococcus granulosus*'un yumurtaları, bu hayvanların gaitaları ile çevreye yayıldığında; koyun, sığır, deve, geyik ve insanın da dahil olduğu canlılar tarafından kontamine besinlerle alınarak embriyon yumurtadan ayrılmakta ve kan dolaşımına geçerek başta karaciğer olmak üzere akciğerler, dalak, böbrekler, pankreas gibi organlarda hidatik kist hastalığını oluşturmaktadır (19,20).

Echinococcus granulosus'un larval (metasestod) formunun insanlarda karaciğer ve akciğer başta olmak üzere birçok organa yerleşmesiyle meydana gelen hastalığa kistik ekinokokoz adı verilmektedir. Kistik ekinokokoz tüm dünyada olduğu gibi, büyük bir 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 dışkılarıyla etrafa

yayılması sonucu insanlar bu yumurtaları bulaşlı yiyecek ve içeceklerle veya köpek ile temas sonucunda ağız yoluyla alarak enfekte olurlar (21-23).

Echinococcus granulosus'un son konağı köpek, kurt, tilki gibi etçil hayvanlardır. Koyun, sığır ve insanlar ise parazitin yaşam döngüsünde ara konakçılardır. Esas konakçıların dışkıları ile saçılan yumurtalar dış ortam şartlarına oldukça dirençlidirler. Bu parazitin yumurtaları ile kontamine olmuş gıdalarla arakonakçıya bulaşır (24). Daha sonra embriyonlar barsaktan portal kan dolaşımına geçer ve sırası ile karaciğer (%50-70), akciğer (%10-30), dalak, böbrek, santral sinir sistemi, kemik ve kas dokusuna yerleşerek larval dönem olan kist formunu oluşturur (22,25).

Hidatik kist, *Echinococcus granulosus* 'un ara konağın dokularında oluşan bir larva (metasestod) evresidir. Gerek erişkin şekilleri gerekse larva şekillerinin hem evcil hem de yabani hayvanlarda bulunmaları nedeniyle hastalıkla savaş zorlaşmaktadır. Hem hastalığın tanısında önemli bir yer tutan serolojik testlerde kullanıldığından, hem aşının bileşimine girdiklerinden, hem de ajanın doğasını anlamak açısından parazitin antijenlerinin irdelenmesi de önemlidir (26).

Köpekler tarafından çevreye yayılan yumurtalar, kimyasal maddelere karşı dirençli olup kuruluğa ve ısıya karşı hassastır. Yumurtaların suda bir hafta, oda sıcaklığında bir yıl, nemli ve gölgelikli yerlerde 3-4 hafta canlılığını sürdürebildikleri saptanmıştır. Hidatik kist bulaşımında, köpekle yakın teması olan avcı, kasap, çiftçi ve çobanlar daha fazla risk altındadır. Ayrıca çevreye yayılan yumurtaların sindirim veya solumun yolu ile bulaşması da söz konusu olabilmektedir (9).

Tüm dünyada önemli bir halk sağlığı olan kistik ekinokokoz hastalığında karaciğere yerleşen kistler hızlı gelişirken akciğere yerleşen kistler çok daha yavaş geliştiğinden yıllarca hiçbir belirti vermeyebilir. (27,28).

Genel semptomlar göğüs ağrısı, öksürük, hemoptizi, uzun süren allerjik ürtiker, ödem ve dispne nöbetleri şeklinde iken, kistin belli boyutlara ulaşması veya perfore olmasıyla bronş obstrüksiyonu, atelektazi ve pnömoni gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilir (22,25,29,30).

Echinococcus granulosus'un neden olduğu kistik ekinokokoz, özellikle hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde insidansı 1-150/100 000 arasında değişebilen, ülkemizde tahmin edilen cerrahi vaka oranı yıllık 0.87-6.6/100.000 olan bir paraziter zoonozdur. Hastalık sağlık ve ekonomik yönden büyük kayıplara yol açmaktadır (30).

Kistik ekinokoz tüm dünyayı ilgilendiren zoonotik bir hastalıktır. Dünyanın değişik kesimlerinde kistik ekinokozun yıllık insidansı değişik endemik alanlarda her 1 milyonda <1'den 220'ye kadar; mortalite oranı %2 ile 4 arasında rapor edilmiştir (23,31,32).

Kistik ekinokoz, dünyada sahipsiz köpeklerin olduğu ve hayvancılık yapılan her iklim bölgesinde geniş bir yayılım gösterir. Buna örnek olarak Yugoslavya, Yunanistan, Bulgaristan, Asya'nın her bölgesi, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Orta ve Güney Amerika verilebilir (5,32).

2.1.1 Sınıflandırma

Plathelminthes (yassı helmintler) bölümünün *Cestoidea* sınıfına ait *Cestoda* alt sınıfında bulunan vücutları yassı, şerit biçimindeki helmintlerdir. Sestodların büyüklükleri farklıdır ve renkleri krem ile beyaz arasında değişir. İnsan sağlığı bakımından önemli olanlar *Cyclophyllidea* ve *Pseudophyllidea* üst takımlarındadır. Morfolojik, biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri bakımından birbirinden farklı olan her iki takımdaki helmintlerin *strobila* adı verilen vücutları yassı, şerit şeklindedir ve elastik, dirençli bir kütikula ile kaplıdır. Vücut, baş (skoleks), boyun ve halkalar (proglottis, proglottid, segment) olmak üzere üç kısımdan oluşmuştur (19).

Skoleks helminti konak bağırsağının çeperine yapıştırmaya yarayan birtakım organlar taşıyan bir şişkinlikten ibarettir. Skoleks'deki organlardan emme çekmenleri veya vantuzlar yuvarlak veya söbedir; sayıları 2 veya 4'dür. Bazen çekmenlerin yerine emme çukurları bulunur. Bunlar yarık şeklinde görülürler. Emme organlarının üzerinde yahut skoleksin tam ön ucundaki bölgede çengeller bulunabilir. Boyun, skoleksi halkalara bağlayan parçadır, bundan tomurcuklanmayla halkalar doğar (3).

Ekinokokların dört farklı türü vardır. En sık görülenleri kistik ekinokokoza neden olan *Echinococcus granulosus* ile alveoler ekinokokoza neden olan *Echinococcus multilocularis*'tir. Diğer iki tipi *Echinococcus vogeli* ve *Echinococcus oligarthrus* polikistik ekinokokoza neden olmakla birlikte, insanlarda nadiren hastalığa yol açar. En yaygın olanı *E. granulosus*'tur (17,33,34).



Şekil-1: Yetişkin tip (adult) *E. granulosus* ve *E. multilocularis*
a) *E. granulosus* (köpekten), b) *E. multilocularis* (tilkiden) (18).

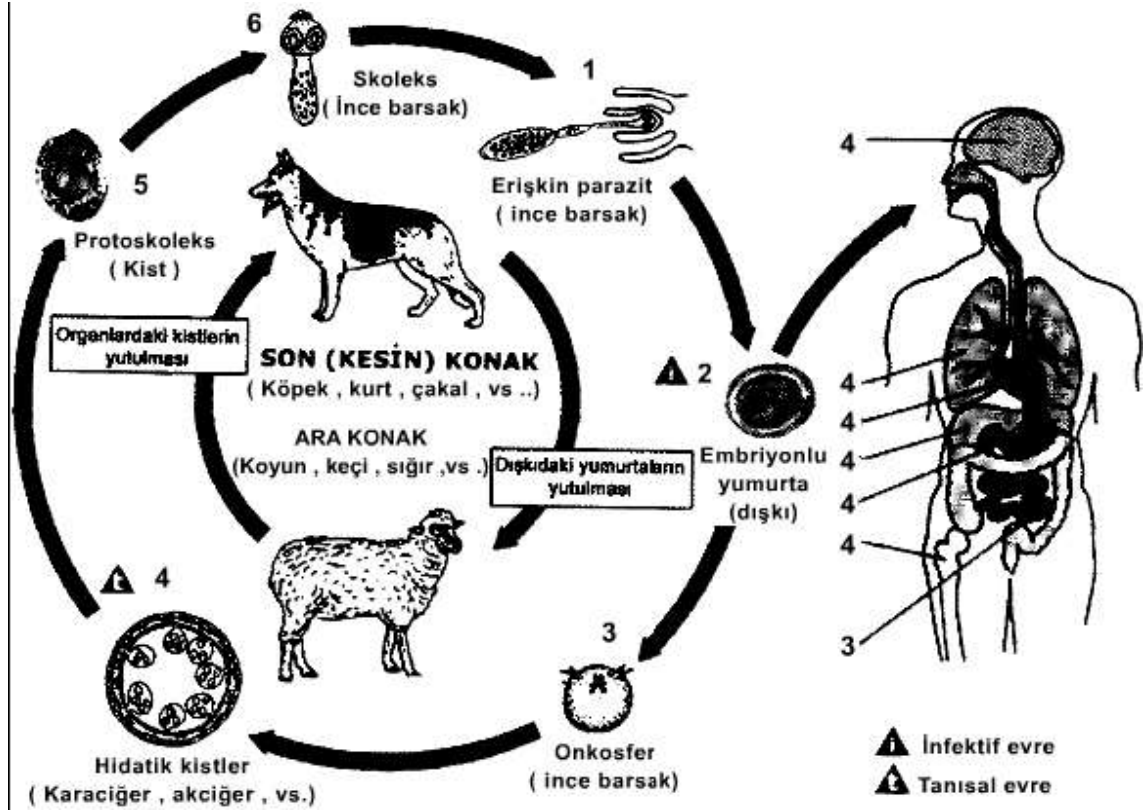
2.2 *Echinococcus granulosus*

2.2.1. Morfolojisi: *Echinococcus granulosus*, 2-6 mm uzunluğunda çok ufak bir parazit olup, boyu en az 2 mm, en fazla 9 mm, eni de 0.5 mm kadardır (Şekil 1). Vücudu çengelleri bulunan bir skoleks, boyun ve 3-4 halkadan oluşmuştur. 0.3 mm çapındaki küçük skoleksinde dört çekmen ve rostellum üzerinde iki sıra halinde 30, bazen daha fazla sayıda çengel vardır. Dar, uzunca bir boyun kısmından sonra genellikle üç, nadiren dört tane halka yer almaktadır. En büyük halka son halkadır, hayvanın boyunun yarısı kadardır. Bu halkanın döl yatağının dalları kısa ve yuvarlaktır, içinde 400-800 tane yumurta bulunur. Yumurtası 40µ kadar büyüklüğünde ve yuvarlak olup içinde embriyofor ile çevrili heksakant embriyon vardır. Embriyonlu yumurta ince kabuklu, oval 25-30 µm eninde, 32-36 µm boyundadır (3). Bunlar gebe halkanın parçalanmasıyla son konağın dışkısına geçer ve serbest kalır (19).

2.2.2. Evrimi: Hidatik kist içeren koyun, sığır gibi arakonakçı organlarının (karaciğer, akciğer gibi) son konakçılar tarafından yenilmesi sonucu skoleksler bu etçil hayvanların barsağında erişkin forma dönüşerek yaşam döngüsünü tamamlar (35). Parazitin erişkin formu köpek, kurt, çakal gibi etçil memelilerin ince barsaklarında bulunur ve hastalığa neden olmadan 3-5 ay kadar yaşar. Vücuttan kopan gebe halkalar

veya serbest kalan yumurtalar, konak dışkıyla atılır. Çevreye atılan bu yumurtalar ara konaklar için infektiftir. *E. granulosus* yumurtaları dış etkenlere karşı çok dayanıklıdır ve uzun süre canlı kalabilir.

Ara konak olarak koyun, keçi, sığır, manda, domuz, fil gibi hayvanlar sayılabilir. İnsan da ara konak olabilir. Ara konaklar tarafından yiyecek ve içeceklerle alınan *E. granulosus* yumurtası, bağırsakta açılır. Bu yumurtalardan embriyolar çıkar ve barsak duvarından geçip portal dolaşıma katılır. Lenf ve kan dolaşımı ile karaciğere gider. Buradan bütün organlara dağılabilir. İlk uğrak yerleri olan karaciğer en sık hastalık yaptıkları organdır. Zamanla gelişip, büyür, içi su dolu kese halini alır bu yapıya sulu kist veya uniloküler hidatik kist denir. Hayvan ölür ve karaciğeri tekrar bir etçil memeli tarafından yenirse parazitin hayat siklusu tamamlanmış olur. Ara konak tarafından oluşturulan sulu keseler, son konak olan köpekgiller tarafından yenmesi sonucu kese açılır. Her biri bağırsak çeperine çengelleriyle yapışır, beslenip büyür ve ortalama 10 haftada erişkin parazit halini alır. Böylece konak zinciri; köpek-geviş getirenler-köpek olarak uzanır. Zaman zaman araya insan girse de parazitin yaşam döngüsünde esas rolü köpekler ve geviş getiren diğer hayvanlar almaktadır. İnsan vücudunda larval formu yerleşir. Başta karaciğere olmak üzere çeşitli organlarda gelişip büyür. İnsan başı büyüklüğüne varabilir (36,37).



Şekil-2: *Echinococcus granulosus*'un (koyun tipi) yaşam çemberi (33).

Etken yumurtalarla, bulaş gıdaların yenmesiyle alınabileceği gibi, solunum ve cilt yoluyla da bulaşabilir. Barsakta yumurtadan çıkan embriyo (onkosfer), mukozaya tutunarak dolaşım sistemine katılır. Gastrointestinal sistemin venöz dolaşımı ve portal sistem yoluyla karaciğere geçip kist hidatiğe neden olabilir. Onkosfer burada tutunamazsa pulmoner arter yoluyla akciğerlere geçerek akciğer kist hidatiğine yol açar veya sistemik dolaşım ile diğer organlara (dalak, periton, böbrek, kemik, orbita boşluğu, beyin, kalp ve üreme organları) yayılır. Parazit ulaştığı noktalarda ya fagosit edilir ya da primer enfeksiyona neden olur (16).

2.2.3. Hidatik kistin gelişimi: Bulaşmadan 3 saat sonra onkosfer karaciğerin kılcal damarlarına ulaşır. Yaklaşık 2.5 günde burada bir yangısal nodül, 4. günde kofullaşma, 7.günde ise belirgin veziküler hidatik kist kabarcığı gelişir. Çimlenme zarının çekirdeklerinin oluşumu 10. günü bulur. Otuzuncu güne doğru ise çeperi organa ait bir reaksiyon dokusu ile sarılarak kist teşekkülü tamamlanmış olur. Böyle bir yapıda en içte germinativ kat (endojen ve ekzojen kapsüllerin geliştiği çimlenme zarı), bunun dışında

çimlenme zarının ürünü olan kütikül tabakası en dışta ise konak organizmanın oluşturduğu fibröz bağ dokudan ibaret adventisiya bulunmaktadır. Kütikül tabakası, kitine yakın saydamlıkta bir takım katmanlardan ibarettir. Beyaz renkte olan bu tabaka 1 mm kalınlığa ulaşabilir. Mukopolisakkarit yapıdaki kütikül tabakası bakteriler için filtre görevi görür. Bu yapıdan protein molekülleri kristalloidler, kolloidler, lipidler ve lesitin geçebilir. Kütikül tabakasının altındaki çimlenme zarı taneli yapıda ince bir zardır. Büyük bir tomurcuklanma yeteneğine sahip olan bu zardan çimlenme kapsülleri gelişir. Bu gelişim kist sıvısının bulunduğu içe doğru olabileceği gibi kütikül tabakaları arasından dışa doğru da olmaktadır (eksojen kapsüller). Böylece organda birden fazla kist gelişimi meydana gelir. Kistin içi kaya suyu adı verilen renksiz, saydam ve steril bir sıvı ile doludur. Kistin endojen salgı ürünü olan antijenik özellikteki bu sıvı asit ve ısıyla pıhtılaşmaz. Çimlenme kapsülleri çeperleri dışında çimlenme zarından oluşan ince bir boğumla çimlenme zarına bağlı yapılardır. İçlerinde 10-30 kadar protoskoleks gelişir. Çimlenme kapsüllerinin ince germinatif tabakadan oluşan cidarının yırtılması ile protoskoleksler kist sıvısı içine dökülür. Bu yapılara hidatik kumu adı verilir. 140-160 mikron büyüklükteki protoskoleksler içeriye çekilmiş bir skoleksi bulunduran enfektif yapılardır. Ayrıca germinatif tabakadan menşe alan yavru keseler içe ve dışarı doğru gelişim gösterirler. İçe doğru oluşan keseler çimlenme kapsüllerinden protoskolekslerden ya da çimlenme zarı adacıklarından gelişmekte olup kütikül dışında konağa ait bir adventisiya tabakası bulundurmazlar. Çimlenme zarı adacıklarından gelişen kütikül tabakaları arasından dışa doğru oluşum gösteren keseler insanda ender görülmekle beraber çift tırnaklılarda sıkça rastlanmaktadır. Bu keseler kütikül tabakasından başka ana kese gibi konağın oluşturduğu adventisiya tabakası ile de sarılmıştır. Bazı kistlerde protoskoleksler oluşmayabilir. Kemik içinde gelişen kistlerde adventisiya tabakası olmadığı gibi kütikül tabakası da çok incedir (38).

2.3. *Echinococcus alveolaris*; Tenya cinsinden bir helmint olup, alveoler kist hastalığının etkenidir. En sık (%90) karaciğer olmak üzere, birçok organı tutabilir (39). Son konağı özellikle tilki olan *Echinococcus alveolaris*'in iki ayrı türü olan *Echinococcus multilocularis* ve *Echinococcus sibiricensis*'in potansiyel ölümcül bir insan hastalığı olduğu bildirilmiştir (39, 40).

2.4. *Echinococcus multilocularis*; Erişkin *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus* ile morfolojik benzerlik gösterir. En büyük farklılık

Echinococcus multilocularis'in biraz daha kısa olmasıdır (1.5-4 mm). Bunun dışında *Echinococcus granulosus*'un uterusunun yan dalları yoktur ve testisleri daha az sayıdadır. Her iki türde de gebe halka barsak içinde parçalanır ve enfektif yumurtalar barsak içine dökülür. Bu parçalanma durumu vücut dışında da olabilir (41).

Akciğere yerleşen kistler çok daha yavaş geliştiğinden yıllarca hiçbir belirti vermeyebilir. Genel semptomlar göğüs ağrısı, öksürük, hemoptizi, uzun süren allerjik ürtiker, ödem ve dispne nöbetleri şeklinde iken, kistin belli boyutlara ulaşması veya perfore olmasıyla bronş obstrüksiyonu, atelektazi ve pnömoni gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (30).

E.granulosus ve *E.multilocularis* metasetotları nadiren kemiricilerde latent bir peryot sonrası yeniden gelişebilir (42).

2.5. Patogenezi

Kistik ekinokokoz insanda yerleştiği organda çok yavaş gelişir. Bu gelişme 10-20 yıl sürebilir. Buna rağmen çift tırnaklılardaki gelişimi için 3-6 aylık bir süre yeterlidir. Hidatik kist insanda et tüketiminin fazla olduğu ülkelerde %70 oranında karaciğerde, %20 oranında akciğerde ve %10 oranında ise diğer organlara yerleştiği halde, daha çok bitkisel ürünlerle beslenen toplumlarda %55 oranında karaciğerde, %35 oranında akciğerde ve %10 oranında ise diğer organlara yerleşir (38).

Echinococcus granulosus'un kurtçuk şekli olan *Echinococcus hydatidosus* insanda yerleşmiş olduğu dokularda iltihap oluşmasına neden olur. Kesenin etrafında endotel hücre infiltrasyonu vardır. Bunu fibroblast, yeni gelişen kan damarları ve lifli bir dokudan ibaret bir tabaka sarmıştır. Genellikle yumurtanın alınmasıyla vücutta bir tek kist oluşur ki buna **birincil kist** denir. Bunun parçalanması sonucu içindeki yavru kistler değişik yollardan periton, plevra, dalak, karaciğer, akciğer gibi çeşitli organ ve dokulara ulaşabilirler, sayıları birçok olabilen bu kistlere de **ikincil kistler** denir (3,19).

Hidatik kistin et tüketimi ile ilişkisi; etle beslenmede aminoasitlerin karaciğerde parçalanması sürecinde kılcal venlerde kan dolaşımının yavaşlaması ve embriyonun bu organa tutunabilme şansının daha fazla olması şeklinde açıklanabilir.

Kistik ekinokokoz patojen etkisi kistten sızan sıvının birtakım allerjik reaksiyonlara sebep olması, hacim büyümesi ve komplikasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Hacim büyümesi ile bulunduğu organın fonksiyonlarını ve beslenmesini engellediği gibi

aynı etkiyi basınç yaptığı komşu organ ve dokularda da gösterir. Komplikasyonları 3 yönlü olarak ortaya çıkar.

a-Kist çeperi yırtılarak yavru vezikül ve protoskoleksler çevre dokulara yayılır. Örneğin; karaciğer kisti yırtılırsa periton boşluğuna, akciğer kisti yırtılırsa çevre alveollere ve plevra boşluğuna geçer. Hatta bu vezikül bronş yolundan dışarı atılabilir.

b-Kistin yırtılması ve kan damarlarının açılmasıyla skoleksler değişik organlara taşınarak metastazlara yol açtığı gibi damarların da tıkanmasına sebep olur (tromboz ve emboliler).

c-Ameliyat sırasında kist çeperinin yırtılması hidatik kistin en ciddi komplikasyonuna yol açar. Kuvvetli antijenik özellikteki, kaya suyu adı verilen kist sıvısı vücutta şiddetli bir tepkiye yol açarak hastanın ölümüne sebep olabilir (anaflaktik şok). Ayrıca protoskoleksler de çevre dokulara yayılır (38).

2.6. İmmunolojik Yanıt

Hidatik kiste karşı sıvısal ve hücresele immün yanıt verilebilmekle beraber parazitin immünolojik kontrolünde esas rolü T lenfositler oynamakta; T lenfositler, makrofaj ve nötrofil lökositleri metasetodlara saldırmak için programlamaktadır (26,43). T lenfositleri bu koordinatör rolü dışında ekinokok metasetodlarına doğrudan toksik etki de gösterebilmektedir (26,44). Kist hidatik aynı zamanda konakçıda poliklonal B hücre aktivasyonuna yol açarak değişik sınıflarda (IgG, IgM, IgA ve IgE) antikorların oluşumuna yol açmaktadır (45,46). Bu antikor sınıflarından hangisinin enfeksiyondan sonra ilk belirlediği bilinmese de IgG antikor yanıtı, IgM ve IgA yanıtlarına göre daha sık görülmektedir. Akciğer kist hidatikli hastalarda cerrahi rezeksiyon sonrası anti-ekinokok IgM düzeyleri 4-6 ay içinde, karaciğer kist hidatiklilerde ise 12 ay içinde normale dönerken IgG antikorları serumda daha uzun süre yüksek düzeyde kalmaktadır (46,47). *Echinococcus granulosus* antijenlerine karşı verilen IgG antikor yanıtı özellikle IgG1 ve IgG4 'ü ilgilendirmektedir. IgG1 ve IgE antiparaziter immün yanıtta önemli rol oynayan antikorlardır (48,49).

Echinococcus granulosus'un erişkin ve larva şekilleri arasında antijenler bakımından ayrılıklar vardır. Bu sestodun larva şeklinin antijenleri üzerinde oldukça çalışılmıştır. Hidatik kist sıvısı, protoskoleksler ve kütikülde birçok antijen

bulunmaktadır. Hidatik kist antijenlerinin konak kanında bulunduğu gösterilmektedir. Bu antijenlerden antijen 5 oldukça iyi bağışıklık vericidir. Bu antijen çimlenme zarında ve protoskolekslerin parankiminde ve çıkartı sisteminde bulunur. Bir başka antijen de B antijendir: bu da bir lipoprotein'dir. 100°C de 15 dakika ısıtılmağa dayanmaktadır. B antijeni dış kütükülde, çimlenme kapsülünde protoskolekslerin dış örtüsünde bulunmektedir. Isıya dayanıklı iki antijen daha vardır ki bunlar *Taenia saginata*, *Fasciola hepatica* ve *Schistosoma mansoni* ile de ortak reaksiyonlara yol açmaktadır. Hidatik kist sıvısında konağa özgül albumin ve globulin ayrıca bazı kistlerde immunoglobulinler bulunmektedir. Ayrıca sıvının içindeki ABO antijeni, Forsman antijeni gibi konakla ortak olabilen antijen faktörleri de vardır. Onkosferin sindirim sıvılarının, dokuların ve serumun öldürücü etkisinden kendini kurtarabilmesi gerekir. Normal serumla protoskolekslerin erimesinde konağın komplemanının etkisi vardır. Kompleman, sıvının bazı maddesiyle aktif hale gelir ve kistin içinde çimlenme zarını etkiler. Komplement kistten dışarı sızan sıvıyla oluşan anafilakside de rol oynar. Hidatik kistin etrafında oluşan fibröz tabaka konağın tepkisi ürünüdür. Hidatidoz sırasında yeni enfeksiyona karşı koyan bir bağışıklık gelişmektedir. Bu bağışıklıkta özellikle larvanın katı kısımlarının etkisi vardır (3,26).

İmmünize tavşan serumunda *E. granulosus* için 23 ve *E. multilocularis* için 27 farklı antijenik komponent olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber dikkatler kist sıvısı ve protoskolekslerde bulunan iki majör lipoproteinde yoğunlaşmıştır. Antijen 5, çimlenme zarında, protoskolekslerin parankiminde ve boşaltım sistemlerinde bulunur. (26,50,51).

Yapılan çeşitli çalışmalarda kist sıvı antijenlerinin aynı bölgede çok belirgin bir presipitasyon bandı verdiğini gözlemişler ve "Arc5" fenomeninden sorumlu antijenin adı böylece antijen 5 olmuştur. Antijen 5, molekül ağırlıkları 37-38 kDa ve 20-24 kDa olan iki alt ünitelerden oluşmaktadır. Enfeksiyondan sonra ilk saptanabilir düzeye ulaşan antikorlardan biri de antijen 5'e yönelik antikorlardır. Kist hidatikli olguların %74'ünde, alveoler ekinokokkozis olanların %58 'inde immünoelektroforezde Arc5 bandı gözlenmiştir. Antijen 5'e yönelik antikorların alveoler ekinokokkozis dışında nörosistiserkozis olgularında da gözlenmesi bu antijenin diğer Ekinokok türleri dışında *Taenia solium* tarafından da üretilebileceğini göstermektedir. Normal insan serumunda

veya diğ er parazit enfeksiyonu olanların serumunda antijen 5 'i bağlayan antikorlar olsa da bunlar imm unoelektroforezde Arc5 bandını oluşturamazlar (26,52-54).

Antijen B, molekül ağırlıkları 8-12 kDa, 16 kDa ve 23-24 kDa olan üç alt üniteden oluşmaktadır. Antijen B, antijen 5'e göre daha az imm unoreaktiftir. Önceleri antijen B'nin *E. granulosus* için spesifik olduğu sanılmış fakat daha sonra *E. multilocularis* ve *Schistosoma* türlerince de ekspresse edilebileceği anlaşılmıştır. Bununla beraber (sds-page) ve imm unoblotting gibi ileri teknikler ile yapılan çalışmalar antijen B'nin en küçük alt ünitesinin (8 kDa) ekinokok türüne özgü olduğunu göstermektedir (23,26, 54-56).

Koyun, keçi, domuz ve insan kökenli hidatik kist sıvılarında molekül ağırlıkları 8-116 kDa arasında değişen en az 15 protein fraksiyonu olduğu, ancak bu fraksiyonlardan 8 kDa ve 116 kDa 'luk fraksiyonlara sadece operasyonla kist hidatik olduğu ispatlanmış olgularda rastlandığı bildirilmiştir. Diğer fraksiyonlar ise başka bir parazit enfeksiyonlu hasta serumlarıyla çapraz reaksiyon vermiştir. Kist hidatik tanısında kullanılan serolojik testler ortak antijenler nedeniyle, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Toxocara canis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Oncocerca volvulus*, *Plasmodium* enfeksiyonlarında yanlış pozitiflik verebilir. En fazla yanlış pozitiflik oranı *Taenia* türlerinde olmakla beraber bu enfeksiyonların %3-6 kadarında hidatidoz serolojisi pozitif çıkmaktadır. Bu yanlış pozitifliklerden başlıca disülfid köprüsüyle birbirine bağlanan 38 kDa ve 20 kDa'lık bir molekül sorumludur (26,57-60).

Serolojik testlerde kullanılan antijenler, evcil hayvanlardaki fertil kist hidatik sıvısından soyutlanmaktadır. Bununla beraber kist sıvısında sadece parazit kökenli materyal değil aynı zamanda konakçının serum komponentleri de bulunmaktadır. Konakçı kökenli protein ve antikorlar ise yanlış negatiflik ve pozitifliğin bir başka nedenidir. P1 antijeni hem kist sıvısında hem de kanserli hastaların serumunda bulunabilen bir antijendir. Yapılan bir araştırmada 200 sağlıklı bireyin birinde ve 270 kanserli hastanın ise 17 'sinde (% 6.3) kist hidatik serolojisi pozitif çıkmıştır. Hodgkin hastalığı, lenfoma, lösemi, multipl myelom, akciğer kanseri ve hepatosellüler karsinom yanlış pozitifliğin bildirildiği kanser tipleridir. Bununla beraber tüberküloz, siroz ve kollagen doku hastalıkları seyrinde de yanlış pozitiflik görülebilmektedir (26).

2.7. Klinik

Kistik ekinokokoz kapladığı yere bağlı olarak bir tümör gibi hastalık belirtilerine neden olur. Ağrı sık rastlanan bir şikayettir. Karaciğerin tutulduğu vakalarda sarılık, basınçtan ileri gelen nekroz; akciğerdeki yerleşmede öksürük, dispne, hemoptizi ve taşikardi şikayetleri vardır. Bunların yanında, kist sıvısının neden olduğu, döküntüler, eozinofili (%25 vakada) gibi aşırı duyarlılık belirtileri görülebilir. Kuluçka devri 15-20 yıl kadar uzundur (19).

Kistik ekinokokoz enfeksiyonu bazen hiç belirti vermeyebilir; fakat bazen bir takım belirtilerle ortaya çıkar. Bunları genel ve yerel olarak ikiye ayırabiliriz:

Genel belirtiler: Belli başlıları kaşıntı nöbetleri, kanda eozinofili, çocuklarda büyümenin yavaşlamasıdır. Çocuklardaki bu bulgulara Deve'nin infantilisme hydatique'i denmektedir.

Yerel belirtiler: Bunlar karaciğerde, peritonda, ürogenital organlarda, dalakta, sinir sisteminde, kalpte, damarlarda, kemiklerde (çok boşluklu), deride, pankreasta bulunan ve büyüyen kistik bir ürünün ortaya çıkarttığı belirtilerden ibarettir (3).

Karaciğere yerleşen kistler çoğunlukla safra yollarını sarar ve safra akımını engeller. Bu şekle bilier form (forme biliaire) denir. Hastada bulantı, kusma, birden bire gelen karın ağrıları vardır. Ateş bazen 40-41°C'yi bulabilir. Palpasyonda ağrı vardır, perküsyonla kistin büyüklüğü saptanır. Parankime yerleşen kistler ur özelliği gösterir. Bu şekil ise tümöral form (forme tumorale) adını alır. Çoğunlukla ön lobda saptanır. Kist, sağ hipokondriumda belirgin bir şişlik gösterir. Perküsyonla çıkan sesin (matite) alanı kistin büyüklüğünü gösterir. Bel, sırt ve omuza vuran ağrılar vardır. Karaciğerin üst lobuna yerleşen kistler uzun süre gizli kalır. Diyafragmayı yukarı iterek akciğere basınç yapar. Bunun sonucu soluma güçlüğü ve öksürük dikkati çeker. Karaciğerin arka lobuna ise yerleşim çok seyrek. Karaciğerin ortasına yerleşen kistler, vena porta üzerine basınç yaparak asit'e (ascites) yol açar (29,38,61).

2.8. Tanı

İmmünodiagnostik tetkikler için antijenik materyalin kaynağı, *E.granulosus* hidatik kist sıvısıdır. Bununla birlikte mevcut testlerle ilgili olarak duyarlılık ve özgüllüklerindeki eksiklik ve kullanış standardizasyonu ile ilişkili güçlükler de

vardır. Bilinen diğer sestodların ve diğer parazitlerin antijenlerine karşı çapraz reaksiyon, hidatik kist immünolojik tanısında major bir problemdir (32,34).

Kistik ekinokokoz hastalığında parazitolojik tanı; ameliyat, ekspektorasyon, ince iğne biyopsisi gibi yollarla elde edilen kist sıvılarında kroşe ve skolekslerin mikroskop ile, kist membranlarının histolojik yapısının makroskobik ve mikroskobik muayenesi ile olmaktadır (62).

Bununla beraber kist hidatik içinde her zaman kız kistler gibi özgün histolojik materyaller olmayabilmektedir. Steril kist adı verilen bu durum özellikle sığırlarda sık görülmekte ve tüm kistlerin % 90'ını oluşturabilmektedir. Ancak bu durumda steril kistin duvarı histolojik olarak incelenirse yine hidatik kiste özgü olan endokist-egzokist ve perikist tabakaları gözlenmektedir. Diğer yandan bazı olgularda kist duvarının da dejenere olduğu bilinmektedir (63).

2.8.1. Casoni cilt testi: İlk kez 1912 yılında Casoni tarafından kullanılan Casoni cilt testinde derinin içine insan veya hayvan orijinli steril kist sıvısı verilmektedir. Her ne kadar bazı araştırmacılar kist hidatik olgularının %85-95 'inde Casoni testini pozitif bulduklarını bildirseler de bu intradermal test olguların %56-65 'inde pozitif çıkmaktadır. Akciğer kistlerinde ise Casoni pozitifliği %50 civarındadır. Bununla beraber Casoni test sonuçlarının değeri düşüktür. Çünkü testte kullanılan antijenin yüksek azot ve protein konsantrasyonuna sahip oluşu ve kan grubu maddelerinden zenginliği nedeniyle %30-40' a varan yalancı pozitiflikler ile karşılaşmaktadır. Her ne kadar erken cilt reaksiyonunun geç reaksiyondan daha duyarlı olduğu söylenmiş olsa da erken reaksiyonun mu yoksa geç reaksiyonun mu mevcut enfeksiyonu gösterdiği net değildir. Bunlara ek olarak kistin lokalizasyonuna göre Casoni testinin duyarlılığı değişmektedir. Mesela periton hidatidozunda duyarsız olduğu ifade edilmektedir. Diğer yandan Casoni testinde enjekte edilen antijen kişiyi duyarlı hale getirebilir ve bu kişi sonraki serolojik testlere yalancı pozitif yanıt verebilir (33).

2.8.2. Serolojik tanı yöntemleri:

Bu parazit hastalığının etkensel tanısının (akciğerlerde bulunan bir kistin patlaması sonucunda meydana gelen hidatik kusma materyalinin incelenmesi sonucunda yapılabilir) bazı olağan dışı durumlar haricinde yapılması imkansız gibidir. Kiste panksiyon yapılarak etkensel tanı gerçekleştirilebilir ancak, bu işlemten sonra

sızabilecek kist sıvısının anaflaktik bir şok veya kist dışına çıkabilecek protoskolekslerin sekonder kistleri oluşturma riskleri mevcuttur. Etkensel tanıdaki zorluklar *cystic echinococcosis*'de serolojik tanının önemini arttırmıştır (12).

Belirgin bir klinik tablonun olmaması ve yukarıdaki nedenlerden dolayı araştırmacılar kist hidatik tanısında serolojik testlere yönelmişlerdir. Serolojik testler sadece hasta olguları saptamak için kullanılmaz; asemptomatik kist taşıyıcılarının belirlenmesinde, hastalığın toplumdaki yaygınlığını ve varsa bir kontrol programının etkinliğini göstermek amacıyla da kullanılabilir (64).

Kistik ekinokoz 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 (21).

Buna ek olarak serolojik testler, olguların tedaviye verdikleri yanıtın izlenmesinde pahalı radyolojik tetkiklerin yerine kullanılabilir. Cerrahi sonrası küçük bir kist gizli kalmış olabilir veya cerrahi esnasında sekonder enfeksiyon gelişmiş olabilir. Diğer yandan ekinokok suşu kemoterapiye dirençli olabilir (65).

2.8.2.1. Kistik ekinokoz tanısında kompleman fiksasyon reaksiyonu (KFR):

Spesifik antikorla antijenin birleşmesi sonucu serbest komplemanı absorbe etme özelliği göstermektedir. Reaksiyon sonucunun kolay görülür hale konması için özel indikatör sisteminden (%3 koyun eritrosit süspansiyonu ve hemolitik amboseptör) yararlanılmaktadır. Böylece Kistik ekinokoz tanısında yararlanılan bir yöntem şekline konularak, antijen olarak hidatik sıvı, scoleks veya membran dokuları kullanılmaktadır. Ancak içinde scoleks olan kist sıvısının antijen olarak daha duyarlı olduğu, buna karşın yalancı olumlu sonuçların da alınabileceği unutulmamalıdır. Bu yalancı olumlu sonuçların yüksek serum gamma globulin seviyesi ile ilgili olabileceği bildirilmektedir. Kuman (11) tüm kist hidatik olgularında KFR ile olguların çoğunluğunda 1/320-1/640 sulandırılma kadar olumlu sonuç almasına karşın, 1/1280 sulandırılma kadar da olumlu sonuç veren olgular gözlemiştir. Olguların bir kısmında karaciğer sintigrafisi ve ultrasonografisi ile kistik oluşum görüntüsü saptanmış ve tümü operasyonla

doğrulanmıştır. Bugün çok daha hassas tanı yöntemleri bulunduğundan kist hidatik tanısında Weinberg KFR hemen hemen terk edilmiştir (66).

2.8.2.2. Kistik ekinokoz tanısında IHA yöntemi: Testte tannik asitle duyarlılaştırılmış eritrositlerin yüzey gerilimlerinin değişmesi sonucu antijen tutma özelliklerinden yararlanılmaktadır. Antijen ile kaplı koyun eritrositleri hasta serumuyla karşılaşınca çökmektedir. Testin duyarlılığı genellikle %80-94 arasında değişmektedir. Kistin lokalizasyonuna göre antikor yanıtının değiştiği, akciğer kistlerinde serolojik testlerin duyarlılıklarının azaldığı bilinmektedir. Akciğer kistlerinde görülen düşük seropozitivitenin bir nedeni immün kompleksler olabilir. Bir çalışmada karaciğer kistli hastalarda IHA %75 pozitif çıkmış ve %12'sinde immün kompleks tespit edilmiş iken akciğer kistlerinin %42 'sinde IHA pozitif çıkmış ve %50 'sinde immün komplekslere rastlanmıştır (33).

IHA 1/32 serum sulandırımı üzeri pozitif kabul edildiğinde, benzidin ve formollü IHA testleri ile Hidatik serumlarda en yüksek sulandırımarda dahi olumlu sonuç alındığı ve en hassas test olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır. Buna karşın bu yöntemle hidatidoz olmayan hasta serumlarında da, sağlıklı insan serumlarında da çok yüksek oranda çapraz reaksiyon saptandığı bildirilmektedir. Tannik asit ve glutraldehit'le hassaslaştırılmış alyuvar kullanılan IHA testlerinde diğer testlerin tersine kist hidatik olgularında daha düşük oranda pozitif sonuçlar alınmasına karşın, diğer parazit hastalıkları ve parazit dışı hastalıklar ve sağlıklı kişilerin serumlarında nonspesifik reaksiyonlara çok düşük oranda rastlanılmıştır. Kistik ekinokoz tanısında en hassas IHA yöntemi olarak da Tannik asitin kullanıldığı IHA testi bulunmuştur. Benzidin'in karsinojen oluşu dezavantajını artırmakta, Tannik asit yönteminin Formol testinden daha basit uygulanması nedeni ile kistik ekinokoz için en uygun uygulama yöntemi olduğu kanısına varılmıştır (11).

2.8.2.3. Kistik ekinokoz tanısında IFA: Floresan izosiyanat, veya Rodamin B200 gibi floresan verici maddelerle işaretlenmiş antikor, antijen ile bağlanınca floresan mikroskop altında görülebilir hale gelmektedir. Pozitif preparatlar sarı-yeşil fluoresans vermektedir. Kistik ekinokoz tanısında IFA yöntemini ilk kez 1964 yılında Azevedo ve Rombert kullanmıştır. Testin duyarlılığı %90-98, özgüllüğü %95-98

civarındadır. Akciğer yerleşimli kistlerde duyarlılık %81, karaciğer kistlerinde ise %90 bulunmuştur (33).

Antijenler genellikle mezbahalardan temin edilen (özellikle hastalıklı koyun karaciğerlerinden izole edilen) fertil kistler içindeki protoskolekslerden (hidatik kum) hazırlanmaktadır. Kist içine yapılan ponksiyonla kist sıvısıyla birlikte çekilen protoskoleksler, kist sıvısının santrifüj edilmesiyle sedimentte toplanmakta ve üst kısmın atılmasıyla kist sıvısından ayrılmaktadır. Daha sonra 2-3 kez fizyolojik su ile yıkanan protoskolekslerden mililitrede 4000 veya 6000 adet bulunacak şekilde bir suspansiyon hazırlanmaktadır. Bu suspansiyondan pastör pipeti ile alınarak özel boyalı lamlar üzerindeki çukurlara doğrudan birer damla konup laboratuvar ısısında kurutulmaktadır. Bu şekilde hazırlanan antijenler -20°C'de 6 ay kadar saklanabilmektedir. Bu antijenler %10'luk formaldehitte tesbit edildikten sonra veya hiç tesbit edilmeden IFA yönteminde kullanılabilmektedir (12,33).

Protoskolekslerden kesit antijenlerin hazırlanabileceği de gösterilmiştir. Yukarıdaki gibi kist sıvısından izole edilen protoskoleksler, alüminyum bir kağıt üzerine konmakta ve kenar kısmından bir filtre kağıdı ile suyu alınarak küme haline getirilmektedir. Küme haline getirilen protoskoleksler, içinde bloklama solüsyonu bulunan plastik bir kapsül içine daldırıldıktan sonra kuru buz veya sıvı azot içinde dondurularak saklanabilmekte ve gerektiğinde çıkarılıp kriyostat ile 4-6 µm kalınlığında kesitler alınıp lamlar üzerine fikse edilerek kesit antijen olarak kullanılmaktadır. Kesit antijenler ile çalışılan IFA testinden daha iyi sonuçlar alındığı ve test sırasında Evans blue ile zıt boyamadan yararlanılabileceği bildirilmektedir (12,21,33).

Testin spesiflik limitinin 1/10 veya 1/20 olabileceğinin bir çok araştırmacı tarafından kabul edildiği görülmekle birlikte karaciğerde lokalize olan kistlerde, IFA yönteminin olguların %95'ini doğru tesbit ettiği ve yüksek pozitiflikler verdiği, pozitif olguların %25'inde ise pozitiflik değerinin 1/40'ın altında kaldığı, bu zayıf pozitif sonuçların diğer yöntemlerle doğrulanması gerektiği ileri sürülmektedir. Akciğerlerde yerleşen kistlerde IFA yönteminin yaklaşık %66 doğru pozitiflik verdiği ve pozitiflik düzeyinin 1/80'i nadiren geçtiği, bu durumun ise testin sonuçlarının yorumlanmasını güçleştirdiği bildirilmiş ve sonuçların kistin gelişimi veya prognozu ile ilgili temeller üzerine oturtulmasının doğru olmayacağı açıklanmıştır (12,21).

Cerrahi tedaviden sonra 4-6 hafta boyunca antikor seviyesinde başlangıca göre 4-5 kat artmalar olduğu ancak bu artışın nedeninin henüz açıklanamadığı, *Schistosoma* ve *Fasciola* tedavisinden sonra antikor artışını açıklayan oluşumların, kist tamamen çıkarıldığı için burada geçerli olmadığı bildirilmektedir (12).

2.8.2.4. Kistik ekinokoz tanısında ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), parazit hastalıklarının etkenlerinin direkt olarak görülemediği veya görülmesinin zor olduğu zamanlarda bu hastalıkların tanısının yapılabilmesi için uygulanmakta olan serolojik tanı yöntemlerinden birisidir. Bu yöntem enzim immün assay (EIA) olarak da adlandırılır. Esas olarak oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Kimyasal bir olay olan renk oluşumu enzimin aktivitesine bağlıdır. Enzimle etkilenen substratın spektrofotometrik ölçümü, yöntemde araştırılması gereken antijen ya da antikor konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu teknik genellikle, viral, bakteriyel ve parazitlere ait antijenler ile antikorlar gibi büyük molekül ağırlıklı proteinlerin ölçümü ve araştırılması için kullanılmaktadır. Yöntemin avantajları; çok duyarlı ve güvenilir olması, kolay uygulanması, işaretli immün ayıracıların uzun süre saklanabilmesi, radyoizotopların kullanımı sonrası atıkların yok edilmesi önleminin gerekmemesi ve enzim işaretleri ile kromojenik substrat kullanılarak görülebilir ve okunabilir sonuçlar vermesi sayılabilir. Buna karşın, özel bazı cihazlara gereksinim duyulması, deneyimli personelin gerekmesi ve pahalı olması da bu yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir (13).

ELISA testinde polistren plaklara emdirilmiş antijen molekülleri ve antiimmünoglobulin eklenmiş renksiz enzimin bulunduğu ortama hasta serumu dökülür. Serumda antikor varsa antijen-antikor-anti-immünoglobulin kompleksi oluşur ve enzim kromojen madde bağlı substratı ile birleşir. Test spektrofotometre ile değerlendirildiğinde absorbans ölçümleri kriter alınır ve belli bir eşik değerin (cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilir. ELISA sonucu çıplak gözle de değerlendirilebilir. Oluşan renk, optik dansite değerleri ile irdelenir. Optik dansite değerleri pratikte antikor konsantrasyonunun belirlenmesinde de kullanılabilir. Mesela IgG ELISA testinde anti-insan IgG antikorlarına bağlı enzim alkalen fosfataz ise substratı olan renksiz nitrofenol fosfatı sarı renkli nitrofenoksite çevirecektir. Ülkemizde yapılan

çalışmalarda *E. granulosus* IgG-ELISA 'nın özgüllüğü %86-100 olarak belirlenmiştir. IgG ELISA son derece özgün bir test olmasına karşın duyarlılığı konusunda %72-76 gibi düşük oranlar yanında %94-100 oranlarını bildirenler de vardır (21,29,33). Hasta olguları IgG ELISA'nın yakalayamamasının nedeni kaliteli antijenlerin kullanılmaması olabilir. Saflaştırılmış ekinokok antijenlerinin kullanıldığı ELISA testlerinin duyarlılığı yüksek iken işlenmemiş kist hidatik sıvısı kullanıldığında bu oran %45'e kadar düşmektedir. Bu kadar düşük oranların nedeni anti-immünoglobuline konjuge edilen enzimin kötü kalitesi de olabilir (33).

Echinococcus granulosus ve *Echinococcus multilocularis*'in tanısında bu yöntemin ancak çok iyi bir şekilde saf bir antijen hazırlandıktan sonra tercih edildiği ve duyarlılığın %100'e yakın olduğu fakat cysticercosis ile çapraz reaksiyon verdiği, özellikle yüksek seviyede IgE antikorlarının varlığının hastalık tanısının konmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (13).

2.8.2.5. İmmundifüzyon ve immunelektroforez: Kistik ekinokokoz olgularında IE yöntemiyle daima aynı bölgede ve karakterde çok belirgin presipitasyon çizgisinin kist sıvısı içindeki belli bir antijen yapısı tarafından oluşturulduğu ve bu antijene arc 5 adının verildiği birçok araştırmacı tarafından yayınlanmıştır. Arc 5 antijeni presipitasyon çizgisinin kist hidatik tanısındaki önemine değinen araştırmacılar, saflaştırılmış ve yoğunlaştırılmış kist sıvısı antijeniyle kist hidatik tanısında %90 oranına kadar pozitif sonuçlar alınabileceğini bildirmektedirler (67).

Testte bir jelin içine optimal konsantrasyonlarda antijen ve antikor molekülleri konulur. Antijen, antikor ile karşılaştığında çökerek presipitasyon bandı oluşturur. Testte hasta serumuyla karşılaşan kist sıvısı antijenlerinin hep aynı bölgede çok belirgin bir presipitasyon bandını oluşturduğu görülmüş, bu banda "Arc5" ve bunu yapan antijene de "Antijen 5" adı verilmiştir. Önceleri testin kist hidatiğe özgün olduğu sanılmış ama daha sonra *Taenia* enfeksiyonlarında da pozitif çıkabileceği anlaşılmıştır. Bununla beraber testin özgüllüğü %97'nin üzerindedir. Duyarlılığı ise %26-51 arasında değişmektedir. Bazı araştırmacılar ise "Arc5" görülmedikçe testin pek bir özgüllüğü olmadığını, uygulanmasının kolay olmadığını belirtmektedirler (33).

IE yöntemiyle kistik ekinokokoz tanısında elde edilen sonuçların her zaman aynı oranda sonuç vermemesi ve diğer testlerle paralel değerlerin elde edilememesi, kullanılan

antijenin standart olmamasına bağlı olmakla beraber, kistin lokalizasyonunun da sonuçları etkilediği gösterilmiştir.

Araştırmacılar IE yönteminde tüm kist sıvısını antijen olarak denedikleri gibi, daha duyarlı sonuçların alınması için bu antijenin saflaştırılması veya liyofilizasyonla yoğunlaştırılmasıyla (200 mg/ml) daha güvenli sonuçların alınabileceğini açıklamışlardır (67).

2.8.2.6. Western blot (Immunoblotting):

Ayrıştırılan proteinlerin jellerden membranlara transfer yöntemlerinin geliştirilmesi, proteinlerin elektroforetik analizi için yeni bir devir açılmasına neden olmuştur. Bu fikir DNA fragmentlerini analiz için bir yöntem geliştiren Ed Southern tarafından ortaya atılmıştır. Immunoblotting ya da Western blotting adı verilen bu immunokimyasal yöntemler bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada kullanılmaktadır. Bu transfer yöntemi “blotting” diye adlandırılır, çünkü elektroforez ile jel içinde ayrıştırılan proteinlerin transfer edildikleri nitroselüloz membran üzerindeki bant örnekleri, orijinal jel üzerindeki örneklerin tam anlamıyla kopyasıdır. Proteinlerin membranlara transferi de “Western blotting”, DNA izolasyonu için kullanılan yöntem “Southern blotting”, RNA izolasyonu için kullanılan yöntem ise “Northern blotting” olarak isimlendirilmiştir. Orijinal jel ile çalışmak yerine Western blot ile çalışmanın pek çok avantajı vardır. Immunoblotting iki aşamada gerçekleştirilmektedir: proteinin jelden nitroselüloz membrana transfer edilmesi ve spesifik antikor ile epitopun dekorasyonu. Proteinin transferi en başarılı şekilde elektroforez ile gerçekleştirilmektedir. Genellikle en fazla kullanılan iki transfer yöntemi vardır. Biri yarı-kurutma ile blotting (Semi-dry blotting) yöntemi olup jel ve immobilize edilmiş membran, buffer ile ıslatılmış filtre kağıtları içinde tutularak 10-30 dak. akım geçirilmesidir. Diğeri ise ıslak (tank) blotting (Wet blotting) yöntemi olup jel-membran sandwich sisteminin elektrotransfer için transfer buffer içine konularak en az 45 dakika ya da tüm gece boyunca transfer işleminin devam etmesidir. Birinci aşaması olan SDS-PAGE ile elektroforeze tabi tutulan proteinler transfere hazır hale gelirler. Bu aşamadan sonra uygulanacak olan Western blot yönteminin ana hatlarını önce seperasyona tabi tutulan proteinlerin nitroselüloza (ya da naylon veya benzeri materyallere) transfer edilmesi ve non-spesifik bağlanmayı önlemek için membran

üzerindeki protein bağlanma kısmının bloke edilmesi (blocking) ardından transfer edilmiş ilgili proteine spesifik antikorun bağlanması ve birinci antikora, enzim işaretli ikinci antikorun bağlanması son olarak enzim bağlı kompleksin membrana uygun enzim-substrat solüsyonu uygulanarak gösterilmesi şeklinde sıralamak mümkündür (68).

Günümüze dek *kistik ekinokokozun* serolojik tanısında; ya dolaşımdaki kist antijeninin (circulating antigen) yada *Echinococcus granulosus* antijenlerine karşı antikor cevabının saptanması üzerinde yoğunlaşmıştır. Ara konakta metasestod oluşmasından sonra sıızan kist sıvısı antijenleri serumda yüksek seviyelerde spesifik antikorların oluşumuna sebep olur. Bunun sonucu olarak da dolaşımda antikor saptanmasında uygulanan testlerde kist sıvısı antijenleri kullanılmaktadır. Antikor cevabında etkili olan kist sıvısı komponentlerinin tanımlanması çabaları literatürde karışık adlandırmaya yol açan iki major parazit antijeninin keşfedilmesine sebep olmuştur. Bu ajanlar antijen 5 ve antijen B olarak adlandırılmışlardır (68).

Leggatt ve ark.(69) tarafından koyun kist sıvısı SDS-PAGE ile birçok ayrı protein komponentlerine ayrıştırılmış ve 38 kDa. (antijen 5'in geniş subuniti) ve antijen B'nin 3 subuniti (12,16,23 kDa.) olan major parazit bandları belirgin biçimde gösterilmiştir.

Antijen 5, bir lipoprotein olup ilk kez immunelektroforezde "arc 5" olarak tanımlanan bir immunopresipitin bandı saptanmasında Capron ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (68).

Leggatt ve ark. (69) çalışmasında geniş subunit olan 38 kDa. komponentin sadece diğer sestod, nematod ve trematod'lara karşı oluşmuş antikorlarla değil, normal kontrol serumlarıyla da çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir.

Bu geniş reaktivitenin, antijenin fosforilkolin (PC) epitopuna bağlı gelişmiş olabileceği düşünülmektedir. Antijen 5, SDS-PAGE'in indirgen koşulları altında 38 kDa. ve 20 kDa.'luk iki subunite sahip 60 kDa.'luk bir molekül olup immunoblot ve immunopresipitasyon çalışmalarında bu molekülün çapraz reaksiyon verdiği görülmüştür (68).

Siracusano ve arkadaşları (70) spesifitede görülen farklılıkların antijen hazırlama şekli ve popülasyonlardaki çevresel faktörlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (68).

Kist sıvısındaki ikinci major antijen olan Antijen B, SDS-PAGE ile 3 immunojenik banda (12,16 ve 23 kDa.) ayrılmıştır. 12 kDa.'luk antijenin moleküler ağırlığı ile ilgili

değişik görüşler vardır. Siracusano ve arkadaşları (70), 12 kDa.'luk molekülü tanımlarken, Lightowers ve arkadaşları (54) 8 kDa.'luk bir molekül tanımlamışlardır. Bu farklılığa Leggatt ve arkadaşları (69), 12 kDa. ve 8 kDa. moleküllerin aynı antijeni temsil ettiğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar hidatid kist sıvısındaki 12 kDa. molekülün *E. granulosus*'a özgü olduğunu bildirirken, bazı araştırmacılar ise immunoblotting ve/veya immunopresipitasyon yöntemleri ile *E.multilocularis* hastalarının Antijen B'nin en küçük subunitine karşı oluşan çapraz reaksiyondan bahsetmektedirler (68).

Yapılan immunoblotting çalışmaları hem Antijen B'nin, hem de Antijen 5'in immunojenik olduğunu göstermiştir. 38 kDa.'luk Antijen 5'in geniş subüniti CE'li hasta serumlarının çoğu ile olduğu gibi, normal kontrollerin bir kısmıyla da immunoreaktif sonuç vermektedir. Buna karşın Antijen B'nin 12 kDa.'luk subüniti hiçbir normal kontrol serumu ile immunoreaktif sonuç vermemiştir. Genellikle 12 kDa. reaktivitesi gösteren kişilerde 16 kDa. subünitiyle de pozitif reaktivite olduğu fakat 23 kDa. molekülüyle değişken yanıtların alındığı bildirilmektedir. Ayrıca 16 kDa. cevabıyla 12 kDa. sero-reaktivitesi arasındaki bağlantı, Antijen B'nin bu subunitleri arasında antijenik homolojilerin varlığını düşündürmektedir (68). 12 kDa. molekülün alveolar hidatid ve cysticercosis'li hasta serumları ile çapraz reaksiyon verdiği fakat *Taenia* ile enfekte olmayan kişilerin serumları ile çapraz reaksiyon vermediği Leggatt ve arkadaşları (69) tarafından yapılan bir çalışmada belirtilmiştir.

2.8.3 Moleküler tanı yöntemleri:

2.8.3.1. Proteinlerin analizi ve sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein karışımlarının ya da proteinlerin genellikle agaroz veya polyacrylamide jel içinde analizleri için birçok yöntemler vardır. Elektroforetik yöntemler oldukça hızlı ve mikrogramla ifade edilebilecek hassasiyete sahip oldukları gibi boyama ya da otoradyografi ile jeldeki proteinlerin teşhisinde de son derece elverişli ve hassastırlar. Elektroforetik yöntemlerin bir diğer önemli özelliği de tek bir elektroforez ile çok sayıda örneğin analizine olanak sağlamasıdır. En fazla kullanılan yöntemler şunlardır: Sodium dodecyl sulfate jel elektroforezi, Nondenaturing şartlar altındaki jel elektroforezi (Gel Electrophoresis Under Nondenaturing Conditions, Buffer Gels),

Gradient jeller, İzoelektrik nokta jelleri (Isoelectric Focusing Gels) ve İki yönlü jeldir (Two-dimentional gel).

Proteinlerin analizi için belki de en fazla kullanılan yöntem SDS-PAGE'dir. SDS-PAGE proteinlerin karakterizasyonunda, karşılaştırılmasında ve sayısal olarak elde edilmesinde kullanılan pahalı olmayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu nedenle de kullanım alanı son derece geniştir. Bilindiği gibi elektroforez, elektrik yüklü bir alanda iyonların göçü olayıdır. Proteinlerin elektroforezinde, proteinin şekli, moleküler kütlesi, ortamın pH'ı ve bu pH'da proteinin anyon veya katyon olması gibi özellikler nedeni ile, farklı proteinler farklı göç hızı gösterir ve birbirlerinden ayrı noktalara doğru hareket eder. SDS-PAGE yönteminde, proteinler anyonik deterjan olan SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü kompleksler oluştururlar. Protein tarafından bağlanan SDS miktarı ve dolayısıyla kompleks üzerindeki yük, proteinin büyüklüğü ile orantılıdır. Her ne kadar istisnalar varsa da genellikle 1.4 g. SDS 1 g. proteine bağlanır. Proteinler genellikle SDS'e bağlanmaktan ötürü denatüre olurlar ve çözünürlük kazanırlar, şekillerini değiştirirler. Böylece proteinler (asidik ya da bazik) negatif yüklenmiş kompleksler olarak temelde yüklerindeki ve büyüklüklerindeki farklılığa dayanarak polyacrylamide jelin kalbura benzer matriksinde elektroforez ile seperasyona tabi tutulurlar. SDS-PAGE, protein seperasyonunun yanında, protein ağırlıkları bilinen standart proteinlerle bağlantılı olarak elektroforetik değişkenliklerin kıyaslanması ile bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlıklarını teşhiste oldukça geniş bir şekilde kullanılan güçlü bir yöntemdir (14,15).

2.8.4. Kültürde izolasyon

Echinococcus granulosus besiyerlerinde onkosferden kist şeklindeki larva haline kadar üretilebildiği gibi protoskoleksten halkalı şekle kadar da üretmek mümkündür (3).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada protoskolekslerden kist gelişimi hem hayvan modellerinde hemde in vitro kültürde başarılmıştır. Söz konusu çalışmada; koyundan elde edilen *E. granulosus* protoskolekslerinden kültür ortamında 90 günde kist geliştiği gözlenmiştir. Metasestod gelişiminin aşamaları morfolojik olarak görülmüştür. In vitro kültür süresince; evajine olmamış protoskoleks, veziküler form, arka kese formu, evajine olmuş arka keseli form, serbest arka keseli formlar görülmüştür (71).

2.9. Tedavi

Kendi haline bırakılan kistlerde; ya birkaç yıl sonra parazit ölür, sıvı kaybolur kütikül buruşur ve yerine yeni bir doku yerleşir, ya da bazı vakalarda olduğu gibi kistin çeperini mikroorganizmalar sarar, kütikülle organizmanın yaptığı doku arasında üreyip beliren yangı parazitin beslenmesini güçleştirerek ölümüne sebep olur, kütikül büzülür, içeriye mikroorganizmalar girer. Enfeksiyon, peritona veya bronşlara açılabilceği gibi şifayla sonuçlanabilir. Ya da büyük ve ince çeperli kistlerdeki gibi travmayla yırtılıp, kollaps ve hatta ölüm görülebilir (3).

Kistik ekinokokoz tedavisinde en geçerli uygulama kistin patlatılmadan çıkarılmasıdır. İlaç olarak mebendazol, fenbendazol ve flubendazol gibi benzimidazol bileşikleri kullanılmaktadır. Ancak belirli bir büyüklüğe erişmiş hidatik kistlerin opere edilmesi kaçınılmazdır. Bu ilaçlar özellikle operasyon sonucu gözden kaçabilecek, gelişmekte olan sekonder veziküllerin yok edilmesinde yararlı olabilir (3,38).

Kist hidatikli hastaların tedavisi cerrahi yoldan yapılır. Ameliyatı yapan cerrah ikincil keselerin oluşunu önlemek için kist sıvısıyla yavru veziküllerin etrafa saçılmasını engellemek için dikkat etmelidir (3,19).

Bakteri enfeksiyonlarının katıldığı ve kesede abse oluşan vakalarda veya hastanın vücudunda ikincil kistler varsa ya da hasta ameliyat edilemez durumdaysa örneğin kistin ameliyat için uygun olmayan yerleşmelerinde, sonuç iyi değildir. Ameliyat edilemez durumda olan kist bir tane ise aspire edilir. Boşluğa önce %10'luk formol verilir, geri alınır; daha sonra boşluk steril tuzlu suyla yıkanır ve kapatılır. Ameliyat edilemeyen kistler çok sayıda ise ve yerleşme kemiklerde olduğunda hastaya yılda üç defa hidatik sıvısı enjekte edilerek bağışıklık sağlanmaya çalışılır. Bundan olumlu sonuç alınabilirse kist ölür ve klinik belirtiler kaybolur. Mebendazol ve albendazol, ameliyatla tedavinin öngörülmediği belirli vakaların tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır (3,19).

2.10. Epidemiyoloji

Ülkemizdeki zoo-coğrafi yapı, iklim koşulları, toplumun sosyo-ekonomik düzeyi, veteriner sağlık örgütündeki yetersizlik ve halkın eğitim eksikliği gibi nedenlerle hidatik kist geniş bir yayılım göstermektedir. Hastalığın görülme sıklığı bölgelere göre değişiklik göstermektedir. En yaygın olduğu bölgeler, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu'dur (5,9,18,33). Türkiye'de yapılan bir çalışmada 2001-2005

yıllarında değişik hastanelerden, İl Sağlık Müdürlüklerinden ve Sağlık Bakanlığı'ndan elde edilen kayıtların retrospektif olarak gözden geçirilmesiyle saptanan kistik ekinokokoz olgularının incelenmesiyle elde edilen sonuçlara göre Marmara Bölgesi'nde 2534 (%13.13), Ege Bölgesi'nde 2114 (%16.94), Akdeniz Bölgesi'nde 2578 (%16.09), İç Anadolu Bölgesi'nde 5404 (%38.57), Karadeniz Bölgesi'nde 428 (%5.70), Doğu Anadolu Bölgesi'nde 844 (%6.80), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 887 (%2.75) olmak üzere toplam 14789 kist hidatik olgusu saptandığı bildirilmiştir (72). Hidatik kistin yaygınlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda, Sağlık Bakanlığı Türkiye genelinde 1987-1994 yılları arasında toplam 21.303 hidatik kistli hasta bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca prevalansın yılda 100.000'de 0.87-6.6 olduğu bildirilmiştir (6,73).

Bu infestasyonun yüksek prevalansı ülkelerin yetiştirdikleri koyun-keçi sürülerinin çokluğuna bağlıdır. Ayrıca bu yüksek prevalansta insan-köpek arasındaki zincir de oldukça önemlidir. Akdeniz ülkelerinin hepsinde *E. granulosus* bulunur. Tunus, Güney Fransa, Türkiye de ise *E. multilocularis* de saptanmıştır. *E. granulosus* çeşitli hayvanların konak olması nedeniyle daha yaygındır. İnsanlara enfeksiyonun bulaşma zincirinde köpek, koyun, deve, keçi, büyükbaş hayvanlar ve diğer otçul hayvanlar rol oynar. Besin olarak tükettiğimiz hayvanlar parazitin ara konağıdır. Son konak olan köpek ise hem çiftliklerde, hem de göçebe ve sürü sahibi toplumlarda bulunur. Köpek insanlara enfeksiyonu taşıyan en önemli kaynaklardan birisidir. Çakal, sırtlan, kurt, tilki gibi vahşi hayvanlarda bulaşma zincirinde rol oynarlar (18).

2.11. Korunma ve kontrol

E. granulosus yumurtaları nemli ortamda 1 yıl kadar canlı kalmaktadır. Yumurtalar ara konakta geliştiklerinde kist sayısı ve kistlerdeki protoskoleks sayısı fazladır. Bu ise son konakta parazit sayısının fazla olmasını sağlar. Çevre koşulları da bulaşma sıklığını belirler. Yörelere arası veya ülkeler arasında kontrolsüz hayvan hareketlerinin enfeksiyonu yaymada önemli rolü vardır. Mezbahalarda, hayvan kesimlerinin koşullara uygun olması ve sakatatların kapıda bekleyen köpeklere atılmaması gereklidir. Evlerin bahçelerinde kesilen kurbanlarda da bu konu aynıdır. Bunun için derin çukurlar kullanılmalıdır.

İnsana *E. granulosus* yumurtası 4 yolla bulaşır.

1.İnfeste dışkının gıda veya suya bulaşarak sindirim yolu ile alınması.

2.İnfeste toprak veya kumlarla çocuk bahçesinde oynayan çocukların ellerini kirleterek oral yoldan yumurtayı almaları.

3.Köpeklerin şeritleri dışkılamaları ile anüslerini yumurtalarla kirletmeleri olağandır. Yumurtaların köpeğin tüyelerine bulaşması da olasıdır. İşte böyle tüyleri infeste köpeklerin okşanması ve ellerin yıkanmadan ağıza götürülmesi bulaşmayı sağlar.

4.Yumurta içeren köpek dışkısının toza karışması ile yine ağız veya solunum yoluyla bulaşma olur.

Bulaşma bu 4 yolun kesilmesiyle önlenir.

Özetle kontrolde iki temel nokta önemlidir:

1. Köpeklerin kistli organları yemesi engellenmeli
2. Köpeklerde erişkin şeride karşı ilaç kullanılmalı (6,18,73).

E. granulosus'un gelişiminde insan ve hayvan sağlığı açısından daha çok kırsal çember önem taşır. Çünkü insan ve hayvanlar için esas bulaşma kaynağı köpekler, köpekler için ise bulaşma kaynağı hidatik kistli kasaplık hayvanlardır. Hidatidoz bir yandan toplum sağlığını ciddi olarak tehdit ederken, diğer yandan da koyun, keçi, sığır gibi kasaplık hayvanlarda et, süt, yapağı ve döl veriminin azalmasına, başta karaciğer ve akciğer olmak üzere kistli organların imhasına ve vücut direncinin kırılarak diğer hastalıklara yakalanma riskinin artmasına neden olarak ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir (18,33).

Son konak olan köpeklere karşı alınan önlemler önemlidir. Köpeklerin insanların ellerini ve yüzünü yalaması kesinlikle önlenmeli, köpeklere temas edilmemelidir. Eller yıkanmadan ağıza götürülmemelidir. Koyun gibi ara konaklara ait organlar açıkta bırakılmamalı, köpekler tarafından yenmemeleri için mezbahalarda yakılmalıdır. Sokak köpeklerinin öldürülmesi, sahipli köpeklerin barsağındaki helmintlerin arekolin hidrobromür, pirazikuantel gibi etkili ilaçlarla düşürülmesi gereklidir (3,19).

Köpekler arakolin, praziquantel, bakır oksiklorix, (Tsestan) ve Cantrodiphene verilerek yumurta ve erişkin helmintten arındırılır (18,73). Arekolinizasyon, enfekte köpeklere ağızdan kilogram başına 2-4 mg Arecolinum hydrobromicum verilmesiyle *Echinococcus granulosus*'u düşürerek hayvanların iyileştirilmesidir (18,74). Arekolinin ishal yapıcı yan etkisi nedeniyle yeni üretilen ilaçlar daha sık kullanılmaktadır. Parazitin

erişkinine karşı tam etkili olan diğer kimyasal maddeler, praziquantel, bakır oksiklorit (tsestan) ve Cantrodiphenedir.

Praziquantel 5 mg/kg, Tsestan ise 50 mg/kg doz olarak kullanılır. İlaç verilmesinden sonra köpekler 48 saat kadar gözetim altında tutulur ve bu süre içinde yapılan dışkıları toplanarak yok edilirse yumurtaların etrafa saçılarak enfeksiyon kaynağı oluşturması önlenmiş olur. Bu işlem yılda 2 kez yapılmalıdır. Bu kimyasal maddelerin arekolinden farkı köpekte aşırı ishal yapmamasıdır (18).

2.12. Kistik ekinokokoz aşısı

Kistlerden elde edilen antijenlerle oluşturulan immünite sadece kist oluşumundan sonraki devreye etkilidir. Kistlerin boyutunun küçük kalmasına veya kistin kalsifikasyonuna neden olabilmekte ama kist oluşumunu engelleyememektedir. Deneysel çalışmalar hidatidozda aşılama için onkosferlerden elde edilen antijenlerin en uygun olduğunu göstermiştir. Bu antijenlerden özellikle EG95 koyunlarda %96 koruyuculuk sağlamıştır. EG95 aşısı, bir ay arayla iki kez kas içine enjekte edildiğinde en az bir yıl koruma sağlamaktadır. Oluşan IgG antikorları kompleman varlığında onkosferi lizise uğratarak metasestoda dönüşmesini engellemektedir. Yalnız uzun süre yüksek antikor titreleri için aşının adjuvan ile birlikte kullanılması gerekir. Koruma oranı adjuvansız %18 iken adjuvan ile %96-98'e çıkmaktadır (26).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereç

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Gaziantep Üniversitesi'nin 03-2008/39 sayı ve 05/03/2008 tarihli etik kurul onayı alınmıştır. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Merkez laboratuvarı Mikrobiyoloji bölümüne 20.05.2007 - 20.05. 2008 tarihleri arasında kist hidatik ön tanısı ile gönderilen 163 hastaya ait kan örnekleri serumu ayrıştırılarak toplandı ve kullanılıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

Hastaların 102'si kadın, 61'i erkek olup yaş ortalaması 39 (1-84) idi. Hastaların epidemiyolojik özellik gösteren verileri (sosyoekonomik durumları) ve hastalık ile ilgili diğer laboratuvar bilgileri, radyolojik bilgiler ve varsa cerrahi bilgileri eşzamanlı olarak hastane arşivinden ve ilgili bölümlerden temin edildi. Kontrol grubu olarak herhangi bir hastalığı olmadığı bilinen kan donörlerinden 4'ü kadın, 26'sı erkek olup yaş ortalaması 28 (17-49) olan toplam 30 kişinin kanları alınıp serumları ayrılarak çalışılıncaya kadar -80 derecede saklandı.

3.2. Kullanılan yöntemler

3.2.1. İndirekt hemaglütinasyon (IHA) yöntemi :

Tüm hasta ve kontrol serumlarında önce IHA testi çalışıldı. Bunun için üretici firmanın (Echinococcosis, Fumouze Diagnostics, Paris, Fransa) önerileri doğrultusunda aşağıdaki işlemler yapıldı;

1. Kullanmadan önce test kiti ve hasta serumları oda ısısına ($+18^{\circ}\text{C}$ ile $+25^{\circ}\text{C}$ arası) getirildi. Test edilecek serumdan 1/40'luk stok solüsyonu hazırlamak için; 50 μl . hasta serumu, 1.95 ml. fosfat tampon solüsyonu ile birlikte eppendorf tüplerine konularak karıştırıldı.

2. Kit içinde yer alan mikropalak kullanılarak ilk iki sütunda 8 kuyucuğa diğer sütunlarda 6 kuyucuğa (ilk iki sütunda pozitif ve negatif kontroller yer aldığından 8

kuyucuğa) 50 µl. fosfat tampon solüsyonu konuldu. Sonra 1. kuyucuğa 50 µl. serum stok solüsyonu ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra 1. kuyucuktan 2. kuyucuğa 50 µl. aktarılıp karıştırıldı. Böylece 2. kuyucuktan 3. kuyucuğa, 3'den 4'e, 4'den 5'e, 5'den 6. kuyucuğa kadar seri dilüsyon işlemi devam edildi. 6. kuyucuktan 50 µl. dışarı atıldı ve 1. kuyucuktan itibaren 6. kuyucuğa doğru; 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 ve 1/2560'lık dilüsyonlar elde edildi. 7. kuyucuğa 50 µl. serum stok solüsyonu ilave edilip karıştırıldı ve 50 µl. dışarı atıldı. Bu tüp (1/80'lik dilüsyon) kontrol serumu olarak kullanıldı. Bu, serumda olabilecek doğal anti-koyun aglutininlerin tesbit edilmesi amacıyla yapıldı. Daha sonra kitin içinde kullanıma hazır olan eritrosit solüsyonu (Red Blood Cells=RBC's) dikkatlice çalkalanıp; ilk 6 kuyucuğa ve 7. kuyudaki kontrol serumuna birer damla duyarlılaştırılmış Kırmızı Kan Hücre Solüsyonu damlatıldı. Yine 8. kuyucuğa (Reagent kontrol) bir damla duyarlılaştırılmış Kırmızı Kan Hücre Solüsyonu damlatılarak tampon ve duyarlılaştırılmış eritrosit solüsyonunun çalışıp çalışmadığı test edildi. Mikroplak elle yandan hafifçe vurularak homojenize edilmeye çalışıldı.

3. Mikroplak 2 saat hareket ettirilmeden oda ısısında bekletildikten sonra reaksiyon okunmaya başlandı. Buna göre; kuyucuğun dibinde bir düğme (nokta tarzı) bir şekil var ise hemaglutinasyon yok yani negatif reaksiyon, kuyucuğun dibinde kırmızımsı-kahverengi bir tabaka varsa (bazen periferik bir ince halka varlığı olabilir) hemaglutinasyon var yani pozitif reaksiyon olduğu kabul edildi..

Kontrol grubu olarak 30 adet kan donörü serumu alınarak tüm testlerle çalışıldı

3.2.2. İndirekt Floresan Antikor (IFA) Yöntemi:

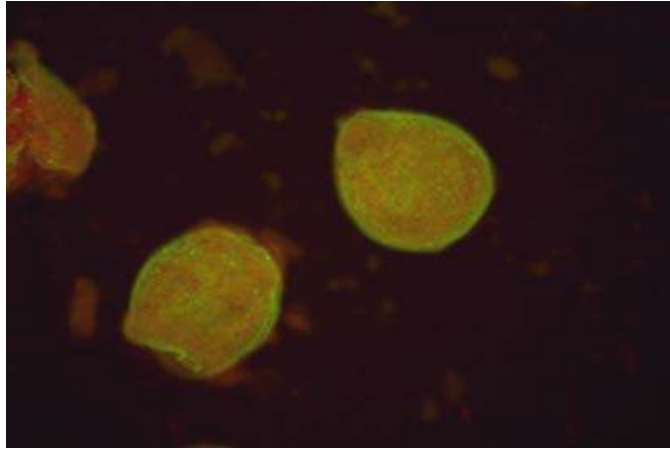
Echinococcus granulosus larvalarından hazırlanmış preparatlarda hasta serumundaki antikorların floresan antikor yöntemi ile araştırılması esasına dayanan İFA test kitleri ile üretici firmanın (Anti-*Echinococcus granulosus* IIFT, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck, Almanya) önerileri doğrultusunda çalışıldı.

1. Kullanmadan önce test kiti ve hasta serumları oda ısısına (+18°C ile +25°C arası) getirildi. Hasta serumundan 1/100'lük bir serum dilüsyonu hazırlandı. Bu amaçla 1000 µl. PBS-Tween solüsyonu içine 10.1 µl. serum konulup, 4 saniye vorteksenerek karıştırıldı.

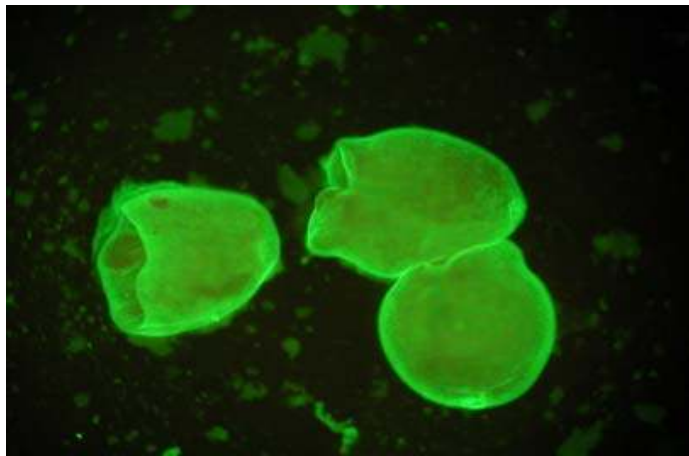
2. Reagent tablasındaki her bir alana (bu alanlarda dondurulmuş *E. granulosus* larvalarının parçaları mevcut) 25 µl. dilüe serum ilave edilip 30 dakika oda ısısında (+18°C ile +25°C arası) bekletilerek inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dakika olmak üzere önce üzerine PBS-Tween döküp sonra geniş ağızlı bir kap (Petri kabı) içinde yine PBS-Tween içerisinde hafifçe çalkalanarak yıkandı.

3. Yıkanmış olan bu alanların her birine 20 µl. floresan işaretli anti-human globulini eklenip, 30 dakika oda ısısında (+18°C ile +25°C arası) bekletilip 3 kez 5'er dakika yıkandı.

4. Yıkanmış olan bu alanların her birine 10 µl. kaplama sıvısı ilave edilip, her bir tabla özel lameli ile kaplanarak floresan mikroskopunda 20x ve 40x'lık objektiflerle okundu (Resim-1 ve 2).



Resim-1: Bütün protoskoleks antijeni ile negatif preparat (22)



Resim-2: Bütün protoskoleks antijeni ile pozitif preparat (22)

3.2.3. ELISA yöntemi:

Serumda veya plazmada *Echinococcus granulosus*'a karşı oluşan human Ig G sınıfı antikorların invitro test edilmesi amacıyla *Echinococcus granulosus* antijeni ile kaplı ve her biri 8 kuyucuklu 12 sütundan oluşan kitler üretici firmanın (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck,Almanya) önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

Bu amaçla;

- 1- Hasta serumları 1/101 oranında hazırlandı. 10 µl.hasta serumu, 1000 µl. örnek tamponu içerisinde dilüe edilip vorteks ile karıştırıldı.
- 2- Kantitatif bir test için ilk sütunun 1, 2 ve 3. kuyucuklarına sırasıyla 1, 2 ve 3 nolu kalibratörlerden, sonraki 2 adet kuyucuğa ise sırasıyla pozitif ve negatif kontrollerden ve 6. kuyucuktan itibaren hasta numaralarına göre her bir kuyucuğa bir hasta serumundan 100'er µl. pipetlenip, 30 dakika oda ısısında (25°C) bekletilerek inkübe edildi.
- 3- Üç kez (her seferinde 30-60 saniye 450 µl. sulandırılmış yıkama tamponunda) yıkandı. Yıkama işlemi için Pastör LP 35 Yıkama cihazı (Pasteur Diagnostics, Fransa) kullanıldı. Yıkamadan sonra kuyucuklarda kalan (10 µl.den fazla) yıkama tamponunu uzaklaştırmak için kuyucuklar dağıtılmadan ters yüz edildi.
- 4- Her kuyucuğa 100 µl. enzim konjugat (peroksidaz işaretli anti-human Ig G) pipetlenip, 30 dakika oda ısısında (+18°C ile +25°C arası) bekletilerek inkübe edilmesi sağlandı.
- 5- Yine 3 kez yukarıdaki (3.madde) yıkama işleminin aynısı yapıldı.
- 6- Her kuyucuğa 100 µl. kromojen substrat pipetlenip 15 dakika oda ısısında (25°C) bekletilerek inkübe edildi. Bu aşamada (kromojen substrat direkt güneş ışığından etkilendiğinden) direkt güneş ışığından korundu.
- 7- Her kuyucuğa 100 µl. stop solüsyonu pipetlenip reaksiyonun ilerlemesi durduruldu.
- 8- Stop solüsyonunu ekledikten sonra 450 nm. dalga boyunda (referans 620 nm.) renk yoğunluğu ölçülerek kantitatif ve kalitatif olarak değerlendirildi.

Ölçüm işlemi Pastor LP 400 spektrofotometre cihazı (Pasteur Diagnostics, France) ile yapıldı.

Yine üretici firmanın önerileri doğrultusunda kantitatif olarak; hasta serumu absorbansı <0.8 ise sonuç negatif, 0.8 ile 1.1 arasında (≥ 0.8 'den <1.1 'e kadar) ise sonuç şüpheli veya sınırda ve ≥ 1.1 ise sonuç pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4. Western blot yöntemi:

Western blot yöntemi, *E. granulosus*'a karşı oluşan insan antikorlarının kalitatif olarak in vitro incelenmesini sağlamaktadır. Test kiti elektroforetik olarak ayrıştırılmış *E. granulosus* antijenlerinden oluşmuş test striplerini içerir. Stripler üzerinde 38 kDa. ve 20 kDa.'luk molekül ağırlığında iki subunite sahip ve lipoproteinden oluşan Antijen 5 ile 12 kDa, 16 kDa ve 23 kDa molekül ağırlığında 3 immunojenik subunit banttan oluşan Antijen B bulunmaktadır. Yapılan immunoblotting çalışmaları hem Antijen B'nin, hem de Antijen 5'in immunojenik olduğunu göstermiştir. Stripler dilüe edilmiş hasta örnekleri ile inkübe edilip, pozitif örneklerde Ig G türü spesifik antikorların antijenlere bağlanmasını sağlamakta ve enzim işaretli bir anti-insan Ig G'si (enzim konjugatı) kullanılarak ikinci bir inkübasyon yaptırılıp, reaksiyon görülür hale getirilmektedir.

Testin çalışma prosedürü üretici firmanın (Anti-*Echinococcus granulosus*-WB (IgG), EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck, Almanya) önerileri doğrultusunda yapıldı;

- 1- İnkübasyon tablasının her bir kanalına 1.5 ml. distile su ile (1:10 oranında) sulandırılmış Üniuersal Buffer konulup içine test stripleri bırakıldı ve 15 dakika oda ısısında ($+18^{\circ}\text{C}$ ile $+25^{\circ}\text{C}$ arası) bir shaker (çalkalayıcı) üzerinde inkübe edildi.
- 2- Sonra sıvının tümü aspire edilip inkübasyon tablasının her bir kanalına 1.5 ml. sıra numarasına göre dilüe edilmiş (1:51 oranında sulandırılmış Üniuersal Buffer ile) hasta serumu pipetlenip 30 dakika oda ısısında ($+18^{\circ}\text{C}$ ile $+25^{\circ}\text{C}$ arası) bir çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Sonra sıvının tümü aspire edilip 3 kez 5'er dakika sulandırılmış Üniuersal Buffer ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı.
- 3- Sıvının tümü aspire edildikten sonra inkübasyon tablasının her bir kanalına 1.5 ml. dilüe edilmiş (1:10 oranında sulandırılmış Üniuersal Buffer ile) Enzim Konjugatı eklenip 30 dakika oda ısısında ($+18^{\circ}\text{C}$ ile $+25^{\circ}\text{C}$ arası) çalkalayıcı

üzerinde bekletildi. Sonra sıvının tümü aspire edilip 3 kez 5'er dakika sulandırılmış Üiversal Buffer ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

- 4- Sonra sıvının tümü aspire edilip inkübasyon tablasının her bir kanalına 1.5 ml. kullanıma hazır substrat solüsyonu pipetlenip 10 dakika oda ısısında (+18°C ile +25°C arası) çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Substrat solüsyonu ışığa hassas olduğundan bu aşamada ışıktan korunarak çalışıldı.
- 5- Sonra sıvının tümü aspire edilip 3 kez distile su ile yıkanarak reaksiyon durduruldu.
- 6- Bantların oluşumuna göre değerlendirmeye geçildi. Buna göre sonuçlar 3 kategoriye ayrılarak değerlendirildi (Resim-3) ;

Kategori 1: Belirsiz antijenler ve spesifik olmayan 39 kDa moleküler ağırlıklı antijen.

Kategori 2: 24-26 kDa ve 16-18 kDa moleküler ağırlıklı cinse spesifik antijenler.

Kategori 3: 7 kDa moleküler ağırlıklı yüksek spesifikliğe sahip antijen.

Negatif : Hiç band yok veya zayıf kategori 1 ve 2 bandları.

Pozitif : Kategori 3'de (gri) band oluşumu.

Sınırdaki veya şüpheli : Kategori 3'de zayıf bir band veya kategori 2'de bir veya daha fazla antijen bandı saptanması (Resim-3).

EUROIMMUNMedizinische
Labordiagnostika
AG**Anti-Echinococcus granulosus-WESTERNBLOT**
Auswerte-Protokoll / Evaluation protocol:

Datum / Date:

30 Temmuz 2008

Streifencharge / Batch no. strips:

S070127EK-18

Durchgeführt von / Performed by:

Bemerkungen / Remarks:

Serum-Nr. / no.	Patient	Ig-	Ergebnis / Result
74			Pozitif
80			Pozitif
87			Pozitif
88			Pozitif
91			Pozitif
97			Pozitif
98			Pozitif
103			Pozitif
104			Pozitif
115			Pozitif
117			Pozitif
125			Şüpheli
127			Pozitif
129			Pozitif
131			Pozitif
132			Pozitif

Serum-Nr. / no.	74	80	87	88	91	97	98	103	104	115	117	125	127	129	131	132
Str.																
Ig-																
Ergebnis/Result	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Sup	Poz	Poz	Poz	Poz
p 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p 24/26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p 16/18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Achtung: Unter der Nummerierung der Streifen befindet sich eine Kontrollbande. Die korrekt durchgeführte Inkubation wird durch eine intensive Färbung dieser Kontrollbande angezeigt.**Attention:** There is a control band below the number figuring on the strips. The incubation was performed correctly if a strong colour reaction is visible on this control band.

Resim-3: Western Blot testine alınan bir grup hastanın (16 serum örneğinin) sonuç görüntüsü.

3.3. İstatistik

İstatistiksel analizler bağımsız grup oranlarının karşılaştırılması yapılarak Ki-kare (χ^2) (chi-square) yöntemleri ve pozitif prediktif ve negatif prediktif değer hesaplanmaları uygulanarak yapıldı.

4. BULGULAR

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Merkez laboratuvarı Klinik Mikrobiyoloji bölümüne 20.05.2007 - 20.05. 2008 tarihleri arasında kist hidatik ön tanısı ile gönderilen ve indirekt hemagglütinasyon testi (IHA) istenen 163 kan örneği serumları ayrılarak çalışmaya alındı ve IHA testleri çalışıldıktan sonra -80 °C’de saklandı. Çalışmaya alınan 163 hastanın %37 ‘si erkek, %63’ü kadındı (Tablo-1). IHA ile yapılan araştırmada pozitifliğin cinsiyet ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunamadı (p: 0.101).

Tablo-1: Hastaların cinsiyet ve IHA pozitifliğine göre dağılımı

Cinsiyet	IHA Pozitif		IHA Negatif		Toplam Olgu
	n	%	n	%	n
Erkek	26	44.1	35	56.4	61
Kadın	57	55.9	45	43.6	102
Toplam	83		80		163

Hastaların yaş ortalaması 39 (1-84) olup %13’ü 16 yaşından küçük, %42’si 45 yaşından büyüktü. IHA pozitifliğine göre değerlendirildiğinde 16-45 yaş grubunda pozitifliğin yüksek olduğu görüldü. Yapılan istatistiki değerlendirmede IHA pozitifliği ile yaş grupları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p: 0.588) (Tablo-2).

Tablo- 2: Hastaların yaşa ve IHA pozitifliğine göre dağılımı

Hasta yaş grubu	IHA Pozitif		IHA Negatif		Toplam olgu	%
	n	%	n	%		
16 yaş ve daha küçük	9	42.9	12	57.1	21	12.9
16-45 yaş arası	40	54.8	33	45.2	73	44.8
45 yaş ve daha büyük	34	49.3	35	50.7	69	42.3
Toplam	83		80		163	

Hastalar çeşitli servis ve polikliniklerden gönderilmiş olup çoğunluğu cerrahi ünitelerinden gelmekteydi. IHA pozitifliğine göre olguların kliniklere göre dağılımı Tablo 3’te görülmektedir.

Tablo- 3: Hastaların başvurduğu üniteye (poliklinik/servise) göre dağılımı

Başvurulan Ünite (Poliklinik/Servis)	IHA Pozitif n	%	IHA Negatif n	%	Olgu sayısı Toplam	%
Genel Cerrahi	38	58.5	27	41.5	65	39.88
Gastroenteroloji	9	45	11	55	20	12.27
Göğüs Hastalıkları	6	42.9	8	57.1	14	8.59
İç Hastalıkları	6	54.5	5	45.5	11	6.75
Göğüs Cerrahisi	6	60	4	40	10	6.14
Çocuk Cerrahisi	6	75	2	25	8	4.91
Üroloji	1	12.5	7	87.5	8	4.91
Pediyatri	-	-	5	100	5	3.07
Dahiliye Hematoloji	2	66.7	1	33.3	3	1.84
Enfeksiyon Hastalıkları	1	33.3	2	66.7	3	1.84
Çocuk Nefrolojisi	1	50	1	50	2	1.23
Endokrinoloji	2	100	-	-	2	1.23
Dahili Yoğun Bakım Ünitesi	1	100	-	-	1	0.61
Pediyatrik Hematoloji	-	-	1	100	1	0.61
Göz Hastalıkları	1	100	-	-	1	0.61
Beyin Cerrahisi	1	100	-	-	1	0.61
Plastik Cerrahi	-	-	1	100	1	0.61
Ortopedi	-	-	1	100	1	0.61
KBB	1	100	-	-	1	0.61
Nefroloji	-	-	1	100	1	0.61
Dermatoloji	-	-	1	100	1	0.61
Acil	1	100	-	-	1	0.61
Çocuk Acil	-	-	1	100	1	0.61
Onkoloji	-	-	1	100	1	0,61
Kadın-Doğum Hst.	-	-	1	100	1	0,61
Toplam	83		80		163	100

Hastalar ilgili birimlere çeşitli şikayetlerle başvurmuşlardır. Sıklıkla görülen başvuru şikayeti karın ağrısı olup bu olgularda IHA pozitifliği %51 olarak saptanmıştır (Tablo- 4).

Tablo- 4: Hastalarda semptomların bulunma yüzdeleri

Semtom	IHA Pozitif	%	IHA Negatif	%	Olgu sayısı	% n : 163
Karın ağrısı	59	51.8	55	48.8	114	69.9
Bulantı-kusma	5	45.5	6	54.5	11	6.75
Öksürük	14	53.8	12	46.2	26	15.95
Nefes darlığı	7	46.7	8	53.3	15	9.20
Halsizlik-iştahsızlık	4	57.1	3	42.9	7	4.29
Göğüs ağrısı	-	-	1	100	1	0.61
Balgam	4	80	1	20	5	3.07
Hemoptizi	1	25	3	75	4	2.45
Ağızdan su gelmesi	1	100	-	-	1	0.61
Yan ağrısı	2	33.3	4	66.7	6	3.68
Baş ağrısı	1	50	1	50	2	1.23
Ateş	2	50	2	50	4	2.45
Karında şişlik	2	50	2	50	4	2.45
Baş dönmesi	1	50	1	50	2	1.23
Vaginal kanama	1	50	1	50	2	1.23
Toplam	83		80			

Çalışmaya dahil edilen 163 hastanın 132'si il veya ilçe merkezinde ikamet etmekte iken, 31 hasta ise köy veya benzeri kırsal alandan gelmekteydi. Kırsal alandan başvuran hastalarda IHA pozitifliği daha yüksek saptandı (%58.1), (p:0.00) (Tablo-5).

Tablo- 5: Hastaların geldikleri coğrafi konuma göre dağılımı

	IHA Pozitif		IHA Negatif		Olgu sayısı	%
	n	%	n	%		
İl/ilçe merkezi	65	49.2	67	50.8	132	81
Kırsal alanr	18	58.1	13	41.9	31	19
Toplam	83		80		163	100

Çalışmaya alınan 163 olgunun 100'ünde radyolojik olarak kist oluşumu saptanmış olup, görüntüleme raporları incelendiğinde olguların %70'inde karaciğer, %25'inde akciğer, %5'inde ise diğer organ tutulumu görülmekteydi. Olguların çoğunluğu tek kist şeklinde olup genellikle karaciğerin sağ lobunu tutmaktaydı (Tablo-6).

Tablo- 6: Hastalarda hidatik kistlerin tuttuğu organa göre dağılımı

Tuttuğu Organ		Unikistik		Multikistik		Toplam	
		n	%	n	%	n	%
Karaciğer	Sağ	31	28.5	19	17.4	50	45.9
	Sol	7	6.4	4	3.7	11	10.1
	Bilateral			11	10.1	11	10.1
Akciğer	Sağ	6	5.5	3	2.8	9	8.3
	Sol	5	4.6	2	1.8	7	6.4
	Bilateral			6	5.5	6	5.5
Karaciğer+ Akciğer				9	8.3	9	8.3
Diğer Organlar		4	3.7	2	1.8	6	5.5

Tabloda karaciğer ve akciğerde birlikte bulunan 9 olgu diğer organ yerleşimli 1 olgu ayrıca karaciğerde veya akciğerde sayıldıklarından toplamdan çıkarılmıştır.

Karaciğer ve akciğer dışında olgulardan biri pelvis ve dalakta multikistik tutulum, biri kranial, biri cerebral, biri parieto-occipital, biri sağ sürrenal ve biri sol böbrekte unikistik tutulum olmak üzere 6 olgu bulunmaktaydı.

Ayrıca 14 hastada *E. granulosus*'a karşı antikor tesbit edilmesine rağmen hem radyolojik hemde operasyonel olarak Kist Hidatik tesbit edilemedi.

İki hastada *E. granulosus*'a karşı antikor tesbit edilip, operasyonel olarak Kist Hidatik olduğu doğrulanmasına rağmen radyolojik olarak Kist Hidatik tesbit edilemedi.

Hem radyolojik hem de operasyonel olarak Kist Hidatik olduğu tesbit edilen 5 hastada serolojik olarak antikor saptanamadı

Radyolojik yöntemlerle Kist Hidatik ön tanısı konulan dört hastada ise serolojik yöntemlerle *E. granulosus*'a karşı antikor saptanamadı ve yapılan operasyonlarda bu hastalarda basit kist saptandı. Ayrıca kist hidatik ön tanısıyla laboratuvarımıza gönderilen ve serolojik olarak antikor saptanmayan 13 olguda radyolojik görüntüleme yöntemleri ile kist hidatik dışı oluşum (3 hastada solid kitle, 3 hastada basit kist, 1 hastada

hemanjiom, 3 hastada basit dalak kisti ve 3 hastada basit böbrek kisti) tesbit edilip operasyonel olarak doğrulanmıştır.

Hastaların biyokimyasal tetkikleri incelendiğinde; 7 hastada anemi (Hb., Hct. ve RBC düşüklüğü), 4 hastada CRP yüksekliği, 2 hastada AST ve ALT yüksekliği, 2 hastada total bilirubin yüksekliği, 2 hastada sedimantasyon yüksekliği, 1'er hastada ALP ve LDH yüksekliği, 1 hastada B12 vitamin eksikliği, 1 hastada pansitopeni ve 1 hastada ise trombositopeni tesbit edildi. Olguların çoğunda biyokimyasal değerler normaldi.

Çalışmaya alınan 163 hastanın 70'inde (%43) çeşitli patolojiler mevcuttu. Bunlardan 14 hastada karaciğer ve safra yollarına ait patolojiler [Safra taşı (n:5), kronik kolesistit (n:3) ve karaciğer absesi (n:4), karaciğer adeno kanseri (n:1) ve hemanjiyom (n:1)], 8 hastada kardiovasküler sisteme ait patolojiler [hipertansiyon (n=4), koroner arter hastalığı (n=2), venöz yetmezlik (n=2)], 19 hastada genito-üriner sisteme ait patolojiler [over kisti (n=5), vezikoüreteral reflü (n=2), böbrek/üreter taşı (n=2), böbrek yetmezliği (n=3), böbrek kisti (n=3), varikosel ve inguinal herni (n=2), memede nodül (n=1), servikal intraepitelyal neoplazi (n=2)], 6 hastada endokrin sisteme ait patolojiler [Diabetes Mellitus (n=4), kronik pankreatit (n=1), tiroid nodülü (n=1)], 4 hastada pulmoner sisteme ait patolojiler [KOA (n=2), Larinks kanseri (n=1), akciğerde yabancı cisim (n=1)], 7 hastada gastrointestinal sisteme ait patolojiler [peptik ulcus (n=5), intestinal obstrüksiyon (n=1), omentum tm. (n=1)], 7 hastada hematolojik sisteme ait patolojiler [kanama diyatezi (n=1), dalak kisti (n=2) lenfoma (n=3), Hemofagositik sendrom (n=1)], 5 hastada kemik ve eklem sistemine ait patolojiler [disk hernisi (n=3), vertebra'da Schmorl nodülü (n=1), osteosarkom (n=1)] vardı. Bu 70 olgunun 46'sında seroloji negatifti. Serolojisi pozitif olan olguların çoğunda genitoüriner (%27) ve hepatobiliyer (%20) sisteme ait patolojiler mevcuttu.

Çalışmaya alınan 163 hastanın 80'inde İHA ile negatif (1/80 ve altındaki serum dilüsyonu), 83 hastada ise (1/160 dilüsyon ve üzeri) pozitiflik saptandı. Kontrol grubunda (kan donörleri) 2 olguda pozitiflik görüldü (Tablo-7).

Tablo- 7: IHA test sonuçlarına göre hastaların dağılımı

IHA	Olgu sayısı	%	Kontrol (kan donörleri)	%
Pozitif	83	50.92	2	6.67
Negatif	80	49.08	28	93.33
Toplam	163	100	30	100

IHA sonuçlarını serum dilüsyonlarına göre incelediğimizde en fazla pozitifliğin 1/640 titrede olduğu saptandı (Tablo-8). Karaciğer yerleşimli hidatik kistlerde yüksek titrelerde pozitiflik (1/320 ve üzeri) saptanırken karaciğer dışı hidatik kist olgularında düşük düzeyde pozitiflik bulunmaktaydı.

Tablo- 8: IHA test sonuçlarının serum dilüsyonuna göre dağılımı

Antikor Titresi	Vaka sayısı	%	Kontrol (kan donörleri)	%
Negatif	40	24.54	18	60
1/80 Negatif	40	24.54	10	33.33
1/160 Sınırdaki Pozitif	16	9.82	2	6.67
1/320 Pozitif	14	8.59	-	-
1/640 Pozitif	52	31.90	-	-
1/1280 Pozitif	1	0.61	-	-
Toplam	163	100	30	100

IFA ile yapılan araştırmada 163 hastanın 78'i negatif, 85'i pozitif olarak saptandı. Pozitiflik üretici firmanın önerileri doğrultusunda 1 pozitif, 2 pozitif, 3 pozitif ve 4 pozitif şeklinde değerlendirildi. Kontrol grubunda ise IFA ile pozitiflik saptanmadı (Tablo-9).

Tablo-9: IFA test sonuçlarına göre hastaların dağılımı

Sonuç IFA	Olgu sayısı	%	Kontrol (kan donörleri)	%
Pozitif	85	52.15	-	-
Negatif	78	47.85	30	100
Toplam	163	100	-	100

IHA ile pozitif bulunan 2 kontrol olgusunda IFA ile çok zayıf bir floresans görüldü ve şüpheli olan bu iki olgu negatif olarak değerlendirildi (Tablo-10). IFA ile pozitif olarak değerlendirilen 85 olgunun 34'ü (%40) üç pozitif olarak değerlendirilmiş olup tamamı karaciğer yerleşimli hidatik kistlerdi.

Tablo- 10: IFA test sonuçlarının dağılımı

Test sonucu	Olgu sayısı	%	Kontrol (kan donörleri)	%
Negatif	78	47.85	30	100
Şüpheli	5	3.07	-	-
1 pozitif	25	15.33	-	-
2 pozitif	20	12.26	-	-
3 pozitif	34	20.86	-	-
4 pozitif	1	0.61	-	-
Toplam	163	100	30	100

ELISA ile yapılan araştırmada ise 93 hasta negatif, 70 hasta pozitif saptandı (Tablo-11). Kontrol grubunda IHA ile 1/160 pozitif bulunan bir olgu ELISA ile de sınır değerde (cut off sınırında) bulundu ve tekrarlanan testlerinde negatif olarak değerlendirildi. Yine kontrol grubunda ELISA ile şüpheli sınırda saptanan bir olgu tekrarlanan testte negatif olarak bulundu.

Tablo- 11: ELISA test sonuçlarına göre hastaların dağılımı

ELISA Test Sonucu	Olgu sayısı	%	Kontrol (kan donörleri)	%
Pozitif	70	42.9	-	-
Negatif	93	57.1	30	100
Toplam	163	100	30	100

Tüm olgularda doğrulama amacıyla Western blot testi uygulandı. IHA, IFA ve ELISA test sonuçlarına göre (her üç yöntemle) negatif olarak değerlendirilen 69 hasta serumunun tümü Western blot yöntemi ile negatif olarak değerlendirildi. Bu olgularda herhangi bir antijen bandı görülmedi.

Çalışmaya alınan 163 serum örneğinin 94'ünde (%58) üç yöntemden en az biriyle pozitiflik saptandı. IHA, IFA ve ELISA yöntemlerinden en az biriyle pozitif olarak değerlendirilen 94 hasta serumu ve 2 şüpheli kontrol serumu Western blot yöntemi ile araştırıldı. Olguların 66'sı (%40.49) p7 bandının varlığı nedeniyle pozitif, 23'ü p7 kDa bandı olmayıp, p16/18 ve p24/26 kDa bantların varlığı nedeniyle şüpheli/sınırdaki ve 5'i de sadece p39 bandının varlığı nedeniyle negatif olarak değerlendirildi. Geriye kalan 69 örnek Western blot yöntemi ile araştırıldığında, herhangi bir antijen bandı görülmeyp negatif olarak saptandı (Tablo-12).

Tablo- 12: Western blot test sonuçlarına ve antijen bantlarına göre dağılım

Western Blot Test Sonucu	Olgu Sayısı	p39 kDa	p24/26 kDa	p16/18 kDa	p7 kDa	%
Pozitif	66	66	66	66	66	40.49
Şüpheli veya Sınırdaki	23	23	23	23	-	14.11
Negatif	74	5	-	-	-	45.38
Toplam	163	94	89	89	66	100

IHA sonucu pozitif olup IFA ve ELISA ile negatif olarak saptan 1 kontrol serumu (kan donörü) Western Blot yöntemiyle de negatif olarak saptandı. Ayrıca ELISA ile şüpheli (cut off sınırında) olarak değerlendirilen 1 kontrol serumu (kan donörü) diğer tüm yöntemlerle negatif olarak saptandı.

IHA ile pozitif saptanan 83 olgunun 79'u, IFA ile pozitif saptanan 85 olgunun 80'i ve ELISA ile pozitif saptanan olguların tümü Western Blot yöntemiyle pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo-13).

Tablo- 13: Western Blot testi sonucuna göre diğer testlerin dağılımı

Testin Adı		Western Blot		Toplam	%
		Pozitif	Negatif		
IHA	Pozitif	79	4	83	50.92
	Negatif	10	70	80	49.08
IFA	Pozitif	80	5	85	52.15
	Negatif	9	69	78	47.85
ELISA	Pozitif	70	0	70	42.94
	Negatif	19	74	93	57.06

Western blot testini altın standart olarak değerlendirip diğer testlerle karşılaştırdığımızda, IHA testi için duyarlılık %88.76, özgüllük %94.59, güvenilirlik %91.41, pozitif prediktiflik değeri %95.18, negatif prediktiflik değeri %87.5 olarak bulundu (Tablo-14). WB test sonuçları ile IHA testi arasındaki anlamlı farklılık saptanmıştır ($\chi^2=112.34$ ve $p=0.00$).

Tablo- 14: Western blot test sonuçları ile IHA yönteminin karşılaştırılması

Testin Adı		Western Blot		Toplam
		Pozitif	Negatif	
IHA	Pozitif	79	4	83
	Negatif	10	70	80
Toplam		89	74	163

IFA testi için duyarlılık %89.89, özgüllük %93.24, güvenilirlik: %91.41, pozitif prediktiflik değeri: %94.12, negatif prediktiflik değeri: %88.46 olarak bulundu (Tablo-15). WB test sonuçları ile IFA testi arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($\chi^2=111.9$ ve $p=0.00$).

Tablo- 15: Western blot test sonuçları ile IFA yönteminin karşılaştırılması

Testin Adı		Western Blot		Toplam
		Pozitif	Negatif	
IFA	Pozitif	80	5	85
	Negatif	9	69	78
Toplam		89	74	163

ELISA testi için duyarlılık %78.65, özgüllük %100, güvenilirlik %88.34, pozitif prediktiflik değeri %100, negatif prediktiflik değeri %79.57 olarak bulundu (Tablo-16). WB test sonuçları ile ELISA testi arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($\chi^2=102.01$ ve $p=0.00$).

Tablo- 16: Western blot test sonuçları ile ELISA yönteminin karşılaştırılması

Testin Adı		Western Blot		Toplam
		Pozitif	Negatif	
ELISA	Pozitif	70	0	70
	Negatif	19	74	93
Toplam		89	73	163

ELISA ve IHA testleri karşılaştırıldığında ELISA ile pozitif saptanan 7 olgu IHA ile negatif, IHA ile pozitif saptanan 20 olgu ise ELISA ile negatif bulunmuştur (Tablo-17).

Tablo- 17: IHA ve ELISA testlerinin karşılaştırılması

Testin Adı		IHA		Toplam
		Pozitif	Negatif	
ELISA	Pozitif	63	7	70
	Negatif	20	73	93
Toplam		83	80	163

IHA ve IFA testleri karşılaştırıldığında IFA ile pozitif saptanan 4 olgu IHA ile negatif, IHA ile pozitif saptanan 7 olgu IFA ile 2'si şüpheli 5'i de negatif bulunmuştur (Tablo-18).

Tablo- 18: IHA ve IFA testlerinin karşılaştırılması

Testin Adı		IHA		Toplam
		Pozitif	Negatif	
IFA	Pozitif	76	4	80
	Şüpheli	2	3	5
	Negatif	5	73	78
Toplam		83	80	163

IFA ve ELISA testleri karşılaştırıldığında IFA ile pozitif saptanan 16 olguda ELISA ile negatiflik, ELISA ile pozitif saptanan 5 olguda IFA ile 1 şüpheli 4 de negatiflik elde edilmiştir (Tablo-19).

Tablo- 19: IFA ve ELISA testlerinin karşılaştırılması

Testin Adı		ELISA		Toplam
		Pozitif	Negatif	
IFA	Pozitif	65	15	80
	Şüpheli	1	4	5
	Negatif	4	74	78
Toplam		70	93	163

Operasyonla kist hidatik olduğu doğrulanan 71 olgunun tümü Western Blot ile pozitif saptanırken, IHA ile 60, IFA ve ELISA ile 58 olgu pozitif saptandı. Radyolojik olarak kist tanısı alan 100 olgunun Western Blot ile 89’u, IHA ile 76’sı, IFA ile 73’ü ve ELISA ile 58’i pozitif olarak saptandı (Tablo-20)

Tablo-20: Operasyonla doğrulanan ve radyolojik olarak saptanan olguların testlerde pozitiflik sonucuna göre dağılımı

	IHA pozitif	IFA pozitif	ELISA pozitif	WB pozitif	Toplam
Operasyonla doğrulanan olgular	60 %84.5	58 %81.6	58 %81.6	71 %100	71
Radyolojik olarak kist saptanan olgular	76 %76	73 %73	68 %68	89 %89	100

Operasyonla kist hidatik olduğu doğrulanan 71 hastanın serolojik incelemelerinde 11’i IHA ile, 13’ü de IFA ve ELISA ile negatif saptanırken Western blot ile tüm olgular

pozitif olarak saptandı. Ayrıca IHA, IFA ve ELISA ile saptanan pozitiflikle sırasıyla 60, 58, 58 olarak saptandı (Tablo-21).

Tablo- 21: Kistin lokalizasyonuna göre serolojik testlerin değerlendirilmesi

Kistin lokalizasyonu		IHA		IFA		ELISA		WB			Toplam (%)
		Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Şüp	Neg	
Karaciğer	Sağ lob	22	6	22	6	22	6	27	1	-	28 (39.4)
	Sol lob	5	2	5	2	5	1	7		-	7 (9.9)
	Bilateral	10	-	10	-	10	1	8	2	-	10 (14.1)
Akciğer	Sağ akciğer	7	1	6	2	6	2	7	1	-	8 (11.3)
	Sol akciğer	9	-	8	1	8	1	8	1	-	9 (12.7)
	Bilateral	3	-	3	-	3	-	3	-	-	3 (4.2)
Diğer organlar		4	2	4	2	4	1	5	1	-	6 (8.4)
Toplam		60	11	58	13	58	13	65	6	-	71 (100)

Yüzdelere parantez içinde verilmiştir.

Western Blot testi ile saptanan antijen bantları incelendiğinde pozitif çıkan tüm testlerde p39 kDa molekül ağırlığındaki bant saptanırken, *E.granulosus* için spesifik olan p7 kDa molekül ağırlığındaki bant IHA, IFA ve ELISA ile pozitif olan olguların sırasıyla 60, 62 ve 64'ünde saptandı (Tablo-22).

Tablo- 22: Western blot ile saptanan antijen bantlarının diğer testlere göre dağılımı

Testin Adı		Western Blot test sonuç bantları			
		p39 kDa	p24/26 kDa	p16/18 kDa	p7 kDa
IHA	Pozitif	83	83	64	60
	Negatif	11	10	3	4
IFA	Pozitif	85	85	64	62
	Negatif	10	10	3	5
ELISA	Pozitif	70	70	64	64
	Negatif	23	20	3	1

5. TARTIşMA

Kist hidatik hastalığında tanı koydurucu spesifik klinik bulguların olmaması, hastalığın tanısında klinik bulgulardan çok laboratuvar bulgularından yararlanılmasına neden olmuştur. Diğer taraftan günümüzde hastalığın tedavisinde medikal tedavi yetersiz kalmakta ve cerrahi tedavi tercih edilmektedir. Kistik ekinokokoz hastalığında kanama, kistin patlaması ve bası gibi bazı istenmeyen durumların görülmesi tanının önemini arttırmaktadır. Tanıda radyolojik yöntemlerin yanında hemen bütün serolojik yöntemlerden yararlanılabilmektedir. Kullanılan immunolojik tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıklarının farklı olması ve bazı testlerin %100 güvenilir sonuç verememesi, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan immunolojik tanı yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir (21).

Çalışmamızda teste alınan 163 olgunun 102'si (%62.58) kadın, 61'i (%37.42) erkek olup yaş aralığı 1-84, ortalama yaş ise 39 bulundu. İndirekt hemaglutinasyon (IHA) test sonucuna göre pozitif bulunan 83 olgunun 26'sı (%31.33) erkek, 57'si (%68.67) de kadındı. Bununla birlikte kadınlardaki pozitiflik oranı (%55.9) ile erkeklerdeki pozitiflik oranı (%42.6) istatistiki olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). Karaman ve arkadaşlarının (5) Kars yöresinde IHA ve IFA yöntemleriyle yaptıkları çalışmada pozitifliğin yaş ve cinsiyet ile ilişkisi açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Yine, Kılıç ve arkadaşlarının (22) IHA ve ELISA yöntemleriyle yapmış olduğu çalışmada bulgularımız ile uyumlu olarak pozitifliğin cinsiyet ve yaşla ilişkisi olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte yapılan birçok seroprevalans çalışmasında pozitiflik oranının kadınlarda anlamlı olarak yüksek olduğu belirtilmektedir (30,75,76). Çalışmamızda hastalığın cinsiyet ilişkisi göstermemesinin bölgesel farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda IHA ile pozitif saptanan 83 olgunun 9'u (%10.8) 16 yaşın altında, 39'u (%46.9) 16-45 yaş arasında ve 35'i (%42) de 45 yaşından büyüktü. Diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi kistik ekinokokoz olgularında

kistlerin yıllar içerisinde geliştiği ve semptomların geç ortaya çıkması nedeniyle tanının geç konulması sonucu orta ve ileri yaşlarda hastalığa daha sık rastlandığı bildirilmektedir (22,75-77).

Çalışmamızda çeşitli servislerden kistik ekinokoz ön tanısıyla hasta gönderilmiştir. Olguların çoğunluğu karın ağrısı ile cerrahi servisine başvurmuşlardır. Tatar ve ark.nın (79) çalışmasında olguların çoğunluğunun kist hidatiklerinin karaciğer yerleşimli olduğu ve epigastrik kitle ve hepatomegali ile başvurduğu belirtilmektedir. Aynı çalışmada akciğer yerleşimli olgularda öksürüğün en fazla rastlanılan semptom olduğu belirtilmiştir. Ağaçfıdan ve ark.nın (80) yaptığı çalışmada en yüksek yerleşimin karaciğerde olduğu belirtilmiştir. Birçok çalışmada hidatik kistlerin başta karaciğer olmak üzere, akciğer, beyin, kalp, kemik, böbrek ve dalak gibi vücudun birçok organında görülebildiği bildirilmiştir (3,6,18,19,29). Etken genellikle karaciğerde tutulmakta (özellikle sağ lopta), nadiren akciğer ve diğer organlara yerleşmektedir. Dolayısıyla oluşan semptomlar kistin yerleşimine göre değişmektedir. Çalışmamızda cerrahi olarak kistik ekinokoz olduğu tesbit edilen 71 hastanın %63'ünde karaciğer, %20'sinde akciğer ve %8'inde ise diğer organ tutulumu bulunmaktaydı. Saygı (24) tarafından yapılan bir çalışmada, 6234 kist hidatik vakasından %51.71'nin karaciğer, %38.38'nin akciğer, %4.47'sinin birden fazla organ, %2.46'sının intratorakal ve geri kalan %2.98'inin ise dalak, böbrek, beyin, periton, kas ve kemiğe yerleştiği tespit edilmiştir. Prousalidis ve ark (81) ise karaciğer ve akciğer dışı yerleşimli 49 kist hidatik olgusundan; 25'inin peritoneal kavitede, 10'unun dalakta, 5'nin spinal kordda, 2'sinin retroperitoneal alanda, 1'inin miyokardda, 1'nin toraks duvarında, 1'inin uylukta ve 1'inin de batin önduvarında yerleştiğini tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kırsal kesimden gelen hastalarda pozitiflik oranının merkezden gelenlere göre yüksek olduğu görülmüştür. *E.granulosus*'un yaşam döngüsü dikkate alındığında ara konak olan koyun ve kesin konak olan köpeklerin barındığı kırsal kesimin hastalık için uygun bir alanı oluşturduğu düşünülmektedir. Çakan ve ark. nın (82) çalışması da çalışmamız ile benzer özelliktedir. Ancak, Tatar ve ark.nın (79) çalışmasında pozitif olguların çoğunluğunun şehirde bulunduğu ve bunun kırsal kesimden kente göç ile açıklanabileceği belirtilmektedir.

Çalışmada üç farklı serolojik yöntemle kistik ekinokoz ön tanılı serumlarda antikor araştırılmış, bunların duyarlılığı ve özgüllüğü, altın standart olarak kabul edilen

Western blot yöntemine göre araştırılmıştır. Buna göre IHA ve IFA testlerinin duyarlılığı ELISA yöntemine göre daha yüksek (sırasıyla %89, %90, %79), ancak özgüllük ELISA yönteminde IHA ve IFA yöntemlerinden daha yüksek (sırasıyla %100, %95, %93) saptanmıştır. Duyarlılığın bu testlerde düşük olması Western blot sonuçlarıyla ilgilidir. Western blot yönteminde kesin pozitifliği gösteren p7 kDa bandı hasta grubunda olguların sadece 66'sında görüldü. Yirmi üç olgu ise üretici firmanın önerileri doğrultusunda p16/18, p24/26 ve p39 kDa bantların varlığı nedeniyle şüpheli yada sınırda olup bu serumlar istatistiksel hesaplamalarda pozitif olarak değerlendirildi. Yapılan çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar verilmektedir. Şener ve ark.nın (21), IFA ve ELISA ile yaptığı çalışmada ELISA'nın özgüllüğü %70, duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada IFA yönteminde germinal membran kesit antijenleri kullanıldığında protoskoleks antijenlerine göre daha yüksek duyarlılık (%100) elde edildiği belirtilmiştir. Akısu ve ark.nın (29) çalışmasında ise akciğer kist hidatiği olduğu cerrahi olarak doğrulanmış 31 hasta, akciğer kist hidatiği dışında diğer akciğer hastalığı tanısı almış 18 hasta ve ayrıca 10 sağlıklı insan serumu olmak üzere toplam 59 serumda IHA, ELISA ve Western Blot (WB) testleri uygulanmış, IHA, ELISA ve WB testlerinin duyarlılığı sırasıyla %96.7, %87.1 ve %100 olarak bulunurken, bu testlerin özgüllükleri %82.2, %89.2 ve %85.7 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada da bizim çalışmamızla benzer olarak IHA testinin duyarlılığı yüksek bulunmuştur. Klinik ve radyolojik olarak Kistik ekinokokoz düşünülen 47 hastada yapılan bir tez çalışmasında Ekinokok IHA testinin sensitivitesi (duyarlılık): %93.5, spesifitesi (özgüllük): %93.8, pozitif prediktif değeri: %96.6, negatif prediktif değeri: %88.2 bulunmuştur (33). Picardo ve ark.ları (83) IHA ile %83.3 duyarlılık, %99 özgüllük; Koç ve ark.ları (76) %90.5 duyarlılık, %90 özgüllük saptamışlardır. Yine Kılıç ve ark.nın (74) ELISA, IHA ve Western blot doğrulama testi ile 93 veteriner hekimde yaptığı çalışmada IHA ile %81.2, ELISA ile %76.5 pozitiflik saptanmış, yöntemler arasında antikor saptama açısından fark saptanmadığı ve yöntemler arasındaki uyumun tanıyı desteklemeye ve postoperatif hasta takibine katkı sağlayacağı bildirilmiştir.

Çalışmamızda IHA ile test edilen 163 olgudan 83 hastanın serumunda 1/160 veya daha yüksek titrede antikor saptandı. Bunların 16'sı 1/160, 14'ü 1/320, 52'si 1/640 ve 1'i de 1/1280 titrede olduğu görüldü. Özellikle karaciğer hidatik kistlerinde antikor titreleri 1/320 ve üzeri saptanırken karaciğer dışı hidatik kist olgularında düşük düzeyde

pozitiflik bulunmaktaydı. Kuru ve ark.ları (84), İHA testinin akciğer yerleşimli olgularda daha az duyarlı olduğunu, inaktif veya kalsifiye kistlerde yalancı negatiflikler gösterebildiğini; bundan dolayı diğer bir serolojik yöntemle desteklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda operasyonel olarak doğrulanan olgular içerisinde akciğer yerleşimli 20 olgunun sadece birinde İHA ile, üçünde ise İFA ve ELISA ile negatiflik saptandı.

Serolojik testlerde yalancı negatiflik olabileceği gibi yalancı pozitiflik te saptanabilmektedir. Zarzosa ve ark.nın (57) cerrahi olarak hidatidoz olduğu doğrulanan 79 hastanın post-op tanısında lateks aglutinasyon, pasif hemaglutinasyon, immunoelektroforez ve spesifik ELISA testleriyle yapmış olduğu çalışmada, en fazla yalancı pozitifliğin *T.saginata* ve *T.solium* sistiserkozis enfeksiyonlu hastalarda ve lenfoma ve lösemi hastalarında olduğu bildirilmiştir. Ancak Nijeruh ve ark.(85), İHA ve ELISA yöntemiyle cerrahi olarak kanıtlanmış 40 kist hidatik olgusu, 40 normal kontrol ve 8 çengelli solucan, 5 teaniasis, 10 schistosomiasis, 15 malaria, 12 visseral leishmaniasis, 3 multipl myeloma, 6 sifiliz ve 10 gonore'li ve değişik parazitler enfeksiyon ve diğer enfeksiyonlu hasta serumları ile karşılaştırmalı çalışmalar yapmışlar, sağlıklı kişilerde veya parazitik ve bakteriyel enfeksiyon bulunan serumlarda yalancı pozitiflik ve çapraz reaksiyon gözlememişler, lipoprotein antijenin bu testlerde %100 spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Kenya'da yapılan başka bir çalışmada ise insan kistik ekinokokoz olgularının tanısında kist hidatik sıvısı antijen olarak kullanılmış ve bu antijenle kullanılan İHA yönteminin yüksek duyarlılık ve spesifik olduğu belirtilmiştir (86). Kuman (11), kist hidatik tanısında eritrositleri tannik asitle hassaslaştırılıp uyguladığı İHA yöntemi ile 16 olguda 1/640-1/2560 gibi yüksek sulandırılmalarda %100 olumlu sonuçlar alıp, olguları operasyonla doğrulamıştır. Dolayısıyla testlerin duyarlılık ve özgüllüğünde, kullanılan antijenin, yöntemin duyarlılığında büyük önemi bulunmaktadır.

Çalışmaya kontrol olarak alınan 30 adet kan donörünün 2'si 1/160 titre ile pozitif, diğerleri negatif olarak değerlendirildi. Pozitif saptanan 2 kontrol olgusunun biri Western blot testinde negatif, diğeri ise şüpheli pozitif olarak değerlendirildi. Şüpheli pozitif olarak değerlendirilen olguda p39 ve p24/26 bantları bulunmaktaydı. İFA ve ELISA ile kontrol grubunda pozitifliğe rastlanmadı.

Çalışmamızda Protoskoleks kesit antijenlerinin kullanıldığı IFA testine alınan 163 serumun 85'i pozitif. Hasta serumlarının biri 4 pozitif, 34'ü 3 pozitif, 20'si 2 pozitif ve 25'i de 1 pozitif olarak değerlendirildi. Yüksek düzeyde floresans veren serumlar IHA sonuçlarında da olduğu gibi karaciğer olgularıydı. Şener ve arkadaşlarının (21) yaptığı bir çalışmada, operasyonla kist hidatik 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 negatifliğin saptandığı belirtilmekte, germinal membran ile hazırlanan IFA yönteminin özgüllüğü %100, duyarlılığı %100; bütün skoleks ile hazırlanan IFA yönteminin özgüllüğü %80, duyarlılığı %95; kesit skoleks ile hazırlanan IFAT yönteminin özgüllüğü %97, duyarlılığı %100 olarak hesaplanırken, çalışmada kullanılan ELISA'nın ise özgüllüğü %72, duyarlılığı %100 olarak belirtilmektedir.

Çalışmamızda operasyonel olarak doğrulanmış 71 olgunun 11'inde IHA testi ile, 13'ünde ise IFA ve ELISA ile negatif sonuç elde edildi. Bu olguların çoğu aynı kişiler olup yine çoğu kistin karaciğer dışı yerleşimliydi. Bu durum, karaciğer dışı kist hidatik olgularında immün sistemin yeterince uyarılmadığını düşündürmektedir.

Çalışmada Western blot yöntemiyle saptanan pozitif olgularda hangi antijen bantlarına karşı antikor geliştiği ile bunun biyokimyasal ve kistin yerleşimiyle ilişkisi incelenmiştir. Radyolojik yöntemle ve operasyon sonucu belirlenen kist lokalizasyonu ile antijen bantları arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Yine tüm olguların biyokimyasal özellikleri araştırılmış, olguların çoğunda parametreler normal sınırlar içerisinde bulunmuştur. Önem arzeden az sayıda olgudan; anemisi olan 6 olgunun 5'inde tüm bantlar pozitif saptanırken, 1'inde sadece p 39 kDa ve p 24/26 kDa molekül ağırlığındaki bantlar pozitif saptanmıştır. Karaciğer fonksiyon enzimleri (AST ve ALT) yüksek olan 2 hastada ve C-Reaktif Protein (CRP) yüksek olan 1 hasta ile eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) yüksek olan 1 hastada tüm bantlar pozitif saptanmıştır. Dolayısıyla test sonuçları ile biyokimyasal parametreler arasında da anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Western blot yönteminde kullanılan antijenlerin önemi bulunmaktadır. Akısu ve ark. nın (29) çalışmasında Western blot ile en değerli üç bantın 8-12 kDa, 24 kDa ve 124 kDa moleküler ağırlığında olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız kit'te p7 kDa antijen bulunmakta ve bunun pozitifliği *E.granulosus* için yüksek düzeyde

spesifik olarak kabul edilmektedir (29). Yine testimizde bulunan p 16/18 kDa ve p24/26 kDa antijenlerin varlığı da pozitiflikte önemlidir. Çalışmamızda Western blot testinde antijen bantlarının varlığı ile serolojik yöntemler arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Ancak ELISA ile pozitif saptanan 70 olguda p39 kDa bantın varlığı ve diğer yöntemlerde pozitifliğin daha yüksek olması (IHA ile 83, IFA ile 85) ELISA kitinde bu antijenin yeterli bulunmadığını düşündürmektedir. Nonspesifik olarak kabul edilen p39 kDa antijeninin varlığının çapraz reaksiyonlara yol açabileceği, bu durumun ELISA kitinde özgüllüğün yüksek (%100) oluşunun nedeni olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kistik ekinokokoz tanısında radyoloji ile seroloji birlikte değerlendirilmelidir. Uygulanan tedavinin takibinde de serolojik test sonuçlarının değerli olması nedeniyle kullanılan bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin ve test sonuçlarını etkileyen faktörlerin bilinmesi son derece önemlidir.

Çalışmada IHA ile kistik ekinokokoz tanısı alan olgularda hastalığın cinsiyet ile ilişkisi olmadığı, ancak 16-45 yaş grubunda pozitifliğin yüksek olduğu görüldü.

Kistik ekinokokoz ön tanısıyla bölümümüze gönderilerek çalışmaya alınan olguların çoğu (%58.5) cerrahi servislerinden gelmekte olup, %70'i karaciğer yerleşimliydi. Olguların 105'inde (%64.42) karın ağrısı, 41'inde (%25.15) öksürük ve nefes darlığı yakınması saptandı. Hastalık semptomları kistin lokalizasyonuna göre değişmekteydi.

Çalışılan 163 serum örneğinin 83'ünde IHA yöntemi ile (%50.92), 85'inde ise IFA yöntemiyle (%52.15) *E.granulosus*'a karşı IgG tipi antikor tesbit edilirken bu oran ELISA testi ile olguların 70'inde (%42.95) pozitif olarak tesbit edildi.

Kontrol amacıyla 30 kan donörü serumu kullanıldı. Kan donörlerinde IHA yöntemi ile pozitif bulunan 2 olgunun biri WB yöntemi ile şüpheli/sınırdaki pozitif, diğeri ise negatif saptandı. Diğer tüm serumlar her üç yöntemle negatif saptanıp Western blot yöntemiyle doğrulandı.

Western blot testi ile çalışmaya alınan 163 serum örneğinin 89'u pozitif olarak değerlendirildi. Olguların 66'sında (%40.49) *E.granulosus* için spesifik olan p7 kDa bandı tesbit edildi. Altmış sekiz (%41.72) serum örneğinde p 16/18 kDa bandı, 89 serum örneğinde p 24/26 kDa bandı ve yine pozitif serum örneklerinin tümünde p39 kDa bandı tesbit edildi.

Western blot yöntemi referans olarak alındığında IHA yönteminin duyarlılığı %88.76 özgüllüğü %94.59, IFA yönteminin duyarlılığı %89.89 özgüllüğü %93.24, ELISA yönteminin duyarlılığı %78.65 ve özgüllüğü ise %100 saptandı.

Western blot yönteminde reaktif antijen bantları ile biyokimyasal parametreler ve kistin yerleşimi arasında anlamlı farklılık saptanamadı.

Sonuç olarak kistik ekinokokoz düşünülen hastalarda serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllük yönünden birbirine fazla bir üstünlüğü olmadığı, ancak uygulama kolaylığı ve ekonomik oluşu göz önüne alındığında IHA yönteminin kistik ekinokokoz tanısında kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle Western blot testi, tanı konulamayan olgularda doğrulama amacıyla kullanılabilir. Ayrıca çeşitli antijen bandlarına karşı oluşan antikorların yapısını incelemek amacıyla çeşitli araştırmalarda uygulanabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Sırmalı M. Akciğer Kist Hidatikleri ve Cerrahi Tedavisi. Tıp Araştırmaları Dergisi, 2005;3(3):46-9.
2. Şahin İ. Sestod'lar. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed; Ustaçelebi Ş. 1999;1241-52.
3. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Patolojisi. İnsanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan hastalıkları. 5. baskı, İstanbul, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları. 1995;(15)411-53.
4. Jones T. Cestodes (Tapeworms). Ed. Mandell LG, Douglas RG, Bennet JE. Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed, New York, Churchill Livingstone, 1990;2151-6.
5. Karaman Ü, Miman Ö, Kara M, Gıcık Y, Aycan ÖM, Atambay M. Kars bölgesinde hidatik kist prevalansı. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2005;29(4):238-40.
6. Merdivenci A, Aydınlikoğlu K. Hidatidoz (hidatik kist hastalığı) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1982:319-22.
7. Langer B, Gollinger S. Cystic disease of the liver. In: Surgery of the alimentary tract. Volume III, Edited by Zuidema GD. Philadelphia, W.B. Saunders Co. 1996;531-2.
8. Altınbaş K. Tıbbi Parazitoloji, 2.baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002:250-8.
9. Karaman Ü, Aycan MÖ, Atambay M, Miman Ö, Daldal. N. Malatya temizlik işçilerinde anti-ekinokok antikorlarının araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2005;29(4):244-6.
10. Atlas K. Doku helmintleri. İn: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyoloji (3. baskı). İstanbul, Nobel Tıp, 2008;2629-38
11. Kuman HA. İndirekt Hemagglütinasyon, Eds; Özcel MA, Altıntaş N. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no 15, İzmir, 1997;193-214.

12. Özcel MA, Üner A, Ertuğ S. Immunofloresans Yöntemi, Eds; Özcel MA, Altıntaş N. Parazit hastalıklarında tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No 15, İzmir, 1997; 215-40.
13. Ak M. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Eds; Özcel MA, Altıntaş N. Parazit hastalıklarında tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No 15, İzmir, 1997;241-60.
14. Bulut H., Doymaz MZ. Blotlama teknikleri ve mikrobiyolojide kullanımları. Ed: Durmaz R. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. Malatya, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001;123-37.
15. Altıntaş N, Yolasığmaz A. Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE, Ed: Özcel MA, Altıntaş N. Parazit hastalıklarında tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15, İzmir, 1997:321-42.
16. Demirel F, Dökmen Yavuz A, Söğüt A, Tomaç N. Ayın Olgusu. Türk Pediatri Arşivi. 2002;232-3
17. Kurt Y, Sücüllü Q, Filiz AQ, Urhan M, AkRn ML. Case report pulmonary echinococcosis mimicking multipl lung metastasis of breast cancer: The role of fluoro-deoxy-glucose positron emission Tomography. World J Surg, 2008;6-7.
18. Kaypmaz A. Hidatik kist: Epidemiyoloji, bulaşma ve korunma yolları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi No 28, 2002;285-99.
19. Çetin ET, Anğ Ö, Töreci K. Tıbbi Parazitoloji: Protozoonlar, helmintler, artropotlar, 5.baskı. İ.Ü.Basımevi ve Film Merkezi, ÜniversiteYayın No 3890, İstanbul, 1995:237-58.
20. Garcia HH., Jimenez JA, Escalante H, Cestodes. Ed: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, 9th. Edition, ASM Press,Washington, D.C, 2007:2166-74.
21. Şener S, Yazar S, Şahin İ., Cystic echinococcosis'in indirekt fluoresan antikor testi ile tanısında kullanılan antijenlerin tanı değerlerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2004;13(1):1-6.
22. Kılıç S, Babür C, Taylan Özkan A. Kist hidatik ön tanılı olgularda indirek hemaglutinasyon ve elisa yöntemleri ile alınan sonuçların karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 2007;41;571-77.
23. Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakaya K, Nakao M, Lightowers MW, et al. Usefulness of Hydatid Cyst Fluid of *Echinococcus granulosus* developed in

- mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. Clin Diagn Lab Immunol, 2002;9(3):573-76.
24. Saygı G. Hidatidosis in Turkey within the last fourteen years (1979-1993). Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, Sivas, 1996;5-8.
 25. Saidi F, Sayek İ. Karaciğer kist hidatiği, Temel Cerrahi cilt 2, Editör Sayek İ. 2. baskı, Ankara, Güneş kitapevi, 1996;1239-45.
 26. Gönlügür U, Gönlügür T E, Akkurt İ. Ekinokok antijenleri. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Derleme 162, Akciğer Arşivi No 5:2004;162-4.
 27. Ito A, Ma L., Schantz P M, Gottstein B, Liu YH, Chai JJ. Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (em18). Am J Trop Med Hyg, 1999;60(2):188-92.
 28. Reuter S, Jensen B, Buttenschoen K, Kratzer W, Kern P. Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: a comparative study and review of the literature. J Antimicrob Chemother, 2000;46:451-6.
 29. Akısu Ç, Bayram Delibaş S, Yuncu G, Aksoy Ü, Özkoç S, Biçmen C. Akciğer hidatidozunun tanısında IHA, ELISA ve Western Blot testlerinin değerlendirilmesi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi, 2005;53(2):156-60.
 30. Bayram Delibaş S, Özkoç S, Şahin S, Aksoy Ü, Akısu Ç. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı'na kistik ekinokokkozis şüphesiyle başvuran hastaların değerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2006; 30(4):279-81.
 31. Sunita T, Dubey M.L, Khurana S, Malla N. Specific antibody detection in serum, urine and saliva samples for the diagnosis of cystic echinococcosis. Acta Trop, 2007; 101:187-91.
 32. Li J, Zhang WB., Mcmanus DP. Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic echinococcosis. Biol. Proced. 2004;6(1):67-77.
 33. Erkan HD. Akciğer kist hidatiğinde serolojik testlerin (spesifik IgE, spesifik IgG ve indirekt hemaglutinasyon testi) tanısal değeri. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 2004;7-11.
 34. Zhang W, Li J, Mcmanus D.P., Concepts in Immunology And Diagnosis Of Hydatid Disease. Clin Microbiol Rev. 2003;18-36.

35. Ammann RW, Eckert J. Cestodes. *Echinococcus*. Gastroenterol Clin Biol. 1996;25:655-89.
36. <http://med.ege.edu.tr/Image/enfeksiyon/PDF/karacigerinparaziterenfestasyonlari.pdf>
37. Köktürk O. Akciğer hidatik kist hastalığı. Ed. Ekim N, Uçan ES. Solunum sistemi infeksiyonları. Toraks Derneği Yayın Organı, Ankara, 2001:557-604.
38. Altınbaş K. Tıbbi Parazitoloji, 2.baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002:250-8.
39. Talu U, Bozan ME, Temelli Y, *Echinococcus alveolaris* osteomyeliti: Olgu sunumu. Acta Orthop Traumatol Turc, 2000;34:198-203.
40. Dinkel A, Nickisch-Rosenegk M V, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. J Clin Microbiol, 1998;187:1-6.
41. Gökırmak F, Helmintoloji, Kılıçturgay K, Gökırmak F, Töre O, Göral G, Helvacı S, Ed.; Kılıçturgay K, Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, 1.baskı, Bursa, Onur Yayıncılık, 1992:313-6.
42. Sarciron ME, Delabre I, Walbaum S, Raynaud G, Petavy AF. Effects of multiple doses of isoprinosine on *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother. 1992;19:1-4
43. Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin Microbiol Rev. 1992;5:248-61.
44. Wangoo A, Ganguly NK, Mahajan RC. Specific T cell cytotoxicity in experimental *Echinococcus granulosus* infected mice. Indian J Med Res. 1987;86:588-90.
45. Ali Khan Z, Rausch RL. Demonstration of amyloid and immune complex deposits in renal and hepatic parenchyma of Alaskan alveolar hydatid disease patients. Ann Trop Med Parasitol. 1987;81:381-92.
46. Rickard MD. Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. Latex agglutination and immunoelectrophoresis using crude cyst fluid antigen. Pathology. 1984;16:207-10.
47. Sahip N, Uysal H, Öztoprak A. 1993-2000 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesinde incelenen kist hidatik ön tanıli olguların serolojik sonuçları. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2001; 25: 236-8.

48. Shambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibody responsesin asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Trop.* 1997;64:53-63.
49. Evengard B, Hammarstrom L, Smith CI, Johansson SG, Linder E. Subclass distribution and IgE responses after treatment in human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol.* 1988;73:383-8.
50. Karaman Ü, Atambay M, Aycan ÖM, Daldal N. İndirekt hemaglütinasyon tekniğinde (IHA) insan, inek ve koyun antijenlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2002; 26: 251-3.
51. Gökçen A. Kist hidatik ve aş. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2000; 24: 419-25
52. Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996;24:205-11.
53. Porette D, Felleisen E, Grimm F, Pfister M, Teuscher F, Zuercher C, et al.. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:193-8.
54. Lightowers MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;37:171-82.
55. Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VC. A specific diagnostic antigen of *E. granulosus* with apperent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40:377-83.
56. Sbihi Y, Rmiqui A, Rodriguez-Cabezas MN, Orduna A, Rodriguez-Tores A, Osuna A. Comparative sensitivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purified antigen in hydatidosis. *J Clin Lab Anal.* 2001;15:14-18.
57. Zarzosa MP, Domingo AO, Gutierrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, et al. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;35:255-62.
58. Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;25:143-54.
59. Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IM, Kamboj MS, Mehta SK, Vinayak VK. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognized by immunoblotting. *J Med Microbiol.* 1992;36:46-51.

60. Yazar S, Altıntaş N. Cystic echinococcosis (CE)'in serolojik tanısında karşılaşılan çapraz reaksiyonların araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 1999;23:129-32.
61. Ramos G, Orduna A, Garcia-Yuste M. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. World J Surg. 2001; 25:46-57.
62. Köksal F, Serin MS, Kekeç Y, Sadr YE. İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS-PAGE metoduyla analizi ve Westernblot metodunun klinik önemi. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 1995;19:221-229.
63. Chandrakesan SD, Parija SC. Latex agglutination test for antigen detection in the cystic fluid for the diagnosis of cystic echinococcosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;45:123-6.
64. Parija SC. A review of some simple immunoassays in the serodiagnosis of cystic hydatid disease. Acta Tropica. 1998;70:17-24.
65. Ravinder PT, Parija SC, Ra KS. Evaluation of human hydatid disease before and after surgery and chemotherapy by demonstration of hydatid antigens and antibodies in serum. J Med Microbiol. 1997;47:59-64.
66. Kuman HA. Kompleman fiksasyon reaksiyonu, Ed: Özcel MA, Altıntaş N. Parazit hastalıklarında tanı Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15, İzmir, 1997:183-92.
67. Altıntaş N, Korkmaz M. İmmundiffüzyon ve immunelektroforez. Ed: Özcel MA, Altıntaş N, Parazit hastalıklarında tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15, İzmir, 1997:261-92.
68. Altıntaş N, Yazar S. Western blot (immunoblotting). Ed: Özcel MA, Altıntaş N, Parazit hastalıklarında tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15, İzmir, 1997:343-72.
69. Leggatt GR, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *E. granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. Trop Med. Hyg.1992 (86);189-92.
70. Siracusano A, Ioppolo S, Notargiacomo S, Ortona E, Rigano R, Teggi A, et al. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by immunoblotting. Trop Med Hyg, 1991 (85);239-43.
71. Ertabaklar H, Altıntaş N. Observation of in vitro larval development of *E. granulosus* protoscoleces, Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2002;26(2):183-5.

72. Yazar S, Taylan Özkan A, Hökelek M, Polat E, Yılmaz H, Özbilge H. Türkiye'de 2001-2005 yılları arasında *kistik ekinokokkozis*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2008;32 (3):208-20.
73. Toparlak M, Tüzer E: Veteriner Helminтологи. İstanbul Üniv. Veteriner Fakültesi. Parazitoloji Anabilim Dalı. Ders Notları, 1997:39-41.
74. Kılıç S, Doğruman Al F, Çelebi B, Babür C. Veteriner hekimlerde kistik ekinokokkozis seroprevalansının araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2007;31(2):109-11.
75. Aksoy Ü, İnci A. Kistik ekinokokkozisin serolojik tanısında in-house enzim immün yöntemi ve indirekt hemaglutinasyon yönteminin kullanılması. Mikrobiyol Bülteni. 2004;38:245-51.
76. Koç NA, Kılıç H, Sözüer E, Taheri JD. Kist hidatik tanılı olgularda indirekt hemaglutinasyon yönteminin önemi ve seropozitiflik oranı. Türk Parazitoloji Dergisi 1996;20:57-60.
77. Karaman Ü, Daldal N, Atambay M, Özlem MA. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinde 1999-2002 Tarihleri Arasında İncelenen Hidatik Kist Ön Tanılı Olguların Serolojik Sonuçları. İnönü Üniv Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;233-5.
78. Arıbaş BK. Karaciğer kist hidatiklerinin tanısında ultrasonografinin yeri ve önemi. Süleyman Demirel Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi. 2000;7 (1):35-9.
79. Tatar D, Yılmaz Güneş E, Berktaş Ö, Perim G. Akciğer kist hidatiği tanılı çocuk olgularımız. Akciğer Arşivi. 2003;4:31-5.
80. Ağaçfıdan A, Badur S, Hazar H, Emre A, Çetin ET. Kist hidatik tanısında indirekt hemaglutinasyon ve enzim immünoessey testlerinin karşılaştırılması. Klimik Dergisi. 1992;5(2): 43-5.
81. Prousalidis J, Tzardinoglou K, Sgouradis L, Katsohis C, Aletras H. Uncommon sites of hydatid disease. World J Surg. 1998;22:17-22.
82. Çakan A, Çağrııcı U, Veral A, Bilkay Ö. Results Of The Sugical Treatment Of Pulmonary Hydatidosis İn Ege University Medical Faculty. Türkiye Ekopatoloji Dergisi 2001;7:7-12.
83. Picardo NG, Guisantes JA. Comparison of thre immunological tests for seroepidemiological purposes in human echinococcosis. Parasite Immunol. 1981;3:191-9.

84. Kuru C, Baysal B. uniloküler kistik ekinokokozisin tanısında indirekt hemaglütinasyon yönteminin değeri. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 1999;23:251-4.
85. Nijeruh FM, Okela GB, Gatuma JM. Usefullnes of indirect haemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of human hydatidosis. East Afr Med J. 1989;66 (5):310-4.
86. Nijeruh FM, Gatuma JM, Okela GB, Tumbon-Oeri AG. Diagnosis of human hydatid disease in surgically confirmed cases by the use of the indirect haemagglutination test based on a termo-stable lipoprotein and unfractioned hydatid cyst fluid. Ann Trop Med Parasitol. 1989;83(3):299-303.