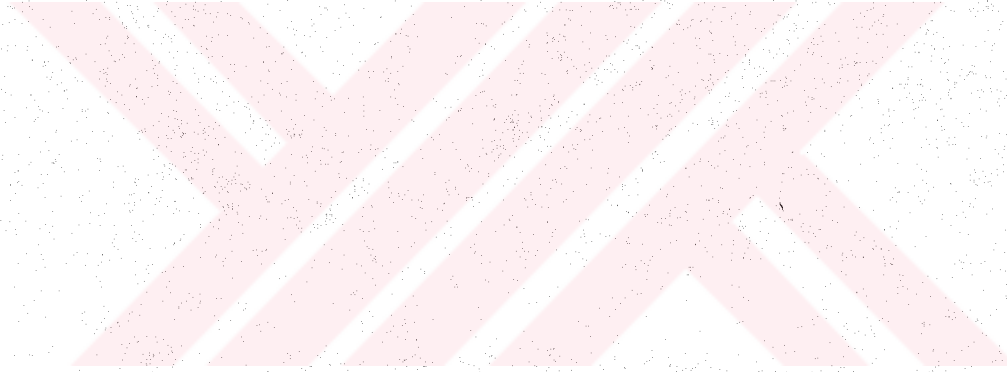


T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PARAZİTOLOJİ BİLİM DALI

16155

**KİST HİDATİK'TE SERO-EPİDEMİYOLOJİK
ARAŞTIRMALAR**



UZMANLIK TEZİ

Dr. M. Ziya ALKAN

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

İZMİR - 1991

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PARAZİTOLOJİ BİLİM DALI

KİST HİDATİK'TE
SERO-EPİDEMİYOLOJİK
ARAŞTIRMALAR

UZMANLIK TEZİ

Dr. M. Ziya ALKAN

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. M. Ali ÖZCEL

İZMİR - 1991

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1.	GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	KAYNAK BİLGİLER	4
2.1.	Sistemik, Biyoloji ve Epidemiyoloji	4
2.1.1.	Giriş	4
2.1.2.	Evrimi	4
2.1.3.	Echinococcus genusunun türleri	6
2.2.	Prevalans ve Coğrafi Dağılım	9
2.2.1.	Echinococcus granulosus	9
2.2.2.	Echinococcus multilocularis	12
2.2.3.	E. oligarthus ve E. vogeli	13
2.3.	İmmunolojik Tanı Yöntemleri	13
2.3.1.	Echinococcus sp. Antijenleri	14
2.3.2.	Kist Hidatik'te İmmun Yanıt	17
2.3.3.	İmmunodiagnostik testler	19
2.3.4.	İmmunodiagnostik Test Sonuçlarının Yorumlanması	24
2.4.	Parazitolojik Tanı Yöntemleri	25
2.4.1.	Kist Hidatik materyalinin incelenmesi	25
2.4.2.	Canlılık Testleri	26
BÖLÜM 3.	GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1.	Çalışma Bölgesi	27
3.2.	Serumlar	27
3.3.	Antijen	28
3.3.1.	Eriyik antijen hazırlanması	28
3.3.2.	Protein konsantrasyonu tayini	28
3.3.3.	Partikül antijen hazırlanması	28
3.4.	Uygulanan Testler	29
3.4.1.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	29
3.4.2.	İndirekt Floresan Antikor Yöntemi	32
3.4.3.	İndirekt Hemagglütinasyon Yöntemi	34

BÖLÜM 4.	BULGULAR	38
	TARTIŞMA	42
	SONUÇ	50
	ÖZET	51
	SUMMARY	52
	KAYNAKLAR	53
	ÖZGEÇMİŞ	61

GİRİŞ

Kist hidatik'te prevalans çalışmaları, hastalığın öneminin ortaya konması, yayılımının incelenmesi ve kontrolü çalışmalarına temel veriler sağlaması açısından önem taşır. İnsanda enfeksiyon prevalansının tespitinde, hastane vakalarının incelenmesi, kitlesel mikrofilm taramaları, otopsi sonuçları ve sero-epidemiolojik çalışmalar kullanılmakta olup, her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır.

Hastane vakalarının incelenmesi, sadece semptomatik olan belli bir orandaki vakaları yansıtsa da, yıllık hastane enfeksiyonu oranı, uzun süreli incelemelerde, enfeksiyonun insidansındaki değişiklikleri vermesi açısından değerlidir. Veriler, bir yılda hastanelerde tespit, veya opere edilmiş vakaların tüm veya belli bir populasyonun 100.000'ine oranı şeklinde ifade edilir. Bu oranlar cinsiyet, değişik yaş grupları, köy veya kentsel yerleşim gibi bazı faktörlere göre sınıflandırılarak, hastalığın yayılım özellikleri ve risk grupları belirlenebilir.

Mikrofilm taramaları ve radyolojik incelemeler, masraflı oluşu, saha çalışmalarına uygun olmayışı, diğer yer kaplayan oluşumlarda ayırıcı tanının zorluğu gibi nedenlerle yaygın olarak kullanılmasa da, pilot bölgelerde özellikle, akciğer kist hidatik'inde, asemptomatik taşıyıcıların tespitinde ön test olarak uygulanabilir. Günümüzde, ultrasonografik incelemelerdeki gelişmeler, özellikle Abdominal Kist hidatik'in tanısında yeni gelişmeler sağlamıştır. Kist hidatik'te vakaların çoğunun asemptomatik olması nedeniyle, gerçek prevalansın tespiti tam olarak yapılamamaktadır. Başka

nedenlerle ölen kişilerde yapılan otopsi sonuçları, bu asemptomatik taşıyıcı kişilerde enfeksiyon oranını vermesi açısından değerlidir.

Kist hidatik'te sero-epidemiolojik araştırmalar, hastalığın belirli topluluklardaki prevalansının tespitinde önemli bir yer tutmaktadır. Her ne kadar, tüm vakalar serolojik testlerde pozitif sonuç vermeyebilir veya hatalı pozitif sonuçlar ortaya çıkabilirse de klinik verilerin yetersizliği nedeniyle serolojik araştırmalar günümüzde prevalans ölçümünde en etkili yol olarak görülmektedir. Hidatidosis'in klinik tanısında immunodiagnostik testlerin değeri tartışmalıdır. Hidatik kist sıvısı antijenleri kullanılarak yapılan Deri testi'nin (Casoni) fazlaca bir değeri olmadığı anlaşıldığından, basit, duyarlı ve spesifik testlerin uygulanması gerekmektedir. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) günümüzde kolay uygulanabilirliği, duyarlı ve spesifik oluşuyla tercih edilen testlerin başında gelmektedir. Ancak, immunolojik testlerde coğrafi bölgelere bağlı olarak değişik sonuçlar görülebildiğinden, ELISA'da da tanıda belirleyici değerlerin ortaya konması gereklidir. Serolojik tanının önemli bir yönü de, asemptomatik Kist taşıyıcıların belirlenmesinde ön tarama testi olmasıdır. Bu kişiler ileri tetkikler için hastanelere sevk edilebilir ve gerekli tedavi uygulanabilir.

Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde başka bir çalışma nedeniyle pilot bölge seçilmiş bir köydeki tüm kişiler Enzim-Linked Immunosorbent Assay ile Kist Hidatik yönünden incelenerek bu hastalığın kırsal kesimdeki prevalansının ortaya konması ve bu halk sağlığı probleminin çözümüne katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Çalışmalarımın her aşamasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm Tez Danışmanım, Parazitoloji Bilim Dalı Başkanı, Hocam, Sayın Prof. Dr. M. Ali ÖZCEL' e, testlerin çalışılmasında yardımcı olan Sayın Hayrettin BAYKAL' a, tezin yazımında yardımcı olan Sayın Cumhuriyet GÜNDÜZ' e ve tüm çalışma arkadaşlarıma içten teşekkür ederim.



KAYNAK BİLGİLER

2.1. Sistematik, Biyoloji ve Epidemiyoloji

2.1.1. Giriş

Kist Hidatik ve Hidatidoz terimleri Echinococcus genusuna (Familya: Taeniidea) ait sestodların larva (metasestod) formlarının neden olduğu zoonotik enfeksiyonlar için kullanılmaktadır.

Echinococcus türleri genellikle boyları 7 mm.'den kısa, küçük parazitlerdir. Skolekslerinde 4 çekmen ve rostellumlarında, sayıları ve uzunlukları türlerine göre değişiklik gösteren, 2 sıra çengel bulunur. Gövdelerindeki proglottid sayısı 2 ila 6 arasında değişmekte olup, genital delikleri lateraldir ve yerleri türlere göre farklılık gösterir.

Yumurtaları 30-40 μm . çapında, oval olup 3 çift çengelli onkosfer (larva) içerirler.

Metasestod ise hücresiz bir tabaka ve aseksüel tomurcuklanma yolu ile çimlenme kapsüllerini oluşturan germinal tabakadan oluşmuş bir kese biçimindedir. Protoskoleksler bu germinal tabakanın iç duvarlarından gelişirler (3, 13).

2.1.2. Evrimi

Echinococcus türleri evrimlerini tamamlayabilmek için iki memeli konağa ihtiyaç duyarlar. Yumurta içeren proglottidler veya serbest haldeki yumurtalar bir karnivor olan kesin konağın dışkısıyla dışarı çıkarlar.

Bu yumurtalar fiziksel faktörlere karşı çok dayanıklı olup, uygun koşullarda günlerce enfektif kalabilirler (13).

Ara konak olan memeliler, yumurtaların ağız yoluyla alınmasıyla enfekte olurlar. Onkosfer, mide ve ince barsaktaki enzimler yardımıyla keratinize embriofordan çıkar ve safra'nında yardımıyla ince barsak duvarını deler. Bu işlemden onkosferin sekresyonları ve çengel hareketleri rol oynar. Onkosfer bir vane geçerek pasif olarak karaciğere taşınır. Burada kalıp gelişebileceği gibi, portal dolaşıma karışabilir ve genel dolaşıma geçerek akciğerler, böbrekler, dalak, kas dokusu, beyin veya diğer organlara da yerleşebilir (3, 13).

Onkosfer bir organa yerleştiğinde metasetod (hidatik larva) evresine geçer. 10-14 gün içerisinde hücre proliferasyonu, onkosfer çengellerinin kaybolması, kas atrofisi, vezikülleşme, orta boşluğun oluşması, germinal ve laminar tabakaların gelişmesi ile bir kese haline dönüşür. Kistin büyümesi çok yavaş olup, gelişme süresi farklılıklar gösterir ve protoskolekslerin oluşması aylar alır. 5 ayda yaklaşık 10 mm. çapa ulaşan kist büyümeye devam ederek yıllar içinde çapı 30 cm.'ye ulaşabilir (13).

Protoskoleksler uygun bir kesin konak tarafından ağız yolu ile alındığında, midede pepsin'in etkisi, ardından ince barsakta pH değişikliği ve safra'nın etkileriyle evaginasyona uğrarlar ve çekmenleri ile barsak villusları arasına tutunurlar. Protoskolekslerin alınmasından yaklaşık 4-6 hafta sonra ise erişkinler oluşur (3, 13).

2.1.3. Echinococcus genusunun türleri

Günümüzde, taksonomik olarak Echinococcus genusuna ait 4 tür vardır. Bunlar,

Echinococcus granulosus (Batch,1786),

Echinococcus multilocularis (Leuckart,1863),

Echinococcus oligarthrus (Diesing,1863)

Echinococcus vogeli (Rausch ve Bernstein,1972)' dir.

Bu 4 tür hem erişkin hem de larva formlarında birbirlerinden morfolojik olarak ayrılmaktadırlar.

2.1.3.1. Echinococcus granulosus

Erişkini yaklaşık 2-7 mm. boyunda olup, genellikle 3-4 (nadiren 5-6) segmentten oluşur. Sondan bir evvelki segment olgun halka olup, genital delik genellikle, olgun ve gravid halkaların ortasının posterioruna açılır. Gravid uterus gelişmiş lateral keseciklerle karakterizedir.

Larva evresi ise genellikle içi sıvı dolu uniloküler kese şeklindedir, ancak birbiriyle ilişkili odacıklar şeklinde de oluşabilir. Bu kese zamanla büyür ve çapı 30 cm.'ye kadar ulaşır ve içinde endojen kız kistler oluşabilir.

İçi su ile dolu olan bu kist, laminar ve germinal tabakalar ile kistin içinde bulunan yavru keselerden oluşmuştur. En dış tabaka olan laminar tabaka, beyaz renkte, yaprakçıklar halinde, polisakkarid yapısında koruyucu bir örtü olup, besinlerin içeri girmesine ve

artıkların dışarı çıkmasına engel olmaz. Ayrıca immunolojik bir engel oluşturarak, kisti konağın immunolojik reaksiyonlarından korur.

Germinal tabaka ise, 10-25 µm. kalınlığında içinde birçok çekirdek bulunan ince bir zar olup, perinükleer tabakalardaki farklılaşmamış hücreler proliferasyon olarak kist içine doğru uzayan kapsülleri oluşturur. Bu kapsüller zamanla büyüyerek ortalarında bir boşluk gelişir, bir sapla kiste bağlı olan bu boşlukların içinde yeniden boşluklar oluşur ve sayısız protoskoleks gelişir.

Echinococcus granulosus, 4 tür arasında en az ara konak özgülüğü gösteren tür olduğundan, kozmopolitan yayılım gösterir. Larva evresi birçok memeli türünde gözlenmiştir. Metasestodları insanda "Kist Hidatik" hastalığına yol açarlar. Parazit evrimini, kesin konak olan köpekler (*Canis familiaris*) ve ara konak olan evcil tek-tırnaklılar (koyun, inek, keçi, at ve deve) ile sürdürür. Ancak, bazı bölgelerde vahşi hayvanlar da evrimde yer alırlar. Örneğin: Kuzey Amerika'da kurt ve geyik, Avustralya'da yabani köpekler, Seylan'da ve Kaliforniya'da çakal ve geyik, Arjantin'de tilki ve yabani tavşan, Kenya'da çakal ve diğer yabani hayvanlar gibi (3, 12, 13)...

2.1.3.2. *Echinococcus multilocularis*

Erişkini 1.2 - 3.7 mm. boyunda olup 4-5 segmentten oluşur. Sondan üçüncü segment karakteristik olarak olgun olup genital delik hem olgun hem de gravid halkalarda ortanın anteriorundadır. Gravid uterus kese şeklindedir.

Metasestodu multiveziküler yapıda olup, çapları birkaç mm.'yi geçmeyen küçük keseciklerin biraraya gelmesiyle oluşur. Echinococcus granulosus metasestodundan farklı olarak içinde sıvı yerine yarı-katı jel kıvamında bir ortam bulunur. Tomurcuklanarak gelişir ve böylece dokulara infiltre olur.

Ara konak özgüllüğü yüksektir ve metasestodlarla infeksiyon kemirgenler, özellikle Cricetidaeae familyası (Tarla faresi, sıçan, çizgili hamster, köstebek), fare ve sincap ile sınırlıdır. Parazit insanda alveolar kist hidatik hastalığını yapar.

Echinococcus multilocularis evrimini tilkiler ve cricetid rodentler arasında olarak devam ettirir. Evcil köpek ve kediler, enfekte kemirgenlerin etlerini yiyerek bu evrime katılırlar (3, 13, 19).

2.1.3.3. Echinococcus oligarthrus

Erişkini yaklaşık 1.9 - 2.9 mm. boyunda olup, genellikle 3 segmentten oluşur. Sondan bir evvelki segment olgun halka olup, genital delik genellikle, olgun halkaların ortasının anterioruna, gebe halkaların ortasına açılır. Gravid uterus kese biçimindedir.

Metasestodu polikistik yapıda ve içi sıvı dolu olup, septumlarla ayrılmış odacıkların biraraya gelmesiyle oluşur. Tek bir kist yaklaşık 5 cm. çapa kadar gelişebilir.

Evriminde puma, jaguar gibi vahşi hayvanlar kesin, bazı kemirgenler de ara konak olarak rol oynar. Bu güne kadar insan vakası bildirilmemiştir (3, 13).

2.1.3.4. Echinococcus vogeli

Erişkini yaklaşık 3.9-5.6 mm. boyunda olup, genellikle 3 segmentten oluşur. Sondan bir evvelki segment olgun halka olup, genital delik genellikle, olgun ve gebe halkaların ortasının posterioruna açılır. Gravid uterus keselenme veya dallanma göstermeyip uzun tübüler biçimdedir.

Kesin konağı köpek olup, ara konakları Cuniculus paca adlı kemirgenlerdir (35).

Metasestodu E. oligarthrus'unkine benzer yapıda olup, larval evresi insanda Kist Hidatik'in polikistik formuna benzer yapıda hastalık oluşturur (12, 13).

2.2. Coğrafi Dağılım ve Prevalans

2.2.1. Echinococcus granulosus

E.granulosus 'un çok çeşitli konaklara adapte olabilme yeteneği ve evcil hayvanların Avrupa'dan tüm dünyaya dağılması nedenleriyle, bu sestod Kuzey'de Kutup çizgisinden, Güney'de Tierra del Fuego, Arjantin'e kadar çok geniş coğrafi dağılım göstermektedir (37).

Hastalık tüm dünyada, tüm iklimlerde, değişik prevalans düzeylerinde gözlenmektedir (2, 3, 4, 6, 11, 13, 21-24, 32, 35, 38-44, 48).

Batı Yarımküre'nin yüksek rakımlı bölgelerinde, Alaska ve Kanada'nın bazı bölgelerinde, kurtlar ve bazı vahşi tektırnaklılarda E.granulosus 'un silvatik formlarına rastlanmaktadır (34).

Aynı veya benzeri suş İskandinavya'nın kuzey kesimlerinde ve Sovyetler Birliği'nde de gözlenmiştir (45).

Bu bölgelerde silvatik konakların sınırlılığı insanda enfeksiyonların yayılmasını engellemektedir. Alaska ve Kanada'da enfeksiyon sadece, avcılıkla uğraşan Eskimo ve Kızılderili kabilelerinde görölmektedir. Bunun nedeni de, bu kişilerin köpeklerini geyik ve ceylanların artıklarıyla beslemeleridir (33).

Geçen yüzyılda en yüksek enfeksiyon oranı (% 22) tespit edilen İzlanda'da, günümüzde hiç hidatitoz vakası bildirilmemektedir (35).

Kuzey Afrika'da ve Büyük Sahra'nın güneyinde enfeksiyona evcil hayvanlar arasında yaygın olarak rastlanmakta olup, insan enfeksiyonları Kuzey-batı Kenya ve Uganda'da görölmektedir (21).

Avrupa'da insan ve hayvanlardaki en yüksek prevalans, Akdeniz'e kıyısı bulunan ölkelerde (İspanya, İtalya, Yugoslavya, Yunanistan) görölmektedir (24).

Bu bölgelerde köpek-koyun siklusu görölürken, Batı Avrupa'da (İngiltere, İrlanda) köpek-at siklusu daha yaygın görölmekte ve insan vakalarına rastlanılmaktadır (13).

Diğer bazı Avrupa ölkelerinde ise (Belçika, Almanya, İsviçre) köpek-büyükbaş hayvan siklusu gözlenmektedir (35).

Birçok Doğu Akdeniz ülkesinde enfeksiyon koyun, deve, keçi ve eşeklerde yaygındır (40).

Hastalığa Çin, Kamboçya, Vietnam, Filipinler, Taiwan ve Endonezya'da da rastlandığına dair yayınlar vardır (23).

Türkiye'de ise enfeksiyon sokak köpeklerinde yaygın olarak görülmekte olup (% 5.5), enfeksiyon köpek-koyun siklusu şeklinde sürmektedir (46).

Dünyada, İnsan Kist Hidatik hastalığının rastlanma sıklığı konusundaki veriler tam değildir. Uruguay'da tüm hastane ve Cerrahi kliniklerindeki vakaların değerlendirilmesinde 1962-1971 yılları arasında ortalama yıllık morbidite 20.7/100.000 olarak tespit edilmiştir (32).

Diğer çalışmalarda da Kist hidatik morbiditesi Vaka / nüfus olarak 100.000'de Kıbrıs'ta 12.9, Şili'de 7.9, Yunanistan'da 7.5 - 8.3, Cezayir'de 5.1-6.1 Yugoslavya'da 37 olarak bulunmuştur (13).

Ancak, bu rakamlar bu ülkelerdeki enfeksiyonun gerçek boyutlarını vermekten uzaktır. Çünkü, toplumdaki tüm kesimler eşit risk altında olmayıp Hidaditoz özellikle kırsal kesimde sık görülmektedir. Örneğin, Uruguay'da yıllık enfeksiyon ortalaması, kırsal kesimde yaşayanlarda 100.000'de 123.3 iken, şehirlerde yaşayanlarda 100.000'de 10.1 bulunmuştur. Arjantin'de ülke ortalaması 100.000'de 1-2 iken ülkenin güney kesimlerinde oran 143 / 100.000'i geçmektedir (42).

Radyolojik ve serolojik metodlarla asemptomatik kist taşıyıcıların saptanması ile hastane vakalarının, tüm enfeksiyonların sadece bir bölümünü yansıttığı anlaşılmıştır. Örneğin, Arjantin'in Rio Negro bölgesinde hastane vakaları 100.000'de 143 iken, 15.000 kişide yapılan radyolojik taramada, tüm Kist hidatik enfeksiyonların 1/3'ünden az rastlanan Akciğer Kist hidatik enfeksiyonu oranı 100.000'de 460 bulunmuştur (42).

Türkiye'de 1970-1972 yıllarını kapsayan bir çalışmada, hastane vakası olarak toplam 1635 Kist hidatik olgusu görüldüğü bildirilmiştir. İzmir ve civarında ise 1981-1984 yılları arasında 202 hastane olgusu tespit edilmiştir (46).

2.2.2. Echinococcus multilocularis

Echinococcus multilocularis dünyada sadece Kuzey yarıkürede görülmektedir. Orta Avrupa'dan (Güney ve Doğu Fransa, İsviçre, Güney Almanya ve Batı Avusturya) Bulgaristan ve Türkiye'den geçen bir hat boyunca Sovyetler Birliği ve Japon adalarına kadar uzanan bir bölgede rastlanmakta olup Yunanistan, Çekoslovakya, Kuzey İran ve Hindistan'dan da vakalar bildirilmiştir (13, 34).

İnsanda alveolar hidatik hastalığı insidansı ve prevalansı hakkında az veri bulunmaktadır. Sovyetler Birliği, Kuzey Japonya, Batı Alaska ve Orta Avrupa'da sık görüldüğüne dair yayınlar vardır. İsviçre'de 1965-1969 yılları arasında ortalama yıllık insidans 100.000'de 0.14 olarak tespit edilmiştir (13, 35, 40).

2.2.3. Echinococcus oligarthrus ve Echinococcus vogeli

Bu türler Orta ve Güney Amerika'ya özgü olup nemli tropikal bölgelerde görülmektedir. E.oligarthrus ile insan vakası günümüze kadar görülmemiştir, E.vogeli ise, insanda polikistik tipte hidatik kiste neden olmakta, ancak prevalansı hakkında yeterli veri bulunmamaktadır (12).

2.3. Immunolojik Tanı Yöntemleri

insanlarda Kist hidatik;

- kistin büyüüp mekanik bir obstrüksiyona neden olması,
 - allerjik fenomenler veya eosinofili gibi semptomlar,
 - kistin rüptüre olması ile akut allerjik reaksiyonlar,
 - diğer nedenlerle yapılan radyolojik araştırmalar veya cerrahi girişimler gibi,
- nedenlerle düşünülmekte ve ortaya çıkmaktadır.

Bir kitlenin araştırılmasında, rontgen, radyoizotopik, ultrasonografik taramalar, Komputerize Aksiyel Tomografi (CAT) gibi yöntemler bu kitlenin lokalizasyonu, büyüklüğü, fiziksel görünümü (sıvı-dolu, kalsifiye vb.) hakkında değerli bilgiler verirse de kökeni konusunda kesin bilgi verememektedir. Kistlerin aspirasyonu ise, protoskoleks'lerin dışarı sızması ve sekonder kistlerin oluşması veya anaflaksi gibi komplikasyonları nedeniyle yapılmamaktadır. Bazı akciğer kist hidatik'i vakalarında, kist açıldığında balgamda membranlar, protoskoleksler veya çengeller görülebilmektedir. Tüm bu tanı güçlükleri nedeni ile kist hidatik'in tanısında immunolojik metodların önemli

bir yer tutmakta olduğu bildirilmektedir (3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15-20, 22, 23, 25-27, 29-31, 37, 39, 45, 47-54).

Kist hidatik'te immunolojik tanı, konağın parazite karşı gösterdiği hücre sel ve humoral immun yanıtın ortaya konmasına dayanmaktadır (37).

2.3.1. Echinococcus spp. Antijenleri

Serolojik testlerde değışik konaklardan elde edilen kist hidatik sıvısı, protoskoleksler ve kist membranları kullanılmaktadır. Fertil kistlerden alınan sıvıdaki antijen konsantrasyonunun, steril kistlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (37).

Musiani ve ark. (1978) değışik konaklardaki antijen konsantrasyonlarını karşılaştırmışlar, insan ve koyun kistlerinde sığır ve domuz kistlerine oranla, karaciğer kistlerinde de akciğer kistlerine oranla daha fazla antijen proteini olduğunu tespit etmişler, en yüksek hidatik antijen konsantrasyonunu, koyun karaciğer kistinden elde etmişlerdir (25).

Protoskoleksler, kist membranları, testlerde antijen kaynağı olarak kullanılmış, ancak genelde kist hidatik sıvısı serolojik testler için en uygun antijen kaynağı olarak değerlendirilmiştir (18).

Enfekte konaklar ve immünize edilmiş deney hayvanları serumları, hidatik metasestodlarının spesifik antijenleri yönünden, jel difüzyon ve immunelektroforez yöntemleriyle incelendiğinde, kist hidatik sıvısının, membranların ve protoskolekslerin birçok antijenin

bileşiminden meydana geldiği anlaşılmıştır. Kagan ve Norman, immünize edilmiş tavşan serumunda E.granulosus'a ait 23 değişik antijen komponenti tespit etmişlerdir (18).

Yapılan çalışmalar, bu antijenlerden bir kısmının konak ve parazit için ortak olduğunu göstermiştir (7, 18).

Kagan ve Norman ayrıca, E.granulosus ve E.multilocularis'in doku ve kist sıvılarında 4 farklı parazit antijen molekülü tespit etmişlerdir (18).

Chordi ve Kagan, immunelektroforez tekniği ile insan kist hidatığında antikor yanıtını araştırmışlar ve iki belirgin presipitasyon çizgisi (band 4 ve Band 5) elde etmişlerdir (9).

Yapılan ileri araştırmalarla bu bandların parazit antijenlerine ait olduğu kanıtlanmıştır. Capron ve ark. ise, Immunelektroforezde oluşan çizgiler için değişik bir numaralandırma sistemi kullanmışlar ve sadece hidatitoz'lu hasta serumlarında görülüp, diğer parazitlerle enfekte hasta serumlarında görülmeyen presipitasyon çizgisini fraksiyon 5 veya arc 5 olarak adlandırmışlardır (7, 8).

Serolojik testlerde, ham parazit antijenleri kullanılmasında oluşan problemlerin çözümü için Oriol ve ark. (1971) kist hidatik sıvısından elde edilen antijenlerin bir miktar saflaştırılmasında basit bir teknik geliştirmişlerdir. Bu teknikle Antijen A ve Antijen B olarak isimlendirdikleri iki dominant parazit antijeni saptamışlardır (27).

Safılaştırılmış Antijen A ve Antijen B'nin insan kist hidatik enfeksiyonunuda kullanılması Williams ve ark.'nca gerçekleştirilmiştir. Antijen A ve Antijen B'ye karşı antikorlar, normal kist sıvısının antijen olarak kullanıldığı testlerde pozitif bulunan 52 hastanın 45'inde tespit edilirken, çapraz reaksiyon izlenmemiştir (37).

Pozzuoli ve ark. kist sıvısı antijenlerini kromatografik olarak ayırđırmıřlar ve Chordi ve Kagan gibi antijen 4 ve 5 olarak tanımladıkları, iki major antijen tespit etmişlerdir (30, 31).

Bu antijenler Oriol ve ark. 'nca 1971'de bulunan Antijen A ve B ile aynı kromatografik özellikleri göstermişlerdir. Bu konuda yapılan ileri çalışmalarla, bu antijenlerin safılaştırılması için yeni teknikler geliştirilmiş ve bu antijenlerin kist hidatikli hasta serumlarına karşı immunolojik reaksiyonunun arttırılmasına çalışılmıştır (20, 25, 29, 31).

Daha büyük molekül ağırlıklı olan Antijen 4, tüm kist hidatikli hasta serumlarıyla pozitif reaksiyon verirken, bazı normal serumlarla da çapraz reaksiyonlar gözlenmiştir. Antijen 5 ise, çoğu kist hidatikli hasta serumuyla pozitif reaksiyon vermiştir. Kromatografik incelemelerde, Antijen 4'n Molekül ağırlığının 400.000 Dalton'dan fazla, Antijen 5'in ise 150.000 Dalton olduğu tahmin edilmiştir (37).

Antijen 5'e karşı monoklonal antikorların izole edilmesi ile bu antikorlar, antijen 5'in izolasyonu ve karakterizasyonu ve Kist hidatik'in immunolojik tanısında kullanılmaya başlanmıştır (15).

2.3.2. Kist Hidatik'te immün Yanıt

Echinococcus granulosus 'lu hastaların serumlarında, Echinococcus antijenine karşı IgG, IgM ve IgE sınıfı antikorlar tespit edilmiştir (23).

Ancak, bu antikorların hastalığın hangi evresinde ortaya çıktığı ve tüm Kist hidatik'li hastalarda neden bulunmadığı tam olarak bilinmemektedir. IgG düzeyleri IgM ve IgA'ya göre daha yaygın olarak tespit edilmekte, kistlerin cerrahi olarak çıkarılmasından sonra, IgM düzeyinin akciğer kistli hastalarda 4-6 ay, karaciğer kistli hastalarda ise 12 ay içinde normal değerlere inmekte olduğu, IgG düzeyinin ise uzun süre yüksek kaldığı bildirilmektedir (45).

Bazı vakalarda ise diğer Ig'ler normal düzeyde bulunur iken yüksek IgE düzeyi tespit edilmektedir (37).

IgG ve IgM düzeyleriyle, İndirekt hemagglutinasyon ve Kompleman fiksasyon testleriyle ölçülen antikor titreleri arasında uyum bulunmaması, Echinococcus enfeksiyonundan sonra oluşan immuno-globulinlerin sadece bir kısmının parazite özgü olduğunu düşündürmektedir (45).

Ayrıca Kist hidatik'li hastalarda oluşan hücresel immün yanıt, Lenfosit Transformasyonu yöntemi ile de gösterilmiştir (37).

Günümüzde uygulanan testler arasında en özgül olanların, Echinococcus antijen 5 'e karşı oluşan antikörlerin araştırılmasına dayanan testler olduğu açıklanmaktadır (3, 8, 13, 47, 53, 54).

Antijen 5'in araştırılmasında yaygın olarak kullanılmakta olan test immunelektroforez testi'dir. Ayrıca, antijen 5 pozitif serumun tanınmasında bir kontrol antiserum kullanılarak yapılan Double diffüzyon testi (DD 5) de uygulanmaktadır (37).

Ancak, bazı hastaların serumlarında diğer kist antijenine karşı antikör var iken, Antijen 5'e karşı antikör bulunmaması nedeniyle, şüpheli serumların öncelikle IHA, IFAT, LA veya ELISA gibi daha duyarlı bir testle taranmasının yararlı olacağından bahsedilmektedir (11).

Ayrıca, antijen 5'e karşı antikörler, E.multilocularis, E.vogeli, Taenia solium larvası ile enfekte kişilerde saptanmıştır (47, 50).

Diğer çalışmalarda da antijen 5'e karşı antikörlerin, sistiserkozis vakalarının % 5-10'unda görüldüğü bildirilmektedir. Bu nedenle, özellikle Taenia solium'un görüldüğü bölgelerde çapraz reaksiyonlar konusunda dikkatli olunması gerektiği bildirilmiştir (39, 41).

2.3.2.1. Tedavi Sonrası İmmun Yanıt

E.granulosus 'da cerrahi tedavi sonrası antikör düzeyindeki farklılıklar, IHA, LA, bentonite flocculation (BF), CF, Casoni, IFAT ve ELISA testleriyle

incelenmiş, serolojik sonuçların cerrahi müdahalenin başarısı konusunda bazı göstergeler taşıdığı sonucuna varılmış,

- Serolojik testlerin operasyondan önce ve cerrahi müdahalenin bir yıl sonrasına kadar negatif olması,
- serolojik testlerin operasyondan önce düşük titrede pozitif, cerrahi müdahalenin ardından negatifleşmesi ve altı ay sonrasına kadar negatif kalması,
- serolojik test sonuçlarının cerrahi müdahale sonrasında düşmeye başlaması ve bu düşüşün iki yıl boyunca devam etmesi,

prognozun iyi olduğunun göstergesi ,

- Serolojik test sonuçlarının, cerrahi müdahalenin altı ay sonrasına kadar sabit kalması,
 - cerrahi müdahale sonrasında düşmesi, ardından yeniden yükselmesi ise,
- rekürren enfeksiyon olarak yorumlanmıştır (45).

2.3.3. Immunodiagnostik Testler

Kist Hidatik tanısında hemen hemen tüm serolojik testler uygulanabilmektedir. Ancak, bu testlerin enfekte kişilerin serumundaki spesifik antikorları ortaya koyma kapasitesi (sensitivite = Duyarlılık) ve kist hidatik ile diğer hastalıkları ayırma kapasitesi (spesifite = Özgüllük) farklı olmaktadır. Bir testin duyarlılığı arttıkça, gerekli özgüllüğün sağlanabilmesi için geliştirilmiş , antijenlere gereksinim olduğu bildirilmektedir (13, 37).

2.3.3.1. Lateks Agglütinasyon Testi

Antijen ile kaplanmış Latex partiküllerinin uygun antikor ile karşılaştığında agglütine olması prensibine dayanmaktadır. Serum dilüsyonları Kist sıvısı antijenleriyle duyarlı hale getirilmiş latex partikülleri ile karşılaştırıldığında pozitif örneklerde 10 dakika içinde agglütinasyon izlenebilmektedir (49).

Yapılan çalışmalarda Hidatidoz vakalarında LA testinin duyarlılığının % 50 ile % 92 arasında değiştiği bildirilmiştir (13).

2.3.3.2. İndirekt Hemagglütinasyon Testi

Eritrosit yüzeyine çeşitli antijenler bağlanarak özgül antikor ile yapılan Hemagglütinasyona Pasif Hemagglütinasyon adı verilmektedir. İndirekt hemagglütinasyon ise temelde, reaksiyona katılmayan partiküllerin belirli bazı antijenlerin aracılığıyla birbirine yapışıp kümelenmeleri özelliğine dayanmaktadır. İHA tanı yöntemi, önceden Tannik asitle duyarlandırılmış koyun alyuvarını uygun antijen ve antikor (hasta serumu) ortamında birbirine yapışması yani agglütinasyon olmaları sonucu çökelmeleri kuralına dayanmaktadır. Burada Tannik asitle duyarlandırılan alyuvarların yüzey geriliminin değişmesiyle antijen tutmaları özelliğinden yararlanılmaktadır.

Sonuç olarak, serum antijenli plakta düğme şeklinde bir çökelti var ise Negatif, kenarı tırtıklı bir halka oluşur ise Pozitif olarak değerlendirilmektedir. Antijensiz plağın tamamında düğme şeklinde çökelti olması gerektiği bildirilmektedir (13, 52).

IHA testi günümüzde Kist hidatik tanısında kullanılan en duyarlı testlerden birisidir. Negatif kontrol serumlarına göre bariz bir şekilde farklı bulunan titrasyon pozitiflik alt sınırı olarak belirlenmektedir (13).

Bu titrasyon, değişik araştırmacılara göre 1/64 ile 1/1024 arasında değişmektedir (37).

2.3.3.3. İndirekt Fluoresan Antikor Testi

Test, partikül antijen ile karşılaştırılmış serum antikorlarının FITC ile işaretlenmiş anti-antikorlar yardımıyla görünür hale getirilmesi prensibine dayanmaktadır (28).

Protoskoleksler antijen olarak kullanılabilceği gibi, Kist sıvısı antijenleri selüloz veya sepharoz boncuklar gibi katı bir ortama emdirilerek de uygulanabilmektedir (13).

Fluoresan mikroskopunda pozitif preparatlarda sarı-yeşil floresan izlenmektedir. Oldukça duyarlı bir test olmasına rağmen, özellikle düşük serum dilusyonlarında Taenia solium ve diğer bazı parazit hastalıklarında "hatalı pozitif" sonuçlar gözlemlendiği bildirilmiştir (13, 37).

2.3.3.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu teknik 1970 yıllarında dokuların histokimyasal ayrımında kullanılan enzimlerle antikorların işaretlenebildiğini gösteren çalışmalardan alınmıştır (14).

Enzim immün-assaylerde her parçanın immünolojik ve enzimatik aktiviteleri korunmak üzere antijen ve antikorlar, radioaktif işaretleyiciler yerine enzimlere konjuge edilmektedir. Eriyik antijen ya da antikor katı bir ortamda immünolojik etkileri bozulmadan sabitleştirilmekte, antijen yada antikor immünolojik özelliği bozmayan tampon bir solüsyonla sulandırılarak bu katı ortama absorbe ettirilmektedir. Testte örnek ve araçlar sırayla konmakta, ortamda antijen ile antikor birleşimi varsa enzim işaretli konjuge, konjuge ucuyla komplekse bağlanmakta, enzim ucu açıkta kalmaktadır. Substrat konulunca enzim substratı degrade etmekte ve substrat renk değiştirmektedir. Bu kimyasal bir olay olup, enzimle etkilenen substratın oluşturduğu rengin spektrofotometrik ölçümünün test solüsyonundaki bilinmeyen antijen ya da antikor konsantrasyonu ile orantılı olduğu bildirilmektedir (1).

Bu yöntemin avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Kolay uygulanabilirliği,
- İşaretli immün araçların uzun süre saklanabilmesi,
- Radiyoisotoplarda gerekli olan kullanma ve atıkların yok edilmesi önleminin gerekmemesi,
- Enzim işaretleri için kromojenik substrat kullanılarak görülebilir ve okunabilir sonuçlar vermesi...

ELISA yöntemi klasik olarak aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır (1):

- Katı ortam (mikroplak) antijenle kaplanır.
- Yıkanır.
- Blocking işlemi uygulanır.

- Serum örneği plağa konur, enkübe edilir.
- Yıkanır.
- Enzim işaretli antiglobulin eklenir.
- Yıkanır.
- Enzim substratı konur.
- Serumda antikor varsa renk değişikliği gözlenmektedir.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

ELISA sonuçları spektrofotometre ile okunabileceği gibi antikorun olup olmadığı açısından gözle de değerlendirilmektedir. Spektrofotometre kullanıldığında sonuçlar Absorbans değerleri olarak alınarak, belli bir değer üstü (eşik değeri = cut-off) pozitif olarak kabul edilmektedir. Ölçülen absorbans ile antijen veya antikor düzeyi arasında belli bir sınıra kadar doğrudan ilişki olduğu, antijen veya antikor belli bir sınırın üstünde olduğunda kaplanmış protein veya konjuge miktarı sınırlayıcı faktör olabildiği yayınlanmıştır (10).

ELISA'da her zaman normal serumla bir miktar renklenme değeri (background) elde edilmektedir. Bu normal serumdaki IgG'nin nonspesifik bağlanmasına veya diğer protein - protein etkileşimlerine bağlı olabilmektedir. Bu nedenle, standardizasyon ELISA'da duyarlılığın arttırılmasında en önemli faktör olmaktadır. Bunun için testlerde referanslar kullanılması, her teste referans serumu dışında bilinen negatif serum ve diğer kontrollerin eklenmesi ile ELISA sonuçlarının daha özgül ve duyarlı olacağı bildirilmektedir (1, 10, 11, 13, 16, 17, 37).

Kist hidatik tanısında, ham kist hidatik sıvısının antijen olarak kullanılması ile iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Safılaştırılmış antijen ile yapılan çalışmalarda ise, testin duyarlılığı arttığı, ancak ham antijene göre daha fazla non-spesifik reaksiyonlar gözlemlendiği bildirilmiştir (37).

2.3.3.5. Casoni Testi

Intradermal Casoni testi, duyarlılık yönünden serolojik testlere yakın olmakla birlikte, bu testler kadar özgül olmadığı bildirilmektedir (54).

Normal kist sıvısı antijeni veya düşük azot konsantrasyonunda kullanılan bir miktar saflaştırılmış antijen solusyonları kullanıldığında bile, diğer parazitlerle enfekte kişilerin serumlarında yüksek oranda "hatalı pozitif" reaksiyonlara rastlanmaktadır. Ayrıca deri testi dolaşımdaki antikor üretimini stimüle etmekte olduğundan, Casoni deri testi yerine günümüzde diğer serolojik testlerin tercih edilmesi önerilmektedir (2, 13).

2.3.4. Immunodiagnostik Test Sonuçlarının Yorumlanması

insanlarda immun yanıtın organ lokalizasyonu, parazit kitlesinin büyüklüğü ve metasestoda bağlı olduğu, hepatik ve peritoneal kistlerin, akciğer, beyin ve göz kistlerine göre daha kuvvetli antikor yanıtına yol açtığı bildirilmektedir (17, 45).

15 yaşın altındaki çocukların, erişkinlere göre zayıf pozitif serolojik reaksiyon verdikleri saptanmıştır. Kistin rüptürü ve cerrahi müdahaleler

sonucu antijenin açığa çıkması, 10 gün kadar kısa bir süre içerisinde antikorların şiddetle uyarılmasına neden olmakta, ölü metasetodlar konağı uyarılmayacağından bu kistleri taşıyan kişilerde serolojik olarak negatif sonuçlar alınabilmektedir (7).

Ayrıca, serolojik reaksiyonların konak-parazit ilişkisine veya coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterebileceği bildirilmektedir (3, 13, 42).

2.4. Parazitolojik Tanı Yöntemleri

Kist Hidatik'in tanısında, klinik bulguların radyolojik incelenmesi, ultrasonografi, tomografi, sintigrafi gibi yöntemler ve immunolojik olarak Echinococcus antijenine karşı antikorların gösterilmesi tanı için değerli olmasına karşın, kesin tanı için Parazitolojik tanı yöntemlerinin de kullanılması önerilmektedir (13).

2.4.1. Kist Hidatik Materyalinin İncelenmesi

Spontan olarak ağızdan gelen veya cerrahi operasyon sonucu elde edilen materyal (protoskoleks, kist membran parçaları gibi...) önce makroskopik ve mikroskopik yönden, ardından histopatolojik olarak incelenmesi, mikroskopik incelemede balgamın önce fizyolojik su ile sulandırılması, ardından santrifüje edilerek dipteki kısmın protoskoleksler ve çengeller yönünden incelenmesi önerilmektedir (13).

Anafilaktik reaksiyonlar ve sekonder hidatitoz'a neden olabileceğinden biyopsiden kaçınılması önerilmektedir (13).

Histopatolojik tetkik için örneklerin hemen fikse edilmesi, ardından Hematoksilen/eosin ve PAS boyası ile boyanmasıyla echinococcus türlerinde tipik olarak PAS-pozitif asellüler laminar tabaka görülmesi ile tanı konabileceği bildirilmiştir (3, 13).

2.4.2. Canlılık Testleri

Metasestodların cerrahi olarak çıkarılmasından sonra özellikle Kemoterapi uygulanacak vakalarda canlılık testlerinin önem taşıdığı bildirilmiştir (13).

Bu testler temelde cerrahi olarak çıkartılan kistlerin :

- mikroskop altında incelenmesini,
- eosin ile boyanarak boya alıp almadıklarının gözlenmesini,
- pepsin ve tripsin yardımıyla in vitro canlılıklarının incelenmesini,
- deney hayvanlarına IP verilerek kist oluşumunun gözlenmesini içermektedir (13).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Bölgesi

Çalışma, başka bir çalışma nedeniyle pilot bölge seçilen, Çukurova bölgesinin iç kısımlarında, Ceyhan Nehrinin Kuzey-batı' sında yer alan ÇOTLU köyünde yapılmıştır. Köy halkı sulu tarım (pamuk, buğday, mısır, soya ekimi) ve hayvancılıkla uğraşmaktadır.

3.2. Serumlar

Çotlu köyünde 77 evde yaşayan 7 yaşın üstündeki toplam 643 kişi çalışmaya alınmıştır. 2'şer ay arayla toplam 3 kez, damardan yaklaşık 5 cc. kan alınmış, serumları ayrılarak buz-kutuları içinde İzmir'e nakledilmiştir. Serumlar - 80°C'da saklanmıştır.

Serolojik testlerde Kontrol olarak :

- K1 : Kist Hidatik olmadığı bilinen sağlıklı 20 kişinin serumu,
- K2 : Klinik olarak operasyonla Kist Hidatik olduğu kanıtlanmış ve serolojik olarak düşük Pozitiflik gösteren 3 serum,
- K3 : Klinik olarak operasyonla Kist Hidatik olduğu kanıtlanmış ve serolojik olarak kuvvetli Pozitiflik gösteren 3 serum,
olmak üzere kontrol kullanılmıştır.

3.3. Antijen

3.3.1. Eriyik Antijen Hazırlanması

Hayvan kesim yerlerinden (mezbaha) alınan hidatik kistli koyun karaciğerleri bekletilmeden Laboratuvarlarımıza getirilmiş, fertil içinde skoleks olan) kistlerden hidatik sıvı, iğne ve şırınga yardımıyla steril koşullarda, aspire edilmiştir. Tüplere alınan sıvı protoskolekslerin ve diğer büyük partiküllerin çökmesi için 30 dakika bekletilmiş, ardından 1000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı alınmış, tüplere bölünerek -20°C' da saklanmıştır.

3.3.2. Protein Konsantrasyonunun Saptanması

Herhangi bir testte kullanabilmek için hazırlanan eriyik antijenin protein konsantrasyonunun bilinmesi gereklidir. Bunu saptamak için, Bausch & Lomb (Spec 21) spektrofotometre aletinde distile su ile 260 ve 280 nm dalga boylarında sıfırlama işlemi yapılmış, elde edilen sıvının konsantrasyonu her iki dalga boyunda da ölçülerek aşağıdaki formüle uygulanmış ve mg/ml olarak protein konsantrasyonu saptanmıştır.

$$1.45 \times (280 \text{ nm.deki değer}) - 0.74 \times (260 \text{ nm.deki değer}) = 5\text{mg./ml.}$$

3.3.3. Partikül Antijen Hazırlanması

Hayvan kesim yerlerinden (mezbaha) alınan koyun karaciğerlerindeki kistlerden steril koşullarda, aspire edilip tüplere alınan sıvı protoskolekslerin ve diğer büyük partiküllerin çökmesi için 30 dakika bekletilmiş,

ardından 1000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek parazit yoğunluğu arttırılmıştır. Protoskoleksler önceden hazırlanmış özel çukurları bulunan lamaların üzerindeki işaretli çukurların içine pastör pipeti yardımıyla her çukura 10-15 protoskoleks düşecek şekilde yayılmış, oda ısısında kuruduktan sonra kullanıncaya kadar pelur kağıtlara sarılarak -20°C 'lik dipfrizde saklanmıştır.

3.4. Uygulanan Testler

3.4.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

3.4.1.1. Ön Hazırlıklar

Antijen Kaplı Plaklar ELISA plaklarının (Linbro EIA mikrotitration plate 96 flat bottom Lot No: 805202) her çukuruna 5 µgr./ml. düşecek şekilde sulandırılan antijenden her çukura 100 µl. konarak, plağın üzeri parafilm ile kapatılmış ve gece boyunca +4°C'da bırakılmıştır.

Tampon ve Solusyonlar

Casein Buffer:

- * 10 gr. Casein (200 ml, 1N NaOH içinde) kaynatılarak eritilir.
- * Casein eridiğinde 1800 ml. ELISA PBS içine süzülerek aktarılır, soğutulur.
- * Ph 7.4'e ayarlanır.
- * 0.20 gr. Thiomersol koruyucu olarak eklenir.
- * 3 hafta buzdolabında saklanabilir.

CB + Tween 20:

- * Serum sulandırılmaları ve konjuge sulandırımı için kullanılır.
- * 40 ml. CB + 10 µl. Tween 20 karıştırılır.

ELISA PBS :

- * NaCl.....: 16.00 gr.
- * Na₂HPO₄ 12H₂O.....: 2.30 gr.
- * KH₂PO₄.....: 0.40 gr.
- * KCl.....: 0.40 gr.
- * Distile Su: 2000 ml. Karıştırılır.
- * pH 7.4'e ayarlanır.

Citrate Phosphat Buffer:

- * Citric Asit.....: 1.92 gr.
- * Na₂HPO₄ 12H₂O.....: 6.45 gr.
- * Distile Su: 200 ml. Eritilir.
- * Ph 5'e ayarlanır.

Konjuge

Horseradish peroxidase işaretli anti-human IgG+IgA+IgM (keçi) (Zymed Lab. CA USA) 1:2000 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

. Peroksidaz Konjuge için Substrat

- * Solüsyon A : 100 ml. Citrate Phosphat Buffer içine 2 adet ABTS tableti eklenir, eritilir.
- * Solüsyon B : 100 ml. Citrate Phosphat Buffer içine 40 µl saf H₂O₂ eklenir.

- * Testin substrat aşamasında her bir plak için 5 ml Solüsyon A ve 5 ml Solüsyon B karıştırılır.

3.4.1.2. Testin Uygulanması

1. Antijen kaplı plaklar antijenle kaplanmamış noktalar varsa kaplanması amacıyla (blocking) her çukuruna 150 μ l. %0.5 CB konarak 1 saat oda ısısında bırakılmıştır.
2. 40 ml.CB + 10 μ l. Tween 20 eklenmesiyle hazırlanan Buffer'la serum sulandırılmaları yapılmış, tüplerde serumlar 1/200 dilusyonda sulandırılmıştır. Her serum kontrol amacıyla iki kez çalışılmış, plağın ilk sırasının son iki çukuru boş bırakılmıştır. 1 saat oda ısısında bırakılan antijen kaplı blocking'li plaklar dökülmüş, silkelennmiş ve serum sulandırılmalarından 100'er μ l. antijenli plağa aktarılmıştır.
3. Plaklar 2 saat oda ısısında tutulmuştur.
4. Süre sonunda plaklar silkelenerek dökülmüş, 150 μ l.CB ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır.
5. Konjuge, serum sulandırımında kullanılan Tween 20'li CB ile 1/2000 (10cc CB+Tw20 + 5 μ l. konjuge) oranında sulandırılmış, her bir çukura 100 μ l. konarak 1 saat oda ısısında beklenmiştir.
6. Konjugeli plaklar silkelenerek dökülmüş, çukurlar iki kez 150 μ l. CB ile 2 kez de PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır.

7. Bir plak için 5 ml solüsyon A + 5 ml solüsyon B karıştırılarak, hazırlanan substrat, çukurlara 100 µl. konmuş, oda ısısında 30 dakika ile 60 dakika arasında tutulmuş ve test durdurulmadan 405 nm de ELISA okuyucusunda okunmuştur (Substrat kontrolü için konjugeden kalan bir kaç damlanın üzerine eşit miktarda solüsyon A + solüsyon B konarak 1 dakikada mavileşmesi beklenmiştir).

3.4.1.3. Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi

ELISA sonuçları spektrofotometre (Titertek Multiskan Plus MK II) ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar Absorbans değerleri olarak alınmış, negatif kontrolların absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması + 2 standard sapma ($x + 2SD$) değerinin (eşik değeri = cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilmiştir. Test edilen her serumun iki delikteki absorbans değerleri arasındaki sapma % 10'dan küçük olanlar değerlendirmeye alınırken, % 10'dan büyük olanlar yeniden çalışılmıştır.

Absorbans değerleri $x + 2SD <$ olanlar indirekt Floresan Antikor ve indirekt Hemagglutinasyon testleri ile incelenmiştir.

3.4.2. indirekt Floresan Antikor Testi

3.4.2.1. Ön Hazırlıklar

Antijen kaplı Lamlar:Skoleksler önceden hazırlanmış özel çukurları bulunan lamların üzerindeki işaretli çukurların içine pastör pipeti yardımıyla yayılmış, oda ısısında kuruduktan sonra kullanıncaya kadar pelur kağıtlara sarılarak $-20^{\circ}C$ 'lik dipfrizde saklanmıştır.

Tampon ve Solusyonlar

PBS (Fosfat Tampon Solusyonu)

NaCl: 8.50 gr.
NaH₂PO₄ 2H₂O: 0.22 gr.
KH₂PO₄: 1.20 gr.
Distile Su: 1000 ml.

Kapatma Solusyonu

PBS: 1 cc.
Gliserin: 9 cc.

Konjuge

FITC işaretli anti-human IgG+IgA+IgM (keçi) (Zymed Lab. CA USA) 1:50 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

3.4.2.2. Testin Uygulanması

1. Serumlar, sulandırma plaklarında PBS ile 1/8 , 1/16 , 1/32 oranlarında sulandırılmış ve herbir sulandırmadan 1 damla antijen kaplı lamlardaki yerlerine aktarılmıştır.
2. Lamlar 37°C'lık etüvde 30 dakika tutulmuştur.
3. Lamlar PBS ile iki kez 5' er dakika yıkanmış ve kurutulmuştur.

4. Konjuge PBS ile 1:50 oranında sulandırılmış ve her deliğe 1 damla konmuş ve lamalar 37°C'lık etüvde 30 dakika tutulmuştur.
5. Lamalar PBS ile iki kez 5'er dakika yıkanmıştır.
6. Lamlara kapatma solusyonu damlatılmış ve 20x20'lik lamellerle lamaların üzeri kapatılmıştır.
7. Lamalar, Jenalumar fluoresan mikroskopunda 10 x 10 büyütmeye ışık kaynağı olarak HBO 202 cıva buharlı ampul ve mavi band filtre seti kullanılarak (Uyarma filtre seti KP 490, B229, B228 engelleme filtresi G247) 510 nm. dalga boyunda incelenmiştir.

3.4.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Parlak sarı-yeşil fluoresans Pozitif, soluk veya hiç fluoresans olmaması Negatif olarak değerlendirilmiştir. Fluoresan veren en yüksek serum dilusyonu, Antikor titresi olarak değerlendirilmiştir. Parazit çengellerinde görülen parlaklık, auto-fluoresans olarak değerlendirilmiştir.

3.4.3. İndirekt Hemagglütinasyon Testi

3.4.3.1. Ön Hazırlıklar

Tampon ve Solusyonlar

1. PBS (Fosfat Tampon Solusyonu)

NaCl	: 8.50 gr.
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	: 0.22 gr.
KH ₂ PO ₄	: 1.20 gr.
Distile Su	: 1000 ml.

2. Alsever Solüsyonu

Glukoz: 2.05 gr.
Sodyum sitrat: 0.78 gr.
NaCl: 0.42 gr.
Distile Su: 100 ml.

3. Tavşan Serumu

Tavşanın kalbinden steril enjektörle alınan kan oda ısısında bir süre bekletilmiş, santrifüj ile serumu ayrılmıştır. Serum sulandırımında PBS ile hazırlanan %2'lik solüsyonu kullanılmıştır. Serum sulandırımalarında Tavşan serumu veya Bovin serum albüminin kullanılmasının nedeni ortamda protein bulunmasını sağlamaktır. Eğer böyle olmazsa reaksiyon tam olarak oluşmamaktadır.

4. Koyun Eritrositleri

Steril bir enjektörle koyunun Vena jugularis'inden alınan kan aynı miktar alsever solüsyonu bulunan steril cam balona konup buzdolabında saklanmıştır. 5. Tannik Asit Toz halindeki Tannik asitten PBS ile %1'lik stok solüsyon hazırlanmış, -20°C'lik dipfrizde saklanmıştır. Her testte bu stoktan 1/10.000 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

Antijenli ve Antijensiz eritrosit suspansiyonlarının Hazırlanması

1. Koyundan alınan kan, alseverin içinde saklandığı için test esnasında bu alseverin uzaklaştırılması gereklidir. Bunun için de alseverli koyun eritrositleri 2500 devirde 3 kez 5'er dk. yıkanmış, her seferde üstteki sıvı atılmıştır.

2. 0.2 ml Tannik Asit + 20 ml PBS ile 0.5 ml paketlenmiş ve çöktürülmüş eritrosit + 20 ml PBS karıştırılmış, 37°C'lik Benmaride 15 dk. tutularak eritrositlerin duyarlı hale gelmesi sağlanmıştır.
3. Ortamdan Tannik asidin uzaklaştırılması için, karışım santrifüjde PBS ile 2 kez 2000 devirde yıkanıp tek tüpte toplanmıştır.
4. Bu Tannik asitli eritrositten 0.2 ml alınıp 1 ml. PBS ile iyice karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında 10 ml PBS başka bir kaptaki hazırlanmış ve bu 10 ml.den 0.125 ml.si atılmış bunun yerine 0.125 ml. santrifüjden sonra Tannik asitli eritrosit konulmuştur. (Antijeniz Tannik Asitli Eritrosit)
5. Tannik asitli eritrositten 0.2 ml alınıp 1 ml. Antijen (0.8 ml. Serum fizyolojik + 0.2 ml. Antijen) ile iyice karıştırılmış ve PBS eklenip santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında 10 ml. PBS başka bir kaptaki hazırlanmış ve bu 10 ml.den 0.125 ml. atılmıştır. Bunun yerine 0.125 ml. santrifüjden sonra Antijenli tannik asitli eritrosit konulmuştur. (Antijenli Tannik Asitli Eritrosit)

3.4.3.2. Testin Uygulanması

1. Bütün serumlar 50°C'da inaktive edilmiş, daha sonra "U" plaklar (Microtiter System, U bottom, Lot No: IS-MRC-98 Linbro Sci. Co. Hamden, Con. USA) aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

ANTIJENLİ PLAK ...:

50 µl Tavşan serumu + 50 µl sulandırılmış hasta serumu + 50 µl Antijenli Tannik asitli eritrosit.

ANTIJENSİZ PLAK ...:

50 µl Tavşan serumu + 50 µl sulandırılmış hasta serumu + 50 µl Antijensiz Tannik asitli eritrosit.

Hasta ve kontrol serumları ilk çukurdan itibaren son çukura kadar 1/ 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096, 8000, 16000 dilusyonları elde edilecek şekilde aktarılmıştır.

2. Vortex aletinde dikkatlice karıştırıldıktan sonra oda ısısında 1.5 - 2 saat kadar bekletilmiştir.

3.4.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Antijenli plakta düğme şeklinde bir çökelti varsa sonuç NEGATİF, Kenarı tırtıklı bir şekilde halka olursa POZİTİF olarak değerlendirilmiştir. Antijensiz plağın tamamında düğme şeklinde çökelti oluşmuştur. Negatif kontrollara göre belirgin bir farklılık gösteren titre olan 1/128 ve üstü pozitif olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

ELISA yönteminde öncelikle pozitifliğin alt sınırının saptanması amacıyla, Hidatik kistli olmadığı kabul edilen Negatif Kontrol (K1) grubundaki kişilerin serumları incelenmiş, bu grubun 405 nm.'deki absorban değerlerinin aritmetik ortalaması (Optik Dansitesi OD) $x = 0.085$, Standard Sapması SD = 0.05 olarak saptanmıştır.

Operasyon ile Kist hidatik olduğu kanıtlanmış, ancak serolojik testlerde düşük pozitif reaksiyon veren hasta serumların (K2) incelenmesinde, Optik Dansite 0.215 ($x + 2.6 SD$), Kist hidatikli ve serolojik testlerde yüksek pozitiflik veren serumlarda (K3) ise Optik Dansite 0.835 ($x + 15 SD$) bulunmuştur.

Çalışmaya alınan 684 kişiye ait serumlar incelenmesinde, standard olarak alınan Düşük pozitif kontrolün (K2) Optik Dansitesi 0.215 ($x + 2.6 SD$) bulunduğundan, çalışılan serumun OD değeri aynı plaktaki standard serumun OD değerine bölünmüş, sonuç 0.215 ile çarpılarak standard OD değerleri elde edilmiştir.

Eşik (cut-off) olarak, Eckert ve ark.'nca (13) önerildiği gibi, negatif kontrollerin (K1) optik dansite değeri (x) + iki standard sapma (2SD) değeri olan 0.185 alınmış ve incelenen bu serumlardan 674'ünün eşik (cut-off) değerinin altında ($<x + 2SD$) , 10'unun ise üstünde ($>x + 2SD$) OD değerleri gösterdiği gözlenmiştir. Bu 10 serumun ait olduğu kişilerin bu serumdan bir ay önce ve bir ay sonra elde edilmiş serumları ve aynı sayıda negatif serumun eklenmesi ile ikinci kez çalışılmış ve bir ay önce veya bir ay sonraki

serumlarında OD $< x + 2SD$ bulunan iki serum Negatif kabul edilerek değerlendirilmeye alınmamıştır.

ELISA OD Değerleri		
$x + nSD$		Serum Sayısı
< 2		674
$> 2 < 3$		4
$> 3 < 4$		1
$> 4 < 5$		-
$> 5 < 6$		1
$> 6 < 7$		1
$> 7 < 8$		-
$> 8 < 9$		-
$> 9 < 10$		-
$> 10 < 11$		-
> 11		1
Toplam		684

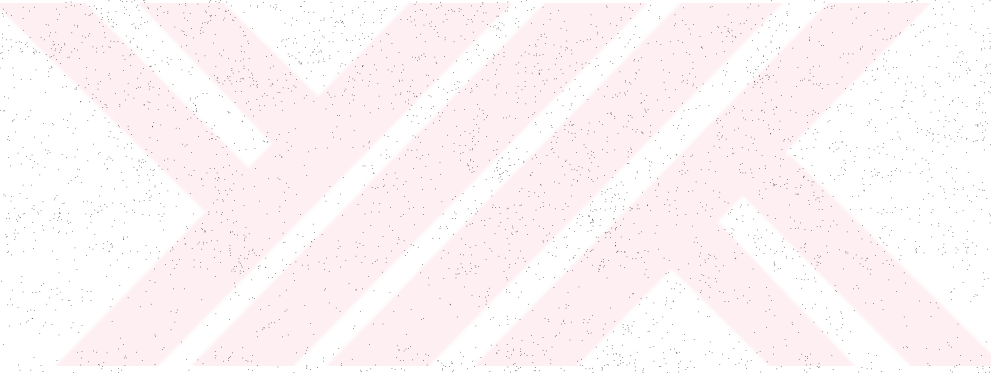
TABLO 1. Pozitif serumların OD Değerlerine göre dağılımı

ELISA değerleri $> x + 2SD$ bulunan serumlar IHA ve IFAT yöntemleriyle incelenmiş, $> x + 3SD$ olan 4 serum bu iki yöntemle de Pozitif bulunurken $< x + 3SD$ olan diğer 4 serum Negatif sonuç vermiştir.

İmmunolojik Testler						
Kod No	C	Y	ELISA	IFA	IHA*	
32	K	12	+	-	1/32	
87	K	45	+++	1/16	1/16000	
142	E	86	+	-	-	
202	K	50	++	1/16	1/16000	
229	E	41	+	-	1/64	
447	E	10	+	-	-	
628	K	30	+++++	1/32	1/16000	
640	K	45	+	-	1/32	
684	E	56	++++	1/16	1/16000	
735	E	40	+	-	1/32	
<p>+ OD = >x + 2SD <x + 3SD</p> <p>++ OD = >x + 3SD <x + 4SD</p> <p>+++ OD = >x + 5SD <x + 6SD</p> <p>++++ OD = >x + 6SD <x + 7SD</p> <p>+++++ OD = >x + 11SD</p>						
<p>* 1/128'in altındaki değerler negatif olarak yorumlanmıştır.</p>						

TABLO 2. Serolojik testlerin karşılaştırmalı sonuçları

Bu 4 kişiden ileri Radyolojik tetkikler uygulanabilen iki kişinin Akciğer grafileri normal bulunmuş, Batın Ultrasonografisi yapılan bir kişide ise 3x3 boyutlarında karaciğer Kist Hidatigine uyan kistik kitle saptanmıştır.



TARTIŞMA

İnsanda Kist hidatik hastalığının tanısında Serolojik tanı yöntemlerinin uygulanması, toplumda kist hidatik prevalansının belirlenmesinde ve semptomatik ve asemptomatik kist taşıyıcıların açığa çıkartılmasında önemli bir yer tutmaktadır (10, 11, 48).

İmmunodiagnostik taramalar kist taşıyıcılarının, daha komplikasyonlar ve klinik hastalık bulguları ortaya çıkmadan belirlenmesini sağlamaktadır (48).

Kist hidatik için, değişik immunolojik tanı yöntemleri geliştirilmiş olup, değişik tekniklerin sonuçları her zaman uyumlu olmamaktadır (15 - 17, 22, 37).

Bir hasta serumu, bir testte pozitif iken, bir diğerinde negatif olabilmektedir. Bu nedenle, günümüzde immunolojik tanının özgüllüğünün ve duyarlılığının arttırılması için, aynı serumun birden fazla teknikle incelenmesi önerilmektedir (3, 13, 37).

Serolojik sonuçların yorumlanmasında, gözönüne alınması gereken birçok faktör olduğu değişik araştırmacılar tarafından yayınlanmıştır. Tüm serolojik testlerde deneyim, dikkat ve devamlı kontrol gerekli olmaktadır. En küçük bir teknik hata sonuçları etkileyebilmektedir. Ayrıca, bazı hastalarda antikor oluşmadığı, bu nedenle negatif serolojik sonuçların her zaman Echinococcus enfeksiyonunun olmadığı anlamına gelmediğinin bilinmesi gerektiği bildirilmektedir (3, 13, 37).

Echinococcus granulosus metasestodlarındaki iki major antijenin tanımlanmasındaki farklı isimlendirmeler günümüzde de devam etmektedir. Yapılan değişik incelemeler, Chordi ve Kagan (1965)'in tanımladığı Antijen 4, Capron ve ark.(1967)'nin tanımladığı fraksiyon 5 (antijen 5) ve Oriol ve ark. (1971)' nin tanımladığı Antijen A'nın aynı parazit antijeni olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde, Chordi ve Kagan (1965)'in tanımladığı Antijen 5 ile, Oriol ve ark. (1971)' nin tanımladığı Antijen B'nin aynı antijen olduğu bildirilmektedir (37).

Eşanlamları	Molekül Ağırlığı	Antijenik Stabilitesi
Antijen 5 Antijen A 1,5 Antijen 4 4,6-10 Arc 5, Fraksiyon 5 Antijen 5 2,3,11,12	> 400000 ⁶ 100000-300000 ⁸	Labil
Antijen B Antijen B 1,5 Antijen 5 4,6-10	160000 ¹ 120000 ⁵ 150000 ⁶	Stabil

1. Oriol ve ark.1971
2. Capron ve ark.1967
3. Bout ve ark.1974
4. Chordi ve Kagan.1965
5. Oriol ve Oriol.1975
6. Pozzuoli ve ark.1972
7. Pozzuoli ve ark.1975
8. Piantelli ve ark.1977
9. Musiani ve ark.1978
10. Lauriola ve ark.1978
11. Varela-Diaz ve ark.1974
12. Dottorini ve Tassi.1977

TABLO 3. Kist Hidatik sıvısındaki iki major antijenin değişik araştırmacılara göre özellikleri (37).

Serolojik testlerin özgüllüğü ve duyarlılığı değişik çalışmalarda farklı bulunmuştur. Iacona ve ark. 1980'de ELISA, IHA ve DD testleri ile yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada bu testlerin duyarlılıklarını sırasıyla % 63.7, % 55.0, %70.3 bulmuşlar ve aralarında istatistiksel olarak farklılık tespit edememişlerdir (16).

Varela-Diaz ve ark. (1975) IHA testinin 4 farklı uygulanmasında (tannik asid, glutaraldehid, benzidine, formol), tannik asidli uygulamanın Kist hidatik tanısında en uygun test olduğunu bildirmişler (52), bir diğer çalışmalarında da Immunelektroforez testinde saflaştırılmış antijen kullanıldığında testin daha duyarlı olduğunu ancak % 22.4 oranında hatalı pozitif sonuç elde edildiğini bildirmişlerdir (51).

Altıntaş 1985'de operasyon ile doğrulanmış Kist hidatik olgularında operasyon öncesi Casoni, Kompleman Birleşmesi, indirekt Hemagglütinasyon, indirekt Floresan Antikor, immun Diffüzyon ve immun Elektroforez tetkikleri ile sırasıyla, % 65.8, % 62.7, % 93.3, % 97.7, % 27.7 ve % 27.7 oranında seropozitiflik saptamıştır (5).

Colherti 1985' de, Kist hidatik'in immunolojik tanısında, Double Diffusion (DD5) veya ters yönlü immunelektroforez (CIE5) testleri ile arc 5 antijenine karşı oluşan antikorların ortaya konmasının gerektiğini, ancak bu iki testinde sero-epidemiolojik çalışmalar için uygun olmaması nedeniyle, ELISA'nın ön tarama testi olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (10).

Colhorti ve ark. 1988'de, 1985'de geliştirdikleri ELISA yöntemini saha çalışmalarında DD5 ile karşılaştırmalı olarak uygulamışlar, 5839 kişiden 47'sini her iki testte de pozitif bulmuşlar, sonuçta ELISA'nın DD5 ile tespit edilen arc 5 antijenine karşı oluşan antikoları yakalayabildiğini, böylece serumların % 95.3'ünün ön tarama ile elenebileceğini bildirmişlerdir (11).

Colhorti ve ark.'nca sero-epidemiyojik çalışmalarda, ilk test olarak ELISA'nın kullanılması, pozitif bulunanların ise diğer immunolojik ve radyolojik tetkikler için hastanelere sevkı önerilmektedir (11).

Serolojik testler arasında ELISA yöntemi, antijen, diğer maddeler ve işgücü tasarrufu avantajlarıyla en uygun test olarak gözlenmektedir. Çalışmamızda malzeme ve insan kaynaklarının en verimli kullanılmasını sağlamak amacıyla, ELISA ön tarama testi olarak uygulanmış, sonuçlar diğer serolojik tetkikler ile karşılaştırılmış, IHA ve IFA teknikleri ile saptanabilen antikoların, ELISA tekniği ile daha kolay ve hızlı olarak belirlenebileceği gözlenmiştir.

ELISA yönteminde tek sulandırım çalışıldığında, sonuçlar diğer serolojik tetkiklerde olduğu gibi sulandırım değerleri yerine, Optik Dansite (OD) değerleri olarak elde edilmektedir. Her ne kadar, OD değerleriyle antikor konsantrasyonu arasındaki ilişki lineer olmayıp sigmoid bir eğri çiziyor olsa da, pratikte OD değerleri antikor konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılabilmekte, böylece malzeme ve zaman tasarrufu sağlanabilmektedir (11).

ELISA'da absorbans değerlerinde oluşabilecek günlük değişmelerin önlenmesi için bilinen OD'li standard serumlar ile çalışmaların karşılaştırılması önerilmektedir. Bu standard serumlardan birinin cut-off değerine yakın alınması standardizasyonu kolaylaştırmaktadır (10, 11).

Eckert ve ark., ELISA'da eşik (cut-off) değeri olarak, genel olarak kabul edilmiş başka bir kriter olmadığında, Negatif kontrol serumların ortalama değerinin iki standard sapması üzerindeki absorbans değerinin alınmasını önermişlerdir (13).

Çalışmamızda bilinen Negatif serumların ortalama değeri ve standard sapması ($x + 2SD$) olan 0.185 cut-off değeri olarak kabul edilmiş, Optik dansitesi 0.215 ($x + 2.6SD$) değerindeki düşük pozitif kontrol, standard serum olarak kullanılmıştır.

Schantz ve ark.(1973) Arjantin'de 1969 yılında Kist hidatik prevalansının hastane vakaları esas alındığında 100.000'de 143 iken, radyolojik taramalarda akciğer grafilerinin incelenmesinde bu oranın 100.000'de 460'a çıktığını saptamışlardır. Akciğer kist hidatizinin ise tüm hidatitozların ancak 1/3'ünü kapsadığı bildirilmektedir (3, 42).

Varela-Diaz (1983) Arjantin'deki uzun süreli kontrol programı çerçevesinde, askeri birliklerdeki 6348 kişinin immunolojik ve radyolojik incelenmelerinde 41 (100.000' de 768), 781 öğrencinin immunolojik incelemesinde 6 (100.000'de 768), 1977-79 yılları arasında 1610 öğrencinin 18'inde (100.000'de 1118) Kist hidatik tespit edildiğini bildirmiştir (48).

Colherti ve ark. (1988) ELISA ve DD5 yöntemleriyle 5839 kişinin 47'sinde (100.000' de 805) serolojik olarak Kist hidatik tespit etmişlerdir (11).

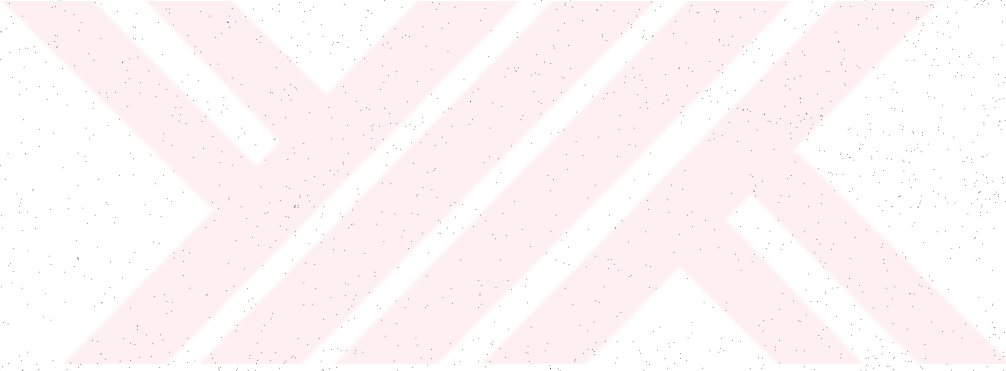
Çalışmamızda, Türkiye'de kırsal alanda Kist hidatik prevalansı serolojik olarak 100.000' de 585 (4 / 684) olarak tespit edilmiştir.

Immunodiagnostik test sonuçlarının değerlendirilmesindeki en önemli sorunun, belirli bir kişide kistin varlığı veya yokluğunun kanıtlanmasındaki zorluklar olduğu bildirilmektedir (42).

Çalışmamızda da serolojik olarak pozitif bulunan kişilerde ileri tetkiklerin uygulanmasında zorluklarla karşılaşmıştır. Sero-pozitif kişiler, işlerinin yoğunluğu, ekonomik sorunlar gibi nedenler ileri sürerek ileri tetkiklerden kaçınmışlardır. Radyolojik incelemeye alınabilen bir kişide ultrasonografide karaciğerde kist tespit edilmiş, diğer kişilere ileri tetkikler yapılamamıştır.

ELISA'daki çapraz reaksiyonların önlenmesi, böylece ELISA'nın yüksek duyarlılığından yararlanılabilmesi için hidatik antijenlerin saflaştırılması çalışmaları devam etmektedir. Hastaların büyük çoğunluğunda hastalık sırasında antikoları uyaran türe-özü parazitik epitoplara karşı oluşan monoklonal antikoları üreten hibridomaların bulunmasıyla saf antijenlerle daha özgül testler yapılabilecektir. Monoklonal antikolar, sadece parazite ait antijenleri tanıdıklarından, çapraz reaksiyonlara bağlı hatalı-pozitif sonuçlar önenebilecek, ayrıca testlerde standardizasyon sağlanarak laboratuvarlar arasındaki farklılıklar giderilebilecektir.

Kist hidatik'in serolojik tanısında ve sero-epidemiolojik incelemelerde, aynı spesifik epitopa karşı oluşmuş hasta antikorları ve monoklonal antikorlar kullanılarak uygulanacak geliştirilmiş ELISA yöntemleri ile daha iyi sonuçlar alınabileceği kanısındayız.



SONUÇ

Kist hidatik dünya üzerinde halk sağlığı ve ekonomik gelişim üzerinde büyük sorunlar yaratan paraziter bir hastalıktır.

Latin Amerika ve Avrupa'da operasyon gerektiren insan vakaları yılda 100.000'de 10'u geçmektedir ve bazı bölgelerde hayvanların % 60-70'i enfektedir. Afrika ve Asya'da verilerin tam olarak elde edilememesine rağmen insan prevalanslarının daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir.

Ülkemizde de Kist hidatik yaygın olarak görülmekte olup çalışmamızda insan prevalansı serolojik olarak 100.000'de 585 olarak saptanmıştır. Kıbrıs, İzlanda, Tasmanya (Avusturalya) gibi Kist hidatiğin yaygın olarak görüldüğü bazı ülke ve bölgeler başarılı kontrol programları ile bu hastalığın önüne geçmişlerdir. Kontrol programlarının ilk aşaması ise ülkede Kist hidatik prevalansının tespiti ve programın ileri aşamalarında takibidir.

Çalışmamızda Enzim-linked Immunosorbent Assay (ELISA)'nın Kist hidatik prevalansının tespitinde etkin bir ön tarama testi olduğu sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Türkiye'de Kist hidatik hastalığı prevalansının immunolojik olarak araştırılmasına yönelik bu çalışmada, Enzim-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kolay uygulanabilirliği ve ekonomik olma avantajlarıyla ilk tarama testi olarak uygulanmış, test sonuçları diğer serolojik ve radyolojik testlerle doğrulanarak Türkiye'de belirli bir topluluktaki semptomatik ve asemptomatik kist taşıyıcıların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Kırsal kesimde belirli bir bölgede yaşayan toplam 684 kişinin serumlarının serolojik olarak incelenmesinde, Kist hidatik yönünden pozitif kabul edilen 4 kişiden (100.000 de 585) birinde bu sonuç radyolojik olarak ta doğrulanmıştır.

Enzim-linked Immunosorbent Assay (ELISA), seroepidemiolojik olarak insanda Kist hidatik hastalığının prevalansının belirlenmesinde ve sahada hidatitoz vakalarının araştırılmasında en uygun immunolojik test olarak düşünülmektedir.

SUMMARY

Enzyme-linked Immunosorbent Assay was used as an initial screening test to estimate the prevalence of hydatid disease in man within the rural area of Turkiye. Positive sera were retested with Indirect Fluorescent Antibody and Indirect Haemagglutination tests. Test results were used to obtain immunological confirmation of clinical cases and to detect asymptomatic cyst carriers amongst residents of rural area.

A total of 684 sera from residents of a rural area in the southern part of Turkiye was processed and four seropositive cases were detected. Only one case was examined radiologically a liver cyst was detected by ultrasonographic examinations.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) is found to be a suitable immuno-diagnostic method to estimate the hydatid cyst prevalence in man and detecting asymptomatic hydatidosis cases in the field.

KAYNAKLAR

1. -, 1976. The Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Bull WHO 54,129-39.
2. -, 1979. Parasitic Zoonoses, World Health Org., Technical Report Series, No.637.
3. -, 1991. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No. 10.
4. AL-MOHAYA S, Al-Awami M, Vaidya MP, Knox-Macaulay H 1986. Hydatid Cyst of the Spleen. Am J Trop Med Hyg, 35(5) 995-9.
5. ALTINTAŞ N. 1985. Kist Hidatik ve iç Organlar Larva Göçü Hastalıklarında İmmunolojik Tanı Yöntemleri ve Değerleri. Doktora Tezi, İzmir.
6. BURRIDGE MJ, Schwabe CW 1977. Hydatid Disease in New Zealand: an Epidemiological Study of Transmission among Maoris. Am J Trop Med Hyg 26,258-65.
7. CAPRON A, Vernes A, Biguet J 1967. Le Diagnostique Immuno-electrophoretique de l'hydatidose. Le Kystehydatique du Fole 27-40 Lyon: SIMEP.
8. CAPRON A, Yarzabal L, Vernes A, Fruit J 1970. Le Diagnostic Immunologique de l'echinococcosse humaine. Path Biol 18, 357-65.

9. CHORDI A, Kagan IG 1965. Identification and Characterization of Antigenic Components of Sheep Hydatid Fluid by Immuno-electrophoresis. J Parasitol 51, 63-71.
10. COLHORTI EA 1986. Standardization and Evaluation of an Enzyme Immunoassay as a Screening Test for the Seroepidemiology of Human Hydatidosis. Am J Trop Med Hyg, 35(5) 1000-5.
11. COLTORTI EA, Fernandez E, Guarnera E, Lago J, Iriarte J 1988. Field Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Asymptomatic Patients in a Hydatid Control Program. Am J Trop Med Hyg, 38(3) 603-7.
12. D'ALESSANDRO A, Rausch RL, Morales G 1978. Echinococcus vogeli in Man, with a Review of Polycystic Hydatid Disease in Columbia and Neighbouring Countries. Am J trop Med Hyg 28, 303-17.
13. ECKERT J, Gemmel MA, Matyas Z, Soulsby EJM 1984. Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Echinococcosis. WHO. VPH/81.28.
14. ENGVALL E, Perlmann P 1972. Enzyme-linked Immunosorbent Assay ELISA. III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-labelled anti-immunoglobulin in Antigen-coated Tubes. J Immunol 109, 129-35.
15. FELICE G. Di, Siracusano A 1987. Monoclonal Antibodies for Immunodiagnosis of Human Hydatidosis. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam.

16. IACONA A, Pini C, Vicari G 1980. Enzyme-linked Immunosorbent Assay in the Serodiagnosis of Hydatid Disease. *Am J Trop Med Hyg*, 29(1) 95-102.
17. KAGAN IG, 1976. Serodiagnosis of Hydatid Disease. Cohen & Sadun eds, *Immunology of Parasitic Infections*. Oxford, Blackwell Scientific Publications 130-42.
18. KAGAN IG, Norman L 1961. Antigenic Analysis of Echinococcus Antigens by Agar Diffusion Techniques. *Am J Trop Med Hyg*, 10 727-34.
19. LANIER AP, Trujillo DE, Schantz PM, Wilson JF, Gottstein B, McMahon BJ 1987. Comparison of Serologic Tests for the Diagnosis and Follow-up of Alveolar Hydatid Disease. *Am J Trop Med Hyg*, 37(3) 609-15.
20. LAURIOLA L, Piantelli M, Pozzuoli R, Arru E, Musiani P 1978. Echinococcus granulosus: Preparation of Monospecific Antisera Against Antigens in Cyst Hydatid Fluid. *Zbl Bakt ParasitKde Abt 1, Abt Orig.* A240, 251-7.
21. MANN I 1974. The Background and Outline of the Research Programme in Echinococcosis (Hydatidosis) in Kenya. *Proc 3rd Int Cong Parasitol. Munich 1*, 547-50.
22. MATOSSIAN RM 1977. The Immunological Diagnosis of Human Hydatid Disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 71,101-4.

23. MATOSSIAN RM, Alami SY, Salti I, Araç GF 1976. Serum Immunoglobulin Levels in Human Hydatidosis. *Int J Parasitol* 6,367-71.
24. MATSONIOTIS N, Karpathios T, Koutoyzis J, Nicolaidou P, Fretzayas A, Papadellis F, Thomaidis T 1983. Hydatid Disease in Greek Children. *Am J Trop Med Hyg*, 32(5), 1025-78.
25. MUSIANI P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E, Pozzuoli R 1978. *Echinococcus granulosus*: Specific Quantification of the Two Most Immunoreactive Antigens in Hydatid Fluids. *J Clin Path* 31,475-8.
26. ORIOL C, Oriol R 1975. Physicochemical Properties of a Lipoprotein Antigen *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 20, 569-74.
27. ORIOL R, Williams JF, Rerez Esandi MV, Oriol C 1971. Purification of Lipoprotein Antigens of *Echinococcus granulosus* from Sheep Hydatid Fluid. *Am J Trop Med Hyg* 20,569-74.
28. ÖZCEL MA 1978. immunofluoresans ve Parazitolojide Uygulanması. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.No. 108.
29. PIANTELLI M, Pozzuoli R, Arru E, Musiani P 1977. *Echinococcus granulosus*: Identification of the Subunits of the Major Antigens. *J Immunol* 119, 1382-6.

30. POZZUOLI R, Musiani P, Arru E, Piantelli M, Mazzarella R 1972. Echinococcus granulosus: Isolation and Characterization of Sheep Hydatid Fluid Antigens. Exp Parasitol 32, 45-55.
31. POZZUOLI R, Piantelli M, Perruci C, Arru E, Musiani P 1975. Isolation of the Most Immunoreactive antigens of Echinococcus granulosus from Sheep Hydatid Fluid. J Immunol 115, 1459-63.
32. PURRIEL P, Schantz PM, Beovide H, Mendoza G 1973. Human Echinococcosis (Hydatidosis) in Uruguay: A comparison of indices of morbidity and mortality 1962-1971. Bull WHO 49,395-402.
33. RAUSCH RL 1960. Recent Studies on Hydatid Disease in Alaska. Parassitologia 2,391-8.
34. RAUSCH RL 1967. On the Ecology and Distribution of Echinococcus spp.(Cestoda: Taeniidae) and characteristics of their Development in the Intermediate Host. Annal Parasitol 42, 19-63.
35. RAUSCH RL 1984. Life-cycle Patterns and Geographic Distribution of Echinococcus species. Thompson ed., The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease. George Allen & Unwin, London 44-70.
36. RAUSCH RL, Wilson JF, Schantz PM, Mc Mahon BJ 1987. Spontaneous Death of Echinococcus multilocularis Cases Diagnosed Serologically (by EM2 ELISA) and Clinical Significance. Am J Trop Med Hyg, 36(3) 576-85.

37. RICKARD MD, Lightowers MW 1986. Immunodiagnosis of Hydatid Disease. Thompson ed., The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease. George Allen & Unwin, London 217-49.
38. SCHANTZ PM, Clerou RP, Liu IKM, Schwabe CW 1970. Hydatid Disease in the Central Valley of California: Transmission of Infection Among Dogs, Sheep, and Man in Kern County. Am J Trop Med Hyg, 19(5) 823-30.
39. SCHANTZ PM, Kagan IG 1980. Echinococcosis. Houba, ed., Immunological Investigation of Tropical Parasitic Diseases. Edinburgh, Churchill Livingstone. 104-129.
40. SCHANTZ PM, Schwabe CW 1969. Worldwide Status of Hydatid Disease Control. J Am Vet Med Ass 155, 2104-21.
41. SCHANTZ PM, Von Reyn CF, Wety T, Andersen FL, Schultz MG, Kagan IG 1977. Epidemiologic Investigation of Echinococcosis in American Indians Living in Arizona and New Mexico. Am J Trop Med Hyg, 26(1) 121-6.
42. SCHANTZ PM, Williams JF, Riva Posse C 1973. Epidemiology of Hydatid Disease in Southern Argentina: Comparison of Morbidity Indices, Evaluation of Immunodiagnostic Tests, and Factors Affecting Transmission in Southern Rio Negro Province. Am J Trop Med Hyg 22(5) 629-41.
43. SCHWABE CW 1984. Current Status of Hydatid Disease: a Zoonosis of Increasing Importance. 81-113.

44. SCHWABE CW, Abou Daoud K 1961. Epidemiology of Echinococcosis in the Middle east. Am J Trop Med Hyg 10,374-81.
45. TODOROV T, Stojanov G 1979. Circulating Antibodies in Human Echinococcosis Before and After Surgical Treatment. Bull WHO, 57, 751-8.
46. UNER A 1985. Izmir ve Civarında Köpeklerde Echinococcus granulosus üzerindeki Araştırmalar. Doktora Tezi.
47. VARELA-DIAZ VM, Colhorti EA, D'Alessandro A 1978. Immuno-electrophoresis tests showing Echinococcus granulosus arc 5 Human cases of Echinococcus vogeli and Cysticercosis-multiple myeloma. Am J Trop Med Hyg. 27,554-7.
48. VARELA-DIAZ VM, Colhorti EA, de Zavaletta O, Perez-Caviglia H, Zabert EI, Guarnera EA 1983. Immunodiagnosis of Human Hydatid Disease: Applications and Contributions to a Control Program in Argentina. Am J trop Med Hyg, 32(5) 1079-87.
49. VARELA-DIAZ VM, Coltorti EA, Prezioso V, Lopez Lemes MH, Guisantes JA, Yarzabal LA 1975. Evaluation of Three Immunodiagnostic Tests for Human Hydatid Disease. Am J Trop Med Hyg 24(2), 312-9.
50. VARELA-DIAZ VM, Coltorti EA, Ricardes MI, Prezioso V, Schantz PM, Garcia R 1976. Evaluation of Immunodiagnostic Techniques for the Detection of Human Hydatid Cyst Carriers in Field Studies. Am J Trop Med Hyg 25,617-22.

51. VARELA-DIAZ VM, Guisantes JA, Ricardes MI, Yarzabal LA, Colhorti EA 1975a. Evaluation of Whole and Purified Hydatid Fluid Antigens in the Diagnosis of Human Hydatidosis by the Immuno-electrophoresis test. Am J Trop Med Hyg, 24, 298-303.
52. VARELA-DIAZ VM, Lopes-Lemes MH, Prezioso U, Colhorti EA, Yarzabal LA 1975b. Evaluation of Four Variants of the Indirect Hemagglutination Test for Human Hydatidosis. Am J Trop Med Hyg, 24(2), 304-11.
53. YARZABAL LA, Leiton J, Lopez-lemes MH 1974. The Diagnosis of Human Pulmonary Hydatidosis by the Immuno-electrophoresis Test. Am J Trop Med Hyg, 23(4) 662-6.
54. YARZABAL LA, Schantz PM, Lopez-Lemes MH 1975. Comparative Sensitivity and Specificity of the Casoni Intradermal and the Immuno-electrophoresis tests for the Diagnosis of Hydatid Disease. Am J Trop Med Hyg. 23,662-6.

ÖZGEÇMİŞ

1960'da İzmir'de doğdum. İlköğrenimimin ardından girdiğim Bornova Anadolu Lisesini 1977'de bitirdim. 1977-1983 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde öğrenim gördüm. 1983 yılında bu fakülteden Tıp Doktoru olarak mezun oldum. Ağrı ili 2 nolu Merkez Sağlık Ocağında mecburi hizmetini tamamladım. Askerliğimi İstanbul Levazım Amirliği Tabibi olarak yaptıktan sonra 1987'de girdiğim Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalında Uzmanlık Öğrencisi olarak çalışmaktayım. Bekarım ve iyi derecede İngilizce bilmekteyim.

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi