

Kistik Ekinokokkoz Tanısında İndirekt Fluoresan Antikor Testinin Önemi

The Importance of Indirect Fluoresan Antibody Test in the Diagnosis of Cystic Echinococcosis

Dr. Nezahat AKPOLAT,^a
Dr. Ercan GEDİK^b

^aMikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
^bGenel Cerrahi AD,
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Diyarbakır

Geliş Tarihi/Received: 08.07.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 12.11.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Nezahat AKPOLAT
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Diyarbakır,
TÜRKİYE/TURKEY
nakpolat@dicle.edu.tr

ÖZET Amaç: Kistik ekinokokkoz (KE), *Echinococcus granulosus* larval formunun neden olduğu enfeksiyon hastalıklarından biridir. Hastalık hayvancılığın yaygın olduğu Asya, Afrika, Güney Amerika gibi yerlerde yaygındır. Özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde daha sık görülmektedir. Klinik özellikleri özgül değildir. Tanıda birçok serolojik teknik kullanılmaktadır. Bu tekniklerin duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan antijenin kalitesine bağlıdır. Bu çalışmada, indirekt floresan antikor (IFA) testinin KE tanısında kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışma, Mayıs 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı ile Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı tarafından yürütüldü. Çalışmada KE tanısı almayan 54 olgu ve klinik ve radyolojik olarak KE tanısı almış, daha sonra ameliyat edilmiş 77 olgu serumu çalışıldı. Yüz otuz bir serum örneğinde IFA testi ile spesifik IgG antikor araştırıldı. Antijen olarak dondurulmuş protoskoleks kesitlerinin kullanıldığı "Anti-*Echinococcus granulosus* IIFT" ticari kitleri ile çalışıldı. **Bulgular:** Laboratuvara gönderilen 131 serum örneğinde *E. granulosus* IgG antikor araştırıldı. Serum örneklerinin 81 (%61.83)'i seropozitif, 50 (%38.16)'si ise seronegatif bulundu. Seksen bir seropozitif olgunun 70 (%86.41)'i radyolojik ve klinik olarak KE tanısı almış, 11 (%13.58)'i ise KE tanısı almayan olgulardı. Seronegatif olgulardan 7'si KE tanısı alan bireylere ait serumlardı. Yaş ortalaması 35.78 (8-83) yıl olan KE'li 77 olgunun 55 (%71.42)'i kadın, 22 (%28.57)'si erkek olup, %93.5'inde enfeksiyonun karaciğer yerleşimli olduğu saptandı. IFA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %91.6 ve %83.0 saptandı. Pozitif ve negatif kestirici değerleri ise sırasıyla %87,0 ve %88,5 bulundu. **Sonuç:** İFA testi özellikle karaciğer yerleşimli KE'de duyarlı ve özgül bir testtir. Kolay uygulanabilir olması ve kısa sürede sonuç vermesi ayrıca avantajlarıdır. Bu testin, rutin laboratuvarlarda, KE enfeksiyonunda, radyolojik yöntemlerle birlikte tanıya destek olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Echinococcus granulosus*; indirekt floresan antikor testi; ekinokokkozis

ABSTRACT Objective: Cystic echinococcosis (CE) is a widespread human infection caused by the larval stage of the taeniid tapeworm *Echinococcus granulosus*. The disease is well known in sheep-herding areas of Asia, Africa and South Central America. This parasitic infection is relatively frequent around the Mediterranean Sea. The clinical features are non-specific. Many serologic techniques can be used to detect or quantify humoral immunity. Their sensitivity and specificity, depending on the quality of antigens, are well known. The aim of this study was to evaluate the utility of indirect immunofluorescent-antibody assay in the diagnosis of CE. **Material and Methods:** This study was conducted in the Microbiology Department of the Dicle University Medical Faculty and General Surgical Unit of the same hospital between May 2006 and June 2008. In this study, we evaluated the serum samples of 54 non-CE patients and 77 serum samples of patients with a clinical and radiological diagnosis of CE and who were operated later. The specific IgG antibody was investigated in 131 serum samples by indirect immunofluorescent-antibody assay. The study was performed by "Anti-*Echinococcus granulosus* IIFT" commercial kit using the frozen sections of *Echinococcus* larvae. **Results:** *E. granulosus* IgG antibodies were investigated in 131 serum samples. Of the samples, 81 (61.83%) were seropositive and 50 (38.16%) were seronegative. Among 81 serum samples which were serologically positive, 70 (86.41%) were from patients with a radiological and clinical diagnosis of CE and 11 (13.58%) were from patients without a previous diagnosis. Seven seronegative samples were from CE patients. The mean age of the patients was 35.78 (8-83) and of the 77 CE patients, 55 (71.42%) were female, 22 (28.57%) were male; the infection was localized in the liver in 93.5% of the cases. The sensitivity and the specificity of the IFA were 91.6% and 83.0% respectively. The positive and negative predictive values of the test were 87% and 88.5%, respectively. **Conclusion:** Indirect immunofluorescent-antibody assay is a sensitive and specific test, especially in liver-localized CE. The assay is easy to run and provides an advantage of rapid diagnosis. The test may be used confidently along with radiological diagnostic methods.

Key Words: *Echinococcus granulosus*; fluorescent antibody technique, indirect; echinococcosis

E*chinococcus* enfeksiyonları insan helmint enfeksiyonları arasında en tehlikeli olanlarındandır. Dünyanın birçok ülkesinde görülen enfeksiyon halk sağlığını ve ekonomiyi etkilemektedir.¹⁻⁴ Ülkemizde her bölgede görülebilen hastalığın prevalansı 1998 yılı çalışmasında 100.000'de 291 olarak verilmiştir.⁵ *Echinococcus granulosus* yaşam döngüsünü evcil ve yabani etobur ve otobur hayvanlar arasında sürdürmektedir. İnsanlar bu halkaya rastlantısal olarak girmektedir. Başta köpekler olmak üzere, etoburların bağırsağındaki erişkin *E. granulosus*'lardan kopan ve bol yumurta içeren gebe halkalar veya serbest yumurtalar dışkı ile dış ortama atılmaktadır. Enfeksiyon, ara konak olan otoburlara ve insanlara yumurtaların ağız yoluyla alınması ile geçmektedir. Bulaş, plasenta ve solunum yolu ile de mümkündür. Mide ve bağırsaklardaki enzimlerin etkisi ile serbestleşen embriyonlar bağırsak mukozasını delerek, mezenterik dolaşıma katılıp, portal ven yolu ile karaciğere gelmektedir. Karaciğerde tutunamayan embriyonlar akciğerlere ve az bir kısmı da kalbin sistemik arteriyel dolaşımına katılarak böbrek, dalak, kas ve beyin gibi organlara yerleşebilmektedir.⁶⁻⁸ Kist hidatiğin en sık görüldüğü organ %50-70 oranı ile karaciğerdir.^{9,10} Hastalığın tedavisinde medikal tedavi yetersiz olup, cerrahi uygulamaların bazı komplikasyonları beraberinde getirmesi ve nükslerin sık görülmesi enfeksiyonun önemini artırmaktadır.^{6,11} Hastalığın semptomları parazitin yerleştiği organa, büyüklüğüne ve olgunun bağırsıklık direncine bağlı olarak değiştiğinden, klinik teşhis kolay değildir. Tanı radyolojik yöntemlerle konulmaya çalışılmasına rağmen kistin tümör, apse, basit kist gibi diğer yer kaplayan olgularla ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve operasyon sonrası nükslerin daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için ön tanının serolojik tanı yöntemleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca, asemptomatik kist taşıyıcıların belirlenmesi hastalığın toplumdaki yaygınlığını ve varsa kontrol programı etkinliğini göstermek amacıyla serolojik testler kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan çeşitli serolojik testler mevcuttur.^{6,12,13} Testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü kullanılan antijenin kalitesine bağlıdır. Antijenler ara konak olan otoburların, nadiren de insanların fertil karaciğer hidatik kistlerinden elde

edilmektedir. Akciğer kistlerinden elde edilen antijenlerin daha zayıf antijenler olduğu bildirilmektedir.¹³ Serolojik tanıda genel olarak kullanılan iki antijen bulunmaktadır. Protoskoleksler ve skoleks kesitleri ile kist sıvılarından hazırlanmış solubl antijenlerdir.^{13,14} *E. granulosus* protoskolekslerinden hazırlanmış rekombinant antijenler de bulunmaktadır.^{15,16}

Bu çalışmada, radyolojik ve klinik olarak kistik ekinokokkozis (KE) tanısı almış olgularda indirekt fluoresan antikor (İFA) testiyle spesifik immünglobulin (Ig) G antikoru araştırılmıştır ve yöntemin KE tanısında kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mayıs 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen hidatik kist ön tanılı olgulardan alınan serum örneklerinde İFA testi ile *E. granulosus* IgG antikoru araştırılmıştır. *E. granulosus* larva kesitlerinin sabitlendiği lameller üzerine, dilue edilmiş olgu serumları ilave edilmiştir. İnkübasyondan sonra ikinci adımda, pozitif reaksiyonlardaki antijen-antikor kompleksini görünür hale getirmek için floresein ile işaretlenmiş anti-human antikorları ile inkübe edilerek fluoresan mikroskopunda incelenmiştir. Antijen olarak dondurulmuş protoskoleks kesitlerinin kullanıldığı "Anti-*Echinococcus granulosus* IIFT" ticari kitleri ile çalışıldı. Üretici firmanın test tanımlamasına göre; 1/100 ve üstü reaksiyonlar fluoresan mikroskopunda (Zeiss) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Test sonucu seropozitif saptanan olgular takibe alınmış olup, genel cerrahi kliniği ile iş birliği yapılmıştır. Seropozitif saptanmış 70 olguya radyolojik ve klinik olarak KE tanısı konmuş ve bu olgular daha sonra ameliyat edilmiştir.

BULGULAR

Laboratuvara gönderilen 131 serum örneğinde *E. granulosus* IgG antikoru araştırılmıştır. Serum örneklerinin 81 (%61.83)'i seropozitif, 50 (%38.16)'si seronegatif olarak bulunmuştur. 81 seropozitif olgunun 70 (%86.41)'i radyolojik ve klinik olarak KE tanısı almış, 11 (%13.58)'i ise KE tanısı almayan ol-

gulardır. Seronegatif olgulardan 7'si KE tanısı alan bireylere ait serumlardır. Yaş ortalaması 35.78 (8-83) olan KE'li 77 olgunun 55 (%71.42)'i kadın, 22 (%28.57)'si erkek olup, %93.5'inde enfeksiyon karcığı yerleşimli olarak saptanmıştır. KE olmayan olguların 25 (%46.29)'i erkek, 29 (%53.70)'u kadın olup, yaş ortalamaları 42.05 yıl olarak belirlenmiştir. Çalışmaya alınan olgu grupları ve test sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Çalışmada saptanan testin pozitif, negatif prediktif değerleri ile duyarlılık ve özgüllük değerleri Tablo 2'de görülmektedir.

TARTIŞMA

E. granulosus türlerinin ara konakları bağışık sistemi uyarabilen ve immünolojik tanıda rol oynayan parazit hücreleri veya parazitin salgısal ürünleri gibi çeşitli antijenik yapılarla karşılaşmaktadır. Bu antijenlerin etkinliğini parazitin türü veya suşu, konağın türü, konağın direnci, parazitin yerleştiği organ, kistin fertilitesi ve canlılığı, kist duvarının bütünlüğü gibi faktörler belirlemektedir. Kist sıvısı, protoskoleks ve germinatif membranlar gibi yapılar immünolojik testlerde antijen kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yapıların hepsi çoğul antijenik bileşimler içerdiğinden antijenik özellikler *Echinococcus* türleri için özgül değildir.^{6,12,13} Kullanılan immünolojik tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıklarının farklı olması ve optimal uygulama şartlarına sahip olan testlerin %100 güvenilir sonuç verememesi, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan immünolojik tanı yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir.^{6,11}

Antijen olarak donmuş protoskoleks kesitlerinin kullanıldığı çalışmamızda testin duyarlılığı %91.6, özgüllüğü de %83 olarak bulunmuştur.

TABLO 1: Çalışmaya alınan hasta grupları ve test sonuçları.

Gruplar	İFA testi				
	Seropozitif		Seronegatif		Toplam
	n	%	n	%	
KE tanılı hastalar	70	90.90	7	9.09	77
KE tanısı olmayan hastalar	11	20.37	43	79.62	54
Toplam	81	61.83	50	38.16	131

İFA: İndirekt floresan antikor, KE: Kistik ekinokokkozis.

TABLO 2: İFA testinin, duyarlılık, özgüllük ve pozitif, negatif prediktif değerleri.

İFA	KE tanılı hastalar		Toplam
	Doğru	Yanlış	
Pozitif	77	11	88
Negatif	7	54	61
Toplam	88	65	

-uyarlılık %91.6, özgüllük %83.0, pozitif prediktif değer %87, negatif prediktif değer %88.5.

İFA testi parazitik hastalıkların tanısında önemli gelişmelerden biri olup, parazitoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır.^{6,12,13,17} Kist hidatiğin İFA testi ile teşhisinde antijen olarak; dondurulmuş parazitli doku kesitleri, protoskoleks ve kistik membranların kullanıldığı çalışmalarda olumlu sonuçlar bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda kullanılan antijene göre testin duyarlılığı %83.3-100 arasında değişmektedir.^{1,11,18} Şener ve ark. 2004 yılı çalışmalarında İFA test yönteminde germinal membran kesit antijenlerinin kullanılması durumunda çapraz reaksiyonların önlendiğini, özgüllük ve duyarlılığın %100 olduğunu bildirmişlerdir.¹¹ Tüm protoskoleks antijenler kullanıldığında özgüllük %91, duyarlılık %95 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada ELISA'nın duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %72'dir. Kist sıvısı ve donmuş skoleks kesitleri antijen olarak kullanılarak, insanlarda uniloküler ve multiloküler hidatidozun teşhisi amacıyla uygulanan bir çalışmada, İFA testi ile uniloküler hidatikte %94, multiloküler hidatidozda ise %100 başarı sağlandığı bildirilmektedir.¹⁹ Kartesz ve ark.²⁰ cerrahi olarak doğrulanmış 21 kist hidatikli olguda kompleman fiksasyon testi, hemaglutinasyon testi ve İFA testini karşılaştırmıştır. Hemaglutinasyon testiyle iki yanlış negatiflik saptanırken, İFA testi ile bir yanlış negatiflik bildirilmiştir.

Çalışmamızda KE'li olguların %9'unda antikor saptanmamıştır. Metastod enfeksiyonu olduğu bilinen olgularda bağışık yanıtta sıklıkla IgG, IgM ve IgE sınıfı antikorlarda yükselme görülmektedir. Olguların %30'unda dolaşımda özgül bir antikorun saptanamadığı bildirilmektedir.^{2,6} Araştırmacılar dolaşımdaki parazit antijenlerinin özgül antikorları ortadan kaldırdılabileceğini ve bazı seronegatif olgularda dolaşımda hem antijen hem de immün-komplekslerin saptanabileceğini bildirmektedir.^{2,6}

Ayrıca, nonspesifik reaksiyonların yanı sıra İFA testinin çalışma prensibi açısından teknik hata payı da mevcuttur.

Seropozitif saptadığımız 11 (%13.58) olgu KE tanısı almayanlardı. Bu olguların 1'i hariç hepsinde spesifik antikor titresi düşük olarak bulunmuştur. Paraziter enfeksiyonlarda çapraz reaksiyonların oluşabileceği, ayrıca kollajen doku hastalıkları, siroz, multipl miyeloma ve malignitelerde de yanlış pozitifliklerin oluşabileceği bildirilmektedir.^{16,21} Problem olan olgularda özgüllüğü artırmak için iki antikor arayan yöntem yerine mümkünse antikor arayan bir test ile antijen arayan bir testin birlikte uygulanmasının daha uygun olduğu bildirilmektedir.^{6,12}

Verilerde olduğu gibi çalışmamızda da KE görülme oranı kadınlarda daha yüksek (%71.42) bulunmuştur.^{2,6,10} Olgularımızın %93.5'inde enfeksiyon karaciğer yerleşimli olup, KE'de en fazla tutulan organlar özellikle onkosferin karşılaştığı ilk büyük kılcal damar ağı olmaları nedeni ile karaciğer ve akciğerler olduğu bildirilmektedir.^{2,21}

SONUÇ

Özellikle karaciğer yerleşimli KE tanısında, İFA testinin radyolojik yöntemlerle birlikte klinisyenlere destek olabileceği söylenebilir. Kolay uygulanabilirliği ve kısa sürede sonuç vermesi, ayrıca avantajlarıdır.

KAYNAKLAR

- Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R, Piarroux R. Immunodiagnosis of Echinococcus infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10):3718-21.
- Eşgin M, Aktaş M, Coşkun Ş. [The investigation of antibody presence in the sera of patients with a suspicion of cystic echinococcosis by using indirect hemagglutination test (IHA)]. *Acta Parasitologica Turcica* 2007;31(4):283-7.
- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* 2006;55(Suppl):S187-91.
- Sadjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int* 2006;55(Suppl):197-202.
- Altıntaş N, Yazar S, Yolasığmaz A, Akisü C, Şakru N, Karacasu F, et al. A sero-epidemiological study of cystic Echinococcosis in İzmir and its surrounding area, Turkey. *Helmintologica* 1999;36(1):19-23.
- Özbilgin A, Kilimciöçlü AA. Cystic echinococcosis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M, eds. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 1st ed. İzmir: Meta Printing; 2007. p.552-6.
- Yolasığmaz A, Reiterova K, Türk M, Reyhan E, Bozdağ AD, Karababa AO, et al. Comparison of serological and clinical findings in Turkish patients with cystic echinococcosis. *Helmintologica* 2006;43(4):220-5.
- Metintaş S. [The life course and epidemiology of echinococcus]. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006;2(9):1-9.
- Rahman A, Yücel A, Yılmaz M. [A Case of secondary localized pericardial cyst hydatid disease and determination of cyst hydatid scoleces and hooks with various stains]. *Acta Parasitologica Turcica* 2008;32(1):31-4.
- Dursun A Ş, Kuşaslan R, Türel KS, Akbulut G, Arıkan Y, Dilek ON. [Surgical Treatment in our Hydatid Cyst Patients and Efficiency of Sphincterotomy with ERCP]. *Kocatepe Tıp Derg* 2006;7(1):11-6.
- Şener S, Yazar S, Şahin İ. [Investigation of diagnostic values of antigens used for the diagnosis of cystic echinococcosis by IFAT]. *EU J Health Sci* 2004;13(1):1-6.
- Gönlügür U, Gönlügür TE, Akkurt I. [The value of serological tests in the diagnosis of cystic hydatid disease]. *Türkiye Klinikleri Arch Lung* 2004;5(3):158-61.
- Biava MF, Dao A, Fortier B. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. *World J Surg* 2001;25(1):10-4.
- Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987;25(2):143-54.
- Martin RM, Colebrook AL, Gasser RB, Lightowers MW. Antibody responses of patients with cystic hydatid disease to recombinant myophilin of Echinococcus granulosus. *Acta Trop* 1996;61(4):307-14.
- Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, et al. A set of recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 2003;132(2):309-15.
- Coudert J, Ambroise-Thomas P, Despeignes J, Cadi-Soussi M, Kien Truong T. [Serologic diagnosis of alveolar echinococcosis by immunofluorescence]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1966;59(5):859-65.
- Guisantes JA, Vicente F. Paraffin embedded "Echinococcus granulosus" protoscoleces as suitable antigen in the indirect immunofluorescence test for human hydatid disease. *Boll Ist Sieroter Milan* 1983;62(1):85-90.
- Hardy WD Jr. General principles of retrovirus immunodetection tests. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199(10):1282-7.
- Kertesz V, Roberts PW, Sharp P. Evaluation of three serological tests for the diagnosis of hydatid disease. *Med J Aust* 1979;2(13):678-80.
- Yalçınkaya İ, Özbay B, Yılmaz H, Sağay SS. [The Value of Indirect Hemagglutination test in Diagnosis of Pulmonary Hydatid Cyst]. *Akciğer Derg* 2006;12(4):168-72.