

T.C.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PARAZİTOLOJİ BİLİM DALI

86767

**HİDATİK KİST SIVISINDAN ÖZGÜL ANTİJENLERİN
SAFLAŞTIRILMASI ve LATEKS AGLÜTİNASYON YÖNTEMİ
KULLANILARAK TİCARİ ANTİJEN İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

T 86767

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülay ARAL AKARSU

DANIŞMAN: Prof. Dr. Kürşat ALTINTAŞ

ANKARA-1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Kürşat ALTINTAŞ'a, Parazitoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Çiğdem GÜNGÖR'e, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. A. Tefik CENGİZ'e, tez çalışmalarım sırasında yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Haluk ATAÖĞLU'na, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, uzmanlarına, asistan arkadaşlarıma ve tüm personele; ayrıca çalıştığım hasta serumlarını sağlamakta bana yardımcı olan Numune Hastanesi 4. Genel Cerrahi Kliniği Şef Yardımcısı Sayın Dr. Mete DOLAPÇI'ya; en son olarak da benimle herşeyi paylaşan sevgili eşim Dr. Cem AKARSU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gülay ARAL AKARSU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Morfoloji, Yaşam Döngüsü ve Epidemiyoloji	4
2.2. Patoloji ve Klinik	8
2.3. Tanı	10
2.3.1. Direkt Mikroskopik İncelemenin Rolü	10
2.3.2. Radyolojik Görüntüleme Yöntemlerinin Rolü	10
2.3.3. Serolojinin Rolü	12
2.3.3.1. Serolojide Kullanılan Antijenler	15
2.3.3.2. Antijen Safılaştırma ve Tanımlama Yöntemleri (Afinite Kromatografisi, Elektroforez ve Immunoblotting)	20
2.4. Tedavi ve Takip	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Serumlar	28
3.2. Antijen Hazırlanması	28

3.2.1.	Kist Sıvısı	28
3.2.2.	Afinite Kromatografisinin uygulanması	29
3.3.	Antijenik Preparasyonların Tanımlanması	30
3.3.1.	SDS-PAGE'nin Yapılması	30
3.3.1.1.	Separasyon Jelinin Hazırlanması	30
3.3.1.2.	Stacking Jelin Hazırlanması	31
3.3.1.3.	Jelin Boyanması	33
3.3.2.	Immunoblotting'in Yapılması	34
3.4.	Lateks Partiküllerinin Kaplanması	35
3.5.	Lateks Aglütinasyon Testinin Uygulanması	36
3.6.	Ticari Lateks Aglütinasyon Testinin Uygulanması	37
4.	BULGULAR	38
5.	TARTIŞMA	41
6.	SONUÇLAR	48
7.	ÖZET	49
8.	SUMMARY	51
9.	KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

AE	: Alveolar ekinokokoz
BT	: Bilgisayarlı tomografi
d H ₂ O	: Distile su
ECR	: Enhanced chemiluminescence
ELISA	: Enzyme linked immunosorbant assay
Ig	: Immunoglobulin
IHAT	: İndirekt hemaglütinasyon testi
kDa	: Kilo dalton
KE	: Kistik ekinokokoz
LAT	: Lateks aglütinasyon testi
μ	: Mikron
MRI	: Manyetik rezonans imaging
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	: N,N,N,N-tetramethylethylenediamine
USG	: Ultrasonografi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlarda larva formunun hastalığa yol açtığı bilinen dört *Echinococcus* türü; kistik ekinokokoz (KE) etkeni olan *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786), alveolar ekinokokoza (AE) neden olan *Echinococcus multilocularis* (Leuchart, 1869), polikistik ekinokokoza yol açan *Echinococcus oligarthus* (Oresing, 1863) ve literatürde çok az sayıda vakası bildirilen *Echinococcus vogeli* (Rausch ve Bernstein, 1972)'dir (41, 50).

E. granulosus, yaşam döngüsünde evcil ve vahşi köpekgillerin son konak, koyun, sığır, ren geyiği gibi pekçok evcil ve vahşi hayvanın ara konak olarak yer aldığı, kozmopolitan bir dağılımı olmakla beraber, büyük ölçüde hayvancılıkla uğraşılan kırsal alanlarda ve her iklim koşulunda yaygınlık gösteren bir sestoddur (20, 42). Dünyada yıllık vaka sayısı 100.000'den fazladır (69). Türkiye'de ise çok değişik rakamlar verilmekle birlikte, hastane kayıtlarından yapılan araştırmalar sonucunda yılda 2000 dolayında vakanın hastanede yattığı sonucu çıkmıştır (8).

KE'da parazitolojik tanı için hidatik kistlerin yerleşiminin değişkenliği ve başlarda non-invaziv yöntemlerin yokluğu, tanı için antijen kaynağı olarak kist sıvısının karakterizasyonunu ve laboratuvar metodlarının araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Duyarlı ve özgül bir testin kullanılması ile KE olmayan vakalarda gereksiz cerrahinin önlenebileceği açıktır (48). Klinik semptomların özgül olmaması ve enfeksiyonun nadiren parazitolojik ipucu vermesi nedeniyle KE'un serolojik tanısı, son 40 yıldır klinisyenler tarafından çok kullanılır olmuştur (68).

Bugüne kadar hidatik kist sıvısı, protoskoleks ve membran ekstraktlarında 23 değişik *E. granulosus* metasestod antijeni tanımlanmıştır (44, 51, 58, 76). Kist sıvısındaki 19 değişik antijenden 10 tanesi parazitle ilgili bulunmuştur (47). Bu nedenle kist sıvısı, KE'un serolojik tanısında en çok kullanılan antijen kaynağıdır.

E. granulosus larvası olan hidatik kistin sıvısı immunoreaktiviteleri farklı birçok protein ve karbonhidrat fraksiyonları içeren karmaşık bir yapıdadır. (24). İçinde somatik ve fonksiyonel parazit kaynaklı antijenlerin yanısıra değişik miktarda konak proteini de bulunmaktadır (33, 51, 54). Bu durum, bir yandan serolojik testlerin uygulanışını ve yorumlanmasını standardize etmeyi zorlaştırırken diğer yandan da özgüllüğü düşürmektedir (54).

Uyumlu ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için tekniklerin standardizasyonu ve antijenlerin karakterizasyonu gerekmektedir (34). Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğü, antijenlerin doğasına, kalitesine ve seçilen testin duyarlılığına bağlıdır (61, 83). Kist sıvısındaki en önemli immunojenik antijenler, ikisi de lipoprotein olan termolabil, 400 kDa ağırlığındaki antijen 5 (Capron, Vernes ve Biguet, 1967) ve termostabil, 160 kDa ağırlığındaki antijen B (Oriol ve ark., 1971)'dir (65, 83).

Çoğu serolojik reaksiyon, tanı için gerekli olan antijen spektrumunu ile elde edilebilmektedir; böylelikle saflaştırılmış uygun antijen fraksiyonlarının duyarlılığı tüm kist sıvısının kullanımındaki kadar fazla olmakta, özgüllüğü ise bölgede görülen diğer parazit enfeksiyonlarının prevalansına göre değişmektedir (79).

KE tanısında radyolojik görüntüleme yöntemleri olan ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans imaging (MRI) ve direkt grafi ile beraber uygulanan serolojik yöntemler arasında kompleman fiksasyon testi, lateks aglütinasyon testi (LAT), indirekt hemaglütinasyon testi (İHAT), indirekt immunofloresans antikor testi, immunoelektroforez, immunodiffüzyon, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting gibi yöntemler bulunmaktadır (10, 40, 41, 73). Tüm bu serolojik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin uyumlu olmamasının nedeni standardize edilmeyen, saflaştırılmamış veya kısmen saflaştırılmış antijenlerin kullanılmasıdır (10). Bugüne kadar pek çok kısmi saflaştırma yöntemi uygulanmıştır (30, 33, 34, 54); ancak bunların çoğu uygulaması zor yöntemler olup tanısal değeri olan bazı antijenlerin kaybı ile sonuçlanabilmekte; buna bağlı olarak duyarlılık düşmektedir.

Bu çalışmada lipoproteinlerin heparine bağlanması esasına dayanan afinite kromatografisi kullanılarak antijenler saflaştırılmış (10), elde edilen lipoprotein antijen fraksiyonu sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ve immunoblotting ile karakterize edilmiş ve lateks aglütinasyon yöntemi kullanılarak ticari lateks aglütinasyon kitinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu yöntemin uygun duyarlılık ve özgüllükte bulunması halinde, standardizasyonu ve uygulanması kolay bir test olarak rutin tanıda kullanılabileceği düşünölmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Morfoloji, Yaşam Döngüsü ve Epidemiyoloji

Antik çağlardan beri bilinen (yaklaşık M.Ö. 400) ancak tam olarak tanımlanması 19. yüzyılın ikinci yarısını bulan *Echinococcus granulosus*, tüm Taeniid sestodları gibi karnivor ve herbivor konaklar arasında sıklıkla geçişi olan bir zoonoz etkenidir (20, 73). *E. granulosus*, Platyhelminthes aleminin, Cestoda sınıfının, Eucestoda alt sınıfının, Cyclopylidae takımının, Taeniidae ailesinin *Echinococcus* cinsine ait bir türdür (73). Küçük erişkin hermafrodit solucanlar (1.5-8 mm), non-patojen olarak köpekgil son konakların (köpek, kurt, çakal, tilki vs.) ince barsaklarında yaşamaktadırlar. Tam olarak geliştiklerinde 3 ya da 4 proglottide sahiptirler ve en son segmentte 200-400 adet olgun yumurta bulunmaktadır. Bu yumurtalar, dışkıyla ya serbest olarak ya da gravid proglottidler içinde dış ortama atılmaktadırlar (20).

Yumurtalar (25-30 μ x 32-36 μ), diğer taeniid yumurtalarıyla aynı görünümde olup (13, 72) hem çevreyi hem de son konağın tüylerini kontamine etmektedirler. Uygun ara konak (insan, sığır, koyun vs.) tarafından alındıklarında, ince barsakta çatlayarak onkosfer (embriyo) ortaya çıkarmaktadırlar. Bu yapı, barsak epitelinden geçerek lenfatiklerden ve mezenterik venüllerden dolaşıma karışmaktadır. Konak savunmasından kurtulan *E. granulosus*'un onkosferleri en sık olarak karaciğer ve akciğer kapillerlerinde yerleşip çengellerini kaybetmekte, merkezi vezikülasyon ile olgun metasestod evresine yani hidatik kiste gelişmektedirler (20, 42, 51). Aylar sonra bu kistin içindeki parazit kaynaklı moleküller ve konak kaynaklı serum bileşenlerini barındıran steril sıvıda binlerce protoskoleks gelişmektedir. Kist duvarında, iç tarafta çok çekirdekli bir germinal (çimlenme) tabaka ve bunun dışında da kalın hücresiz laminar (kütikül) tabaka bulunmaktadır (37, 72).

E. granulosus'un larval gelişimi, tüm sestodlar içinde en karmaşık olanıdır; çok sayıda protoskoleks oluşturma potansiyeline ve yeni kistler

başlatabilecek germinal hücre kapasitesine sahiptir. Germinal tabaka diferansiye olmamış, proliferatif hücrelerden meydana gelmekte ve çimlenme kapsüllerini oluşturmaktadır. Yavru kistler kistin içine ve dışına doğru gelişebilmekte, bu yavru kistlerden ve çimlenme kapsüllerinin germinal tabakasının tomurcuklanmasından protoskoleksler oluşmaktadır. Herbir protoskoleks son konak tarafından alındığında evajine olarak barsak duvarına tutunup 5-12 haftada erişkin solucana dönüşebilmekte, böylece son konakta yüzlerce/binlerce erişkin solucan gelişmektedir. Enfekte köpeklerde ortalama 200-400 *E. granulosus* erişkin formu bulunmaktadır (20, 73). Köpek barsağında bulunan 50.000 sestodun yaklaşık olarak günde 1.000.000 yumurta üretmesi nadir değildir. Ara konakta ise protoskoleksler kist rüptürü ya da operasyon sırasında saçılımla yayılabilmekte ve sekonder KE'a yol açacak şekilde kistik lezyonlar meydana getirebilmektedirler (42, 73).

E. granulosus ile birçok hayvan enfekte olabilir ama bunların hepsi döngüde yer almamaktadır. İnsanlar enfeksiyona duyarlı olmalarına rağmen parazitin yaşam döngüsünün devamı için gerekli olan canlılardan değildirler (72).

KE döngüsünde kuzey ve Avrupa tipleri olmak üzere iki ana biyotip söz konusudur. Türkiye'de de görülen Avrupa tipinde baskın olan köpek-koyun döngüsü, 10.000 yıl önce köpeklerin evcilleştirilmesi sonucu, muhtemelen Kuzey tipinde yer alan kurt-ren geyiği döngüsünden oluşmuştur. Kuzey tipi halen Kuzey Amerika ve Rusya'nın tundralarında görülmekte ancak nadiren insanlara ulaştığında önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Köpek-koyun suşu ise insanlar için göreceli olarak daha enfeksiyözdür ve sıklıkla önemli patolojilere yol açmaktadır. Dünyada yaygın olarak, her iklim koşulunda özellikle kırsal alanlarda insanlara bulaş sıklıkla görülmektedir (20).

Toplumda *E. granulosus*'un bulaş yolu sadece parazite ait biyolojik faktörlerinden değil aynı zamanda insan davranışları ve hayat şekline de etkilenebilir. Parazite ait geçiş dinamikleri, parazit popülasyonu, son konaktaki erişkinler, ara konaktaki larvalar ve çevredeki yumurtalar ile

belirlenmektedir, bu nedenle bulaş; parazitin biyolojisi, konakların biyolojisi ve çevresel faktörlere bağlıdır. Ayrıca konakların beslenme özellikleri, insanların hastalık hakkındaki bilgileri ve koyun, sığır gibi ara konakların özellikleri de önemlidir (20, 50).

Parazitin biyolojisinde biyotik potansiyeli çok önemlidir; bu, son konaktan atılan yumurtaların bir günde ara konakta meydana getirebildiği canlı kist sayısıdır. Erişkin bir son konakta *E. granulosus*'un sayısı 200-400, bir günde atılan yumurta sayısı da 8.500 kadar kabul edildiğinde, bu yumurtaların canlı kiste dönüşme oranı 0.0033'tür. Bunlar göz önüne alındığında biyotik potansiyel, enfekte köpek başına 28 canlı kist olarak hesaplanmaktadır (20, 73).

Konakların biyolojisinde, ara konakta kazanılmış bağışıklığın ortaya çıkması en önemli faktördür. Köpeklerde bağışıklığın zayıf olduğu gösterilmiştir, ara konaktaki bağışıklık ise daha kuvvetlidir. Çoğu taeniid sestoel için onkosfere veya onkosfer sonrası erken evrelere ait kuvvetli bağışıklık bulunmaktadır ve doğal şartlarda 10 kadar yumurta bile 3-12 ay süren bağışıklığa yol açabilmektedir.

Çevresel olarak sıcaklık ve kuruluk, dış ortamda bulunan yumurtalara etki etmektedir. Genellikle yumurta +40°C'nin üstü ve -70°C'nin altındaki sıcaklıklarda birkaç saatte canlılığını yitirmekte, aradaki derecelerde olgunlaşma ve yaşlanması gerçekleşmektedir. Kuruluğa ve ısıya duyarlıdırlar, nemli ve serin havalarda yumurtaların canlı kalma süresi daha uzun olmaktadır; bu nedenle dış ortama atılan yumurtalar ara konağa karşı değişen infektif özellik göstermektedirler. Olgun olanlar canlı larva oluşturabilirken, yaşlı olanlar bağışıklık sistemi tarafından öldürülmekte veya hiç çatlamayabilmektedirler. Çevresel koşullar, yumurtaların dağılışında da önemlidir. Çoğu taeniid yumurtası dışkılandığı yerin 180 metre çevresine kadar dışkıyla veya segment hareketleri ile yayılabilirken, bazıları bir takım dipteralarla daha uzaklara taşınabilmektedirler (13, 73).

İnsanlar, köpeklerle yakın ilişki sonucunda direkt olarak ağız ve burun etrafındaki tüylerden, çiğ yenen meyve, sebze ve sudan oral yol ile veya solunum yolu ile yumurtaları alarak enfekte olabilmektedirler. Ayrıca bebekte plasenta yolu ile intrauterin bulaş da meydana gelebilmektedir. İnsanlarda DNA tiplendirmesi yapıldığında bulaşta en önemli olan suşun, koyun suşu olduğu kuvvet kazanmaktadır, bununla birlikte sığır suşunun da insanlarda enfektif olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle koyunların yoğun olduğu toplumlar daha fazla risk altındaymış gibi görünmekle beraber bu suş sığır gibi diğer hayvanlar için de risk oluşturmaktadır (20, 72).

Larval kistik enfeksiyonların kronik enfeksiyonlar olmasına bağlı olarak inkubasyon süresinin uzun olması, çabuk ve etkili tedavi uygulanamaması, gerçek insidans değerinin saptanmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle insidans yerine nokta veya süreç prevalansının belirlenmesi yoluna gidilmektedir (20).

KE'un yüksek oranda endemik olduğu ülkeler arasında, Şili, Arjantin, Brezilya, Peru, Uruguay; Fas, Cezayir, Libya, Kenya (Turkana), Etiyopya, Uganda, Tanzanya; Güney Avrupa ülkelerinden özellikle İspanya, Yunanistan, İtalya, Türkiye; İran, Irak, Suriye, Bulgaristan, Romanya, Rusya, Türki cumhuriyetler ve Çin yer almaktadır. Dünyada en yüksek prevalans % 2-6 ve yıllık insidans 50/100.000 olarak bildirilmiştir. Uruguayda insidans 20/100 000 olarak bildirilirken (14), İspanya'da 5.2-7.6/100.000 olarak kaydedilmiştir (32). Yabancı araştırmacıların yaptığı bir çalışmada, KE prevalansı Yunanistan'da % 0.07, Yugoslavya'da % 0.03, Yeni Zelanda'da % 0.01 ve Avustralya'da % 0.02 olarak verilirken, Türkiye'de % 0.3 olarak kaydedilmiştir. Yurdumuzda bu konudaki çalışmalar yeterli düzeyde değildir. Türkiye'de KE'dan başka *E. multilocularis*'in yol açtığı enfeksiyonlar ve *E. granulosus*'a bağlı multiloküler olgulara da rastlanmaktadır (51). Yurdumuzda bölgelere göre prevalans % 0.32 ile % 40 arasında değişmektedir. 1987-1994 yılları arasında Türkiye'de bildirilen KE sayısı 21.303 olup, yılda 2 000 yeni vakaya işaret etmektedir (8). Ege'de yapılan bir çalışmada hastanede tanı alan hastalar 1985 yılında toplam başvuran

hastaların % 1.05'i olarak hesaplanmış, bunların da % 58.4'ünün kadın olduğu anlaşılmıştır. Cinsiyet yanında yaş da prevalansı etkileyen bir faktördür. Kenya Türkana'da 40 yaş üstünde KE vakalarında artış varken, Kuzeybatı Çin'de 6-11 yaş arasında enfeksiyon insidansı artmaktadır. *E. granulosus*'un ara konaklarındaki enfeksiyon oranları, bir bölgede geçişi gösteren en önemli göstergelerdir (20, 51). Türkiye'de koyunlardaki prevalans % 3.9 ve sığırlardaki de % 2.8 oranında bildirilmiştir. Köpeklerdeki prevalans da epidemiyolojide önemlidir ve Türkiye'de yapılan bir çalışmada % 53 olarak bildirilmiştir, ancak bu oran tek başına insana geçiş hızını her zaman yansıtmamaktadır (21, 51).

2.2. Patoloji ve Klinik

E. granulosus'a bağlı metasestod enfeksiyonlarında patolojik seyir, esas olarak yer kaplayan kistin organ ve dokularda meydana getirdiği basınca bağlıdır. Patolojik olarak *Echinococcus* türlerinin metasestod evresinde aseptik çoğalma geçirmesi önemlidir. Olgularda tipik olarak uniloküler, içi sıvı dolu, parazit kaynaklı kalın bir laminar tabaka olan tek kist bulunmakla beraber, KE olgularının % 20-30'unda tek veya çoklu organlarda çok sayıda kist bulunabilmektedir. KE'da sabit bir prodromal semptomatoloji bulunmamaktadır. Başlangıçta yumurtanın ağız yoluyla alınmasından sonra her zaman asemptomatik bir dönem yer almakta, bu dönem uzun yıllar hatta hayatın sonuna kadar devam edebilmektedir. İnsanlarda kistin başlıca yerleşim yerleri karaciğer (% 66) ve akciğerdir (% 22). Kistlerin daha az görüldüğü doku ve organlar ise kemik (% 2), böbrek (% 3), beyin (% 1), kalp, dalak, kas ve tiroid (% 6) olarak sıralanmaktadır (36). Böyle kistlerin görülmesi yüksek endemik koşulların bir göstergesi olup İtalya, Kuveyt, Suudi Arabistan, Güney Afrika, İspanya, Suriye, Tunus, Türkiye gibi ülkelerde rastlanmaktadır. Komşu organ ve dokulara baskı sonucu semptomların ortaya çıkması için geçen inkubasyon dönemi, kistin yerleşim yerine ve büyüme hızına bağlıdır. Ayrıca yaş, immun sistemin durumu, konaktaki diğer hastalıklar ve parazitin suş farklılıklarından etkilenebilmektedir. İnflamatuvar reaksiyon sonucu kist çevresinde fibröz adventisya tabakası oluşmakta,

genelde insanlarda 5 ay-1 yıl arasında kist çapında 1 cm büyüme görülmektedir, ancak bu büyüme 4-5 cm çapa da ulaşabilmektedir. Sonuçta, kist boyutları 1cm ile 20 cm arasında değişmektedir. evre doku hücrelerinde atrofi ve basınç nekrozu meydana gelmekte, beyin ve gözde küçük boyutlarda bile hemen semptomlar meydana gelirken karaciğer ve akciğerde yıllarca , kist belli bir büyüklüğe gelene kadar, semptoma rastlanmamaktadır. Bu nedenle intraserebral kistlerin çoğunluğu ilk dekatlarda tanınırken, karaciğer ve akciğerdekiilerin tanısı ileri yaşlara kadar uzayabilmektedir (13, 20, 42).

Germinal epitelin ve protoskolekslerin rejeneratif kapasitesi, KE'da endojen yavru kistlerin oluşumuna yol açmaktadır. Buna bağlı olarak operasyon sırasında veya travmayı takip eden kist rüptürlerinde, germinal membran parçaları, protoskoleksler, çimlenme kapsülleri ve yavru kistlerin yayılması sonucu sekonder KE riski ortaya çıkmaktadır. Bu durumda da 2-8 yıla kadar belirti görülmeyebilmektedir (13, 72).

Primer KE için st karın ağrısı ve sarılık patognomonik olmamakla birlikte göreceli olarak daha sık görülen semptomlardır. Basınca bağlı olarak karaciğer ve akciğerde nekroz; kan ve lenfatik damarlarda veya safra yollarında tıkanma; ayrıca bronşial, peritoneal ve intrabiliyer boşluklara açılma sonucunda da yerel semptomlar oluşmaktadır. Kistlerin rüptürüne bağlı allerjik reaksiyonlar veya kistlerin bakteriyel enfeksiyonu, başlangıçta görülen akut semptomların % 5-20'sinin sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Mortalite, sekonder ve enfekte kisti olanlarda daha fazla olmak üzere, vakaların % 1-5'inde görülmekte ve bir vakaya uygulanan operasyon sayısının çokluğu, bu riski arttırmaktadır. Endemik bölgelerde, bazı hastalarda metasestodun spontan dejenerasyon ve kalsifikasyonu gelişebilmektedir (11, 50, 73).

2.3. Tanı

Ön tanının non-invaziv olarak doğrulanması serolojik ve radyolojik görüntüleme yöntemlerinin beraber kullanılması ile yapılabilmektedir. KE tanısı; direkt mikroskopik inceleme, radyolojik görüntüleme yöntemleri ve indirekt immunolojik yöntemler olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır (72).

2.3.1. Direkt Mikroskopik İncelemenin Rolü

Kist sıvısında, doğrudan veya çöktürme sonrası protoskoleksler, membran parçaları ve/veya çengeller aranmaktadır. Bu yapılara rastlanamayan kist sıvılarında ön tanıyı doğrulamak amacıyla indirekt yöntemlere başvurularak antijen aranması yoluna gidilebilmektedir. Eğer sıvı içinde kist elemanları bulunamadıysa veya histoloji için uygun değilse antijenin varlığının araştırılması kistin yapısını anlamakta çok yardımcıdır (58). Perkütan aspirasyon biyopsisi gibi invaziv tanısal yöntemler, ancak hastanın karaciğerinde hidatik kist bulunmasına rağmen seronegatif ise uygulanabilmektedir. Aspiratta protoskoleks, çengel ve membranların gözlenmesi, tanıyı doğrulayıcıdır. Aspiratta antijene bakılması steril kist sıvısında bile sonuç verebilir çünkü böyle sıvılarda da antijen olabileceği yolunda çalışmalar bulunmaktadır (19, 42). Balgam veya idrarda da hidatik kist parçaları aranabilmektedir (58).

2.3.2. Radyolojik Görüntüleme Yöntemlerinin Rolü

Direkt grafi, USG, BT ve MRI, tüm organlarda derin yerleşimli lezyonların tanısını kolaylaştırmakta ve avasküler kistlerin içeriğini ve durumunu ortaya koymaktadır. Bu yöntemlerin en gizli lezyonları belirleyebilmesi, lezyonun hangi evrede olduğunu saptayabilmesi (intakt, ünilocüler, rüptüre olmuş, kız veziküllerle komplike veya kalsifiye gibi) ve diğer organ ve vital yapılara göre boyutlarını ortaya çıkarabilmesi, tanı ve preoperatif değerlendirmeyi kolaylaştırmaktadır (42). Bu yöntemler, cerrahi veya kemoterapi sonrası takipte önem kazanmış yöntemlerdir.

USG, pahalı olmadığı ve radyasyon riski taşımadığı için en çok kullanılan, özgül (% 80) ve duyarlı (% 70-80) bir yöntemdir. 0.5-1 cm'ye kadar olan lezyonlar bu yöntem ile saptanabilmektedir ve bazı karakteristik görüntüler enfeksiyon için patognomoniktir ancak serolojik olarak doğrulanmasına ihtiyaç bulunmaktadır (20).

Gharbi (1981)'nin *E. granulosus* metasestod enfeksiyonları için tarif ettiği USG klasifikasyonu şu şekildedir:

Tip I : üniveziküler, sıvıyla dolu, iyi sınırlı basit kist

Tip II : membran varlığı (laminar veya ayrılmış duvar)

Tip III: septa ve/veya kız veziküllerin varlığı

Tip IV: hiper/hipoekoik olan solid kitle

Tip V : Kalsifikasyonların varlığı ve hiperekoik kitle

Genelde Tip II ve Tip III, KE için patognomonik olarak kabul edilir. Tip I'i basit, non-parazitik epitelyal karaciğer ve böbrek kistlerinden ayırmak için serolojik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. USG, hepatik alveolar ekinokoz ve kistik ekinokozu birbirlerinden kolaylıkla ayırdedebilmektedir.

BT ve MRI'in, USG'den daha özgül ve detaylı bilgi vermesi, özellikle merkezi sinir sistemi, idrar yolları ve kemik gibi daha az görülen lokalizasyondaki kistlerde fayda sağlamaktadır. Klinik olarak ilerlemiş enfeksiyonlarda, özellikle çoklu kistlerin varlığında, serolojik yöntemler ile görüntüleme yöntemlerinin sonuçları çok uyumludur. BT'nin yüksek rezolüsyon ve tüm vücuda uygulanabilme gibi avantajları bulunmakta, beyin veya abdomende lokalize olan ve özellikle kalsifiye olmuş lezyonların saptanmasında iyi sonuç verdiği bilinmektedir. MRI, kalsifiye kistleri iyi görüntüleyememesine rağmen yumuşak dokuda aktif olan kistlerde ve dolayısıyla kemoterapiye cevap veren ve dejenere olan parazit dokusunda mükemmel sonuç vermektedir (59).

Direkt grafi genellikle akciğer kistlerinin ayırımında önem kazanmaktadır.

2.3.3. Serolojinin Rolü

Serolojik yöntemler, klinik ön tanıyı doğrulamak ve seropidemiolojik çalışmalar yapmak için kullanılmaktadırlar (69).

KE'da esas olarak IgG ve daha az miktarda da IgM, A ve E antikorları oluşmaktadır (4, 36). Serolojik tanıda en çok IgG kullanılmaktadır. KE'da serolojik yöntemlerin uygulanması, 1906 yılında Ghedini'nin kompleman birleşmesi ve 1907 yılında Fleig-Lisbonne'nin presipitasyon testlerini kullanmaları ile başlamıştır. Günümüzde ise KE tanısında kompleman birleşmesi testi, İHAT, LAT, immünodifüzyon, immunoelektroforez testleri (Çift diffüzyon ve counter current immunoelektroforez), indirekt floresans antikor testi, ELISA, dot ELISA, SDS-PAGE ve immunoblotting yöntemleri gibi bilinen ve güvenilir sonuç veren tüm serolojik testler kullanılmaktadır (41, 51, 57).

Bunların arasında yer alan LAT'nde inert antijen taşıyıcısı olarak lateks partikülleri kullanılmaktadır. KE tanısında ilk kez 1960 yılında Fischman tarafından kullanılan bu test, kist sıvısı antijenleri ile duyarlılaştırılmış lateks partiküllerinin hasta serumu ile karşılaştırılması sonucu 8-10 dakika içinde gözle görülür aglütinasyonun oluşması esasına dayanmaktadır (10, 74, 76). Bazı araştırmacılar tarafından LAT'nin kolay, duyarlı, ve özgül olduğu bildirilirken, bazıları da özgüllüğün düşük olduğunu savunmaktadırlar (32, 71, 74, 75). Bu değişkenliklere lateks partiküllerinin tipleri ile kullanılan yöntemlerin farklılığının neden olabileceği bildirilmiştir.

Bazı testlerde ortaya çıkan yanlış pozitif reaksiyonlar, gereksiz cerrahi girişimlere ve tehlikeli kemoterapiye yol açabilmektedir. Yanlış negatif sonuçlar da özellikle akciğer kistlerinde % 50'ye varabilmekte ve tanıyı geciktirmek suretiyle aynı derecede yanlış yönlendirici olabilmektedir (42). Bunları engelleyebilmek için klinisyenin, testlerin özellikleri, hasta ve yanlış sonuçla ilgili parazit faktörleri hakkında bilgiye sahip olması gerekmektedir. Negatif sonuçlar, KE'un olmadığını göstermemektedir, çünkü bazı hastalar saptanabilir antikorlara sahip değildirler. Saptanabilir bağışık cevaplar kistin

yeri, bütünlüğü ve canlılığı ile ilişkilidir. Karaciğerdeki kistler, akciğerdekilerden daha fazla IgG antikor cevabı ortaya çıkarmaktadırlar, bununla birlikte akciğer kistlerinde az miktarda ve devamlı antijen salınımı olduğundan IgM cevabı daha baskın olmaktadır (22, 71). Yerleşim yerinden bağımsız olarak bütünlüğünü koruyan kistlere karşı serolojik testler daha az duyarlıdır. Bu sağlıklı metasestodlar, kist duvarı bütünlüğüne bağlı olarak değişik miktarlarda antijenik uyarı yapmaktadırlar (22, 77). Kistte meydana gelen bir fissürasyon veya rüptür, antikorların anamnestic stimulasyonuna yol açmaktadır. Kistin ölümü, konaktaki uyarımı ortadan kaldırmakta ve böyle kist taşıyıcıları seronegatif saptanabilmektedirler. Yanlış negatif sonuçların bir başka nedeni olan "antikor mopping"de (antikor tükenmesi), dolaşımdaki antijen-antikor birleşmesi ile immun kompleksler oluşmakta ve dolaşan antikor saptanamamaktadır (22, 42).

Son yıllarda, tanısal önemi olan pek çok antijen tanımlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır (30, 33, 48, 54, 68, 75). Kısmi olarak saflaştırılmış antijen preparasyonları ya da rekombinant antijenlerle, duyarlı immunolojik testler uygulanmaktadır. Alveolar ekinokokozlu hastaların % 30'u ve sistiserkozlu hastaların da % 5-15'i çapraz reaksiyon göstermektedir (48, 69); ancak bu parazit enfeksiyonlarına özgüllüğü % 98-100 civarında olan antijenler bulunduğu için ayırıcı tanı sorun olmamaktadır. İnsan KE'unda ELISA ve LAT gibi duyarlı serolojik yöntemlerle ve nativ veya rekombinant özgül antijenler kullanılarak elde edilen en özgül sonuç % 70 civarındadır. Genellikle komplikasyonlu ve çoklu kistleri olan vakalarda serolojik testler % 70'in üstünde duyarlı bulunmaktadır (20).

Antikor saptama testlerinde duyarlılık ve özgüllük, kullanılan tekniğe ve antijene bağlıdır, parazit antijenlerinin saflaştırıldığı bazı metodlarla tanı testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü arttırılabilmektedir (69). Taeniid zoonozlar arasında duyarlılıkta en fazla değişiklik, özellikle IgG izotip antikorlarını belirleme yeteneği açısından, KE'da ve nörosistiserkozda olmaktadır. KE'da hastanın seroreaktivitesi, karaciğerde çok sayıda canlı kist olduğunda (% 70-95); karaciğer dışında, kısmen veya tamamen kalsifiye, tek ve

bütünlüğünü koruyan bir kiste sahip olanlardan (% 30-60) çok daha yüksek saptanmıştır (20, 32, 40, 62, 71).

İnsanda KE'da doğal hikaye çok iyi karakterize edilemediğinden, enfeksiyon seyrinde erken ve geç antikor cevaplarının doğası hakkında veri eksikliği vardır. Bu durum, neredeyse tüm tanısal testlerin; antikorların saptanmasına bağlı olduğu, klinik olarak tanımlanmış ve hastanede yatan hastaların serumlarıyla standardize edildiği bir ortamda önem kazanmaktadır. Bu hastalarda seroreaktivite fazla olduğundan teste duyarlılık yüksek olmaktadır. Asemptomatik hastalar ise daha genç ve intakt bir kiste sahip olduklarından daha az reaktiftirler, böyle hastalarda aktif hastalıkta bile antikora rastlanmamaktadır (4, 20).

Serolojik testler, serolojik tarama çalışmalarında vaka saptanmasının yanında, özellikle etken ile karşılaşmanın belirlenmesinde seroepidemiyojik bir değer taşımaktadır. Etken ile karşılaşmanın her zaman kist oluşumuyla sonuçlanmamasının nedenleri, cansız veya yaşlı yumurtalarla enfeksiyon, etkili anti-onkosfer bağışıklık ve post-onkosferal bağışıklığın varlığı olarak sıralanabilmektedir. Bununla beraber aktif bir enfeksiyon saptanamayan durumlarda, metasestoddan çok onkosfere karşı oluşan antikor cevabına bakılması etken ile karşılaşmayı yansıtabilmektedir. Doğal koşullar altında, tekrarlayan bulaşlar sonucu bir bağışıklık kazanılmaktadır. Endemik bölgelerden alınan KE pozitif serumların, endemik olmayan bölgelerden alınan serumlara göre in vitro olarak onkosferleri daha etkin öldürebilmeleri, kazanılmış bağışıklığı açıklayabilmektedir (20).

KE vakalarının % 50'sinin serumunda dolaşan antijenler saptanmıştır (22). Antikoru negatif veya sınırda olan hastalarda, kistin canlılığını göstermesi açısından bu antijenlerin saptanması yoluna gidilebilmektedir. Bu amaçla bakteriyel koaglütinasyon testi tanımlanmıştır (67). Bazı araştırmacılar, ELISA ile özgül antijenlerin saptanmasının, antikor veya immun kompleks saptanmasından daha özgül olduğunu bulmuşlardır (22, 67). Ancak bu yöntemin duyarlılığının düşük ve değişken olması nedeniyle tanıdan çok, tedavi sonrasında takipte kullanılmasının daha uygun olduğu bildirilmiştir.

Bunun dışında tanıda "antikör mopping"den kaynaklanan yanlış negatifliklerin engellemesi için dolaşan immün komplekslerin saptanması yoluna da gidilebilmektedir. Oluşan immün komplekslerin asit ile muamele edilmeleri sonucu testten önce parçalanmaları, dolaşan antijenlerin tespit edilmesini ve serolojinin duyarlılığının artmasını sağlamaktadır. Ancak bu durumda yanlış pozitiflikler de artabilmektedir (20, 62).

2.3.3.1. Serolojide Kullanılan Antijenler

Serolojik testlerin sonuçlarının uyumlu bulunmamasının nedeni, büyük olasılıkla kullanılan saflaştırılmamış veya kısmen saflaştırılmış antijenlerin standardizasyonunun olmayışdır (34). *E. granulosus* larvası tarafından meydana getirilen kistik ekinokokozun serolojik tanısında en çok kullanılan antijen, ara konakların kistlerinden alınan hidatik kist sıvısıdır. Kist sıvısı antijenlerinin bazı helmint antijenleriyle çapraz reaksiyon vermesi ve bu sıvının konak antijenleri de içerebilmesi, özgül tanıyı zorlaştırmaktadır (33, 51, 54). Böylece yüksek dereceli bir özgüllükle parazit antijenlerinin tanımlanması ve izolasyonu gündeme gelmiştir. Saflaştırılan antijenlerden termolabil lipoprotein antijen 5 ve termostabil lipoprotein antijen B en önemli antijenler olarak düşünülmektedir (10, 23).

Capron, antijen 5'i gösteren immunoelktroforetik ark 5'in tek tanı kriteri olabileceğini kabul etse de daha sonradan *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *T. solium* gibi helmintlerle çapraz reaksiyon gösterdiği saptanmıştır (48). SDS-PAGE ile indirgeyici olmayan koşullarda ayrılan antijenlerden 62 ve 52 kDa ve indirgeyici koşullarda ayrılan 38 ve 23 kDa olanların antijen 5'i ve hem indirgeyici hem de indirgeyici olmayan koşullarda ayrılan 23, 16, 12 kDa. olanların ise antijen B'yi oluşturduğu bildirilmiştir (10, 68). Antijen 5'in immunoreaktivitesi daha fazla görünmekle beraber antijen B, konsantrasyon açısından 10 kat daha fazladır. 12 ve 16 kDa'luk antijenlerin, nisbeten düşük immunoreaktivitesi nedeniyle, serumda monospesifik antijenler aracılığıyla direkt olarak saptanması gerekmektedir (68). Antijen 5 ve antijen B'nin çok özgül olmadığı anlaşıldıktan sonra daha özgül alt gruplara yönelme başlamıştır.

Saflaştırma yöntemleri olarak; diyaliz yöntemleri, afinite kromatografisinin değişik tipleri, SDS-PAGE, Western blotting, agar jelde çift difüzyon, immunoelektroforez gibi yöntemler kullanılmıştır (10, 48, 68, 75, 79).

Capron ve ark. immunoelektroforezde pozitiflik kriterlerini anoda göçen beşinci bandın özgül olarak ortaya çıkmasına bağlamışlar ve 350 hastada %91.7 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Sorice ve Castagnari, aynı yöntemin duyarlılığını %75 bulmuşlar ve sonuç olarak hidatik sıvıda tanısıl değeri olan çok sayıda elektropozitif bandın bulunduğunu bildirmişlerdir (73).

Williams ve arkadaşları birbirini takip eden tamponlama ve dializlerden sonra iki lipoprotein antijeni elde etmişler ve bunlara A ve B antijenleri ismini vermişlerdir. Sefadex G-200 jel filtrasyonu ile polimerik formdan oluşan antijen B'yi, antijen A'dan ayırmışlar ve bu ayırmada agarın agarozdan daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonra bu antijenleri ayrı ayrı, saflaştırılmamış koyun hidatik kist sıvısı ile serolojik testler aracılığıyla karşılaştırmışlar ve bu iki antijenin serolojik testlerde önemli rol oynadığını ortaya çıkarmışlardır. Ancak saflaştırma sırasında test pozitifliğine etki edecek belirli bazı parazit antijenlerinin de kayıp olduğunu ve bundan dolayı da saflaştırılmamış koyun kist sıvısı ile pozitif bulunan bazı hasta serumlarının saflaştırılmış antijen ile negatif çıktığını gözlemişlerdir. Tanı için gerekli olan antijen spektrumunun diğer fraksinasyon prosedürleri ile tamamlanabileceğini belirtmişlerdir (79).

Varela-Diaz ve arkadaşları, 1974'te tavşan antiserumu kullanarak yaptıkları immunoelektroforez ile koyun karaciğer ve akciğerlerinden elde edilen kist sıvılarında % 95 oranında antijen 5'i bulmuşlar, sadece bu antijenin varlığının iyi bir pozitivite kriteri olacağını söylemişlerdir. Hidatik kist sıvısında 3 tane konak antijeni ve 9 tane parazit antijeni saptamış ve yalancı pozitifliğin buna bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Konak organına karşı antiserum kullanarak immunoelektroforez ile konak proteinlerini ayırmışlardır (75).

D'Amelio ve arkadaşları, 1985 yılında 4 adet insan hidatik kist sıvısı olarak SDS-PAGE ve immunoelektroforez ile parazit antijenlerini karakterize etmeye

çalışmışlardır. Antijenlerin saflaştırılmasında kist sıvıları, anti-insan hidatik kist sıvısı bağlanmış CnBr Sepharose 4B kolondan geçirilmiş ve total protein içeriğinin % 3'ü özgül olarak elde edilmiştir. Daha sonra bunların sadviç RIA ile yüksek bağlanma kapasiteleri ortaya konmuştur. SDS-PAGE ile indirgeyici koşullarda 67, 52, 29 ve 13 kDa molekül ağırlıklı antijenler gümüş boyama ile görülmüştür. İkinci olarak SDS-PAGE ve blotting yönteminin saflaştırılmamış kist sıvısına uygulanmasında daha çok bant gözlenmiş ve bunlardan 67, 52, 29 ve 13 kDa moleküllerin saflaştırılmış antijenlere karşılık geldiği varsayılmıştır. Sonuçta da insan hidatik kist sıvısında düşük molekül ağırlıklı bazı antijenler ve daha yüksek molekül ağırlıklı indirgenebilen antijenler olduğunu düşünmüşlerdir. Yapılan çalışmalarda, blotting tekniğinin küçük moleküller için daha iyi çalıştığı kanısına varılmıştır (23).

Di Felice ve arkadaşları 1986 yılında, özgül monoklonal antikorunu immunoabsorban olarak kullanarak afinite kromatografisi ile antijen 5'i saflaştırmışlardır. Saf antijen 5, immunoelektroforez, agar jelde çift difüzyon, SDS-PAGE ve immunoblotting ile tanımlanmıştır. Monoklonal antikor kullanılarak antijen 5'in saflaştırılması kolay ve verimli olmuştur. Saflaştırılmış antijen 5 SDS-PAGE'de 66 ve 56 kDa'luk bantlar göstermiştir. İndirgeyici koşullarda tavşan anti-hidatik fraksiyonu tarafından tanınan ama monoklonal antikor ile tanınmayan 39 kDa'luk bir parça oluşmuştur (30).

Shepherd ve McManus 1987'de *Echinococcus* hidatik kist sıvısı parazit antijenlerini radyoiyodinasyon, immunopresipitasyon, SDS-PAGE ve immunoblotting kullanarak karakterize etmişler ve 5 adet alt grup antijenini; 12, 16, iki tane 20 ve indirgendiğinde 38 kDa moleküller olarak tanımlamışlardır. 16/12 kDa molekülün *E. granulosus* larvasına özgül olduğunu belirtmiş, tüm suş ve incelenen insan izolatlarında bulunduğunu bildirmişlerdir. Tüm hastaların bu antijenlere karşı antikor oluşturmadığı, ancak bu moleküllerin özgül immunolojik tanıda faydalı olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmada 38 kDa molekülün disülfid bağı ile 20 kDa moleküllerden birine bağlanarak 60 kDa tek bir molekül oluşturduğu saptanmıştır. Parazitin diğer helmintler ile çapraz reaktivliğinin kısmen 38 kDa

alt üniteye bağlı olan fosforilkolin haptenin varlığına bağlı olduğu öne sürülmüştür (68).

Al-Yaman ve Knobloch 1989 yılında hidatik kist sıvısı kullanarak hidrofobik kromatografi, anyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile 2 kist antijeni saflaştırmışlardır. Başlangıç karakterizasyonu her ikisinin de glikoprotein olduğunu göstermiştir (20 ve 48 kDa). Heterolog parazit enfeksiyonlu hasta serumları kullanılarak bu iki antijen test edildiğinde, 20 kDa olan antijen *E. granulosus* için özgül bulunmuştur. 48 kDa molekül, *E. multilocularis* hastalarının % 33'ü ile çapraz reaksiyon vermiştir (9).

Maddison ve arkadaşları, Western-blot ve SDS-PAGE kullanarak, yüksek derecede özgül ve duyarlı metodlarla, *E. granulosus* larvası için özgül olan 8 kDa molekül ağırlıklı antijeni göstermişlerdir. SDS, elektroforezden ortamından çıkarıldığında bandı görülmeyen bu antijenin duyarlılık ve özgüllüğünün (%86, %100), Shepherd ve McManus'un tanımladığı antijen B'nin 16/12 kDa alt ünitesinin duyarlılık ve özgüllüğü ile (% 77, % 100) benzer olduğunu belirlemişler ve bu antijenin, antijen B kompleksine ait gibi görüldüğü sonucuna varmışlardır. *E. multilocularis* vakalarında da %39 oranında 8 kDa antijenle reaksiyon saptamışlardır (48).

Barbieri ve arkadaşları, plazma lipoproteinlerinin glikozaminoglikanlarla ilişkisinden faydalanarak koyun hidatik kist sıvısından lipoprotein yapıdaki antijenlerin saflaştırılmasında tek basamaklı afinite kromatografisini kullanmış, heparinle hazırlanan fraksiyonun daha kolay standardize edilebilen bir preparasyon olduğunu ve yüksek performanslı lateks aglütinasyon testinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (10).

Kanwar ve Vinayak, afinite kromatografisi, SDS-PAGE ve Western immunoblot (indirgeyici ve denatüre edici koşullarda) ile 116 kDa antijenin bir heterotetramer ve 8 kDa'luk antijenin ise monomer olduğunu saptamışlardır. Sekiz kDa antijenin ısıya dayanıklı, proteolitik enzimlere ve sodyum metaperiodat oksidasyonuna duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

Biyokimyasal analiz sonucu 116 kDa antijenin lipoprotein olduğunu ve 8 kDa antijenin lipit içermediğini ortaya koymuşlardır. Yapılan ELISA'da diğer parazitlerle enfekte 7 hastanın serumu 116 kDa antijeni tanıırken, 8 kDa antijeni hiçbirini tanımamıştır. Böylece 8 kDa antijenin özgül serolojik tanıda faydalı olabileceği belirtilmiştir (44).

Kanwar ve Kanwar 1994 yılında yine kist sıvısında afinite kromatografi ile 8 kDa özgül antijeni saflaştırmışlar ve immunokimyasal analizi ile termostabil bir glikoprotein olduğuna karar vermişlerdir. Immunofloresans tekniği ile anti-8 kDa monospesifik IgG antikorları kullanarak bu molekülün protoskoleks çengellerinde olduğunu görmüşler ve hidatik hastalık gelişimini düzenleyen önemli moleküllerden olduğunu bildirmişlerdir (43).



2.3.3.2. Antijen Saflaştırma ve Tanımlama Yöntemleri (Afinite kromatografisi, SDS-PAGE ve Western blotting)

Afinite kromatografisi; adsorbsiyon kromatografisinin bir tipidir. İnert katı desteğe kovalen bağlanan özel molekül, ligand ismini almakta ve saflaştırılacak karışımdaki bileşiklerden birine karşı yüksek afinite göstermektedir. Yöntemde bu bileşiklerin liganda spesifik ve geri dönüşlü olarak bağlanma özelliği kullanılmakta; bu özellik biyolojik moleküllerin saflaştırılması ve izolasyonunda yüksek seçicilik sağlamaktadır. Saflaştırılacak madde genellikle çözünmeyen bir makromoleküldür (enzim, hormon, antikor, protein, polisakkarit, nükleik asit, vs.) ve bunu içeren solüsyon, inert bir polimer içeren kolondan geçirilirken, makromolekül bu polimere kovalen olarak bağlanan ligand ile ilişkiye girmekte ve kolonda kalmaktadır. Liganda afinitesi olmayan moleküller ise kolondan geçip gitmektedirler. Ligandlar, kompetatif inhibitörler, ürün analogları, koenzimler; katı destek ise dekstran, poliakrilamid, agaroz, selüloz olabilmektedir. Ayrılacak makromoleküller sadece ligandla özgül ilişki kurmaktadır. Ligand, makromoleküle özel ve tek afinite gösterecek bir molekül olmalı, aynı zamanda da katı desteğe bağlanacak şekilde modifiye olabilecek bir kimyasal grubu bulunmalıdır. Böylece makromoleküle kurulan bağ zayıflamamakta veya parçalanmamaktadır. Özgül olarak adsorbe edilen moleküller, iyonik gücü, pH'ı değiştirerek veya kompetatif bir ligand konarak ayrılabilirler. Metod, tek bir kromatografik basamakta bir maddeyi saf formda izole etme yeteneğindedir, bu nedenle de antijen, antikor, enzim, koenzim, polisakkarit izolasyonunda güçlü bir araç haline gelmiştir (55).

Elektroforez; yüklü moleküllerin elektrik alanda hareketidir. Biyolojik moleküllerin ayrılmasında önemli bir metod olmasının nedeni, biyopolimerlerin doğasını bozmaması ve hem yükte hem de ağırlıkta çok ufak farklılıklara duyarlı olmasıdır. Alan (zone) elektroforezi, bu metodun bir modifikasyonudur. Ayrılacak örnek, katı bir destekte dar bir banda uygulanmakta ve elektroforez sırasında, moleküller net yüklerine göre negatif veya pozitif elektroda doğru göçmektedirler. Protein tüm solüsyonda mevcut

olduğundan, bir solüsyondaki protein karışımına elektrik uygulanması tam bir separasyon sağlamamaktadır. Bu nedenle alan elektroforezinde molekül karışımı dar bir alana uygulanarak elektroforez ilerledikçe farklı hareketliliğe sahip proteinlerin ayrılması sağlanmaktadır. Elektroforezde proteinlerin kütlesi, şekli, ortamın pH'ı ve bu pH'da proteinin anyon veya katyon olması gibi nedenler ile farklı proteinler değişik göç hızı gösterip farklı elektrodalara göç etmektedirler. Destek maddesi, kağıt veya seluloz asetat ve jeller (nişasta, agaroz, poliakrilamid veya silika) olabilmektedir. Desteğin esas fonksiyonu, örnek moleküllerinin konveksiyonunu ve difüzyonunu engellemektir ama jeller, moleküler elek görevi de görerek moleküllerin büyüklüklerine göre de ayrılmasında aktif rol oynamaktadırlar.

Gereken voltaj, örnek doğasına ve destek maddenin tipine göre değişmektedir. Kağıt için jelde kullanılanlardan daha yüksek voltaj kullanılmakta, yüksek voltaj aynı zamanda difüzyonu engellemede de etkili olmaktadır. Difüzyon, moleküllerin saçılmasına, yayılmasına yol açmaktadır. Buna karşın daha yüksek voltajlar da sistemin sıcaklığını yükselterek konveksiyonu arttırmaktadır. Ayrıştırılan bileşikler özel boyalarla boyanarak, otoradyografi ile veya radyasyondan sonra floresansın gözlenmesi ile lokalize edilebilmektedirler. Preparasyon amaçlı elektroforezlerde, bileşikler destek maddeden ayrılabilen ve saf formda elde edilebilmektedirler (6).

Çok farklı jel sistemleri varsa da içlerinde en popüler olanları, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), SDS-PAGE, non-denatüre edici koşullar altında jel elektroforezi, izoelektrik fokuslama ve iki boyutlu jel elektroforezidir. Bu yöntemler yüzlerce bileşim içeren proteinlerin karmaşık yapısının çözülmesini sağlamaktadır.

Poliakrilamid jelin güçlü yapısından dolayı deterjanların veya denatüre edici ajanların da kullanılması ile bu ortam elektroforez için ideal hale gelmektedir. Bu yöntemin avantajları, aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır.

- A) Membranlardan elde edilen suda erimez proteinler deterjanlar aracılığı ile solüsyon içinde korunabilmektedirler.
- B) Viral partiküller ve multimerik proteinler gibi makromoleküler kompleksler, SDS veya üre gibi ajanlarla polipeptid bileşimlerine ayrılabilirler.
- C) Çözünmeyi takiben ortaya çıkan polipeptidlerin hareketleri, büyüklük ve yüklerine bağlı olarak sağlanabilmektedir.
- D) Bazen ayrıştırılan moleküllerin denatüre edici ajanları uzaklaştırarak yeniden oluşumlarını sağlamak da mümkündür.

SDS-PAGE, proteinlerin karakterizasyonu, karşılaştırılması ve kantitatif olarak elde edilmesinde belki de en fazla kullanılan, pahalı olmayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Proteinler, anyonik yüklü olan SDS ile birleşerek negatif yüklü kompleksler oluşturmaktadırlar. Bağlanan SDS miktarı ve dolayısıyla protein üzerindeki yük, proteinin büyüklüğü ile orantılıdır. Moleküller, yüklerindeki ve boyutlarındaki farklılığa dayanarak poliakrilamidin kalbura benzer matriksinde elektroforez ile ayırma tabi tutulmaktadırlar. Bu yöntem, standartlar kullanılarak bilinmeyen proteinlerin ağırlıklarını saptamada da üstün bir yöntemdir. Poliakrilamid jeller, akrilamid ve bisakrilamidin kimyasal polimerizasyonu ile elde edilmektedir. Polimerizasyonu başlatmak için amonyum persülfat ve katalizör olarak da TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine) kullanılmaktadır. Poliakrilamidin gözenek büyüklüğü, akrilamid konsantrasyonu ile ve çapraz bağların uzatılması yoluyla değiştirilebilmektedir (55).

SDS jel sisteminin çok tercih edilmesinin nedeni, "stacking jel" kullanılmasından kaynaklanan rezolüsyon gücüdür. "Separating jel" üzerine pH'ı farklı olan "stacking jel" konarak geniş hacimdeki örnekler çok küçük alanlara konsantre edilmektedir. "Separating jel", separasyona tabi tutulacak örneğin komponentlerine ayrıldığı, küçük gözenekli, gözenek büyüklüğü polipeptidlerin molekül ağırlığının heterojenitesine göre ayarlanabilen, pH'ı 8.8 olan bir kısımdır. Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin ayrılmasında

akrilamidin yüksek konsantrasyonları (% 10-20) kullanılırken, yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin ayrılmasında düşük konsantrasyonlar (% 5-6) tercih edilmektedir. "Stacking jel", büyük gözenekli, pH'ı 6.8 olan ve örneğin konsantre edildiği kısımdır. Örnek, "stacking jel"e konup, elektrik akımı uygulandığında, iyonlar elektrotlara doğru hareket etmektedirler. Cl⁻ iyonlarını takip eden daha büyük iyonlar stacking jelin dar alanlarında konsantre olmakta, ancak burada belirli bir separasyona uğramamaktadırlar. Hareketli moleküller, "separating jel"e ulaştıklarında, oradaki pH'da hareketleri değişmekte ve glisinat iyonları sayesinde yürütücü tampon (running buffer) içindeki elektrik alanında büyüklük ve yüklerine göre separasyona uğramaktadırlar (7).

SDS-PAGE'de tampon sistemi olarak genellikle Laemmli'nin tanımladığı sistem ve mini slab jel kullanılmaktadır. Rezolüsyonunun yüksek olması, çok az materyale gereksinim duyulması, daha kısa sürede sonuç alınabilmesi gibi nedenler, mini slab jelin daha fazla tercih edilmesini sağlamaktadır (17).

Bu yöntemin kullanıldığı alanlar:

- 1) Saflığın belirlenmesi,
- 2) Molekül ağırlığının saptanması,
- 3) Konsantrasyonun doğrulanması,
- 4) Bileşiklerin tanısı,
- 5) Modifikasyonun belirlenmesi,
- 6) Antikor üretimi için antijenlerin konsantrasyonu ve ayrımının yapılması
- 7) Western blotting yönteminin ilk aşamasını oluşturmasıdır.

Western Blotting (immunoblotting); ayrıştırılan moleküllerin jellerden membranlara transfer yöntemlerinin geliştirilmesi, proteinlerin elektroforetik analizi için yeni bir devir açılmasına neden olmuştur.

Bu fikir, DNA fragmanlarının analizi için bir yöntem geliştiren Ed Southern tarafından ortaya atılmıştır. Bu immunokimyasal yöntem, bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada kullanılmaktadır. "Blotting" denmesinin sebebi, nitroselüloz membran üzerindeki bant örneklerinin orjinal jel üstündeki örneklerin kopyası olmasıdır. Proteinlerin membranlara transferi "Western blotting", DNA izolasyonu için kullanılan yöntem "Southern blotting" ve RNA izolasyonu için kullanılan yöntem ise "Northern blotting olarak isimlendirilmiştir (5).

İmmunoblotting'in ilk tanımlamaları, birbirinden bağımsız olarak 1979'da Renart, Reiser, Stark ve Towbin, Staehelin ve Gordon tarafından yapılmıştır. Bu ilk raporlardan sonra immunoblotting yönteminin birçok adaptasyonları geliştirilip geniş bir sahada uygulanmıştır.

Membran ile çalışmanın, jele olan üstünlükleri; hızlı boyanma, düşük konsantrasyondaki örneklerin bile tanımlanabilmesi ve jel separasyonundan sonra örneklerin sürekli kaydedilebilmesidir.

İmmunoblotting iki aşamada gerçekleştirilmektedir:

1) Proteinin jelden nitroselüloz membrana transferi (Yarı kurutma ile blotting ve ıslak blotting)

2) Özgül antikor ile epitopun karşılaştırılması

SDS-PAGE ile separasyona tabi tutulmuş proteinler nitroselüloz membrana transfer edildikten sonra antikorların non-spesifik bağlanmasını önlemek için membran üzerindeki protein bağlanma kısımları bloke edilmektedir. Transfer edilmiş ilgili proteine spesifik antikor bağlanmasını, birinci antikora enzim işaretli ikinci antikorun bağlanması takip etmektedir. Enzim bağlı kompleks, uygun enzim substrat solüsyonu uygulanarak membrana yerleştirilmektedir (5).

İmmunoblotting'de çok çeşitli membranlar kullanılmasına rağmen en fazla nitroselüloz membran tercih edilmektedir. Nitroselüloza proteinlerin

bağlanmasının fizikokimyasal temelini büyük oranda birbirlerine karşı olan hidrofobik etkilerine bağlı olduğuna inanılmaktadır. İyonik etkileşimler de işe karışmaktadır. Hidrofobik etki hipotezi, bağlanmış proteinlerin Triton X-100 gibi non-iyonik deterjanlarla % 90 oranında yıkanması gözlemine dayanmaktadır. Bu bulgu, spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için deterjan içeren yıkama tamponlarının kullanılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Nitroselüloz membrana elektroforetik transfer, Towbin ve ark. tarafından tanımlanan şekilde metanol içeren bir transfer tamponu ile yapılmaktadır. Metanol, bir yandan transfer sırasında jelin şişmesini önlerken diğer yandan da jelden proteinin kopmasını azaltmasına rağmen membrana bağlanmayı arttırmaktadır.

Proteinlerin membrana tespit edilmesi, yıkama ve inkubasyon safhalarında yıkanıp gitmelerini önlemektedir. Ama bu işlemin proteinlerin epitoplarını bozup onların antikorlar tarafından tanınmasının engellenmesine yol açabilecek bir yöntemle yapılmaması gerekmektedir.

Membran üstünde oluşacak olan bantlar molekül ağırlık standartlarıyla karşılaştırılarak test değerlendirilmektedir (5, 29).

2.4. Tedavi ve Takip

İnsan KE'u için esas olarak cerrahi tedavi (drenaj, kistektomi veya karaciğer rezeksiyonu) uygulanmaktadır ve bu tedavinin başarısı; kist sayısı, büyüklüğü, organ yerleşimi, kistlerin durumu, hastanın genel durumu ve cerrahın tercihinine bağlıdır. İntra ve post-operatif komplikasyonlarla başedebilme olanakları da başarılı tedavide etkili olmaktadır (20, 25, 59). Perioperatif mortalite (% 2), postoperatif komplikasyonlar (% 10-25) ve uzun vadede rekürrens (% 2-10) minimize edilebilmektedir. Cerrahi sırasında akut komplikasyon yoksa (akut kolanjit, pulmoner komplikasyonlar) postoperatif morbidite oldukça azalmaktadır. Radikal yöntemlerin, postoperatif komplikasyonları azalttığı bilinmektedir. Örneğin biliyer fistül, konservatif

yöntemlerle % 14 ve radikal yöntemlerle % 6 oranında gözlenmektedir (25). İntrakistik olarak protoskolisidal ajanların verilmesinin yararı tartışmalıdır ve formalin de sklerozan kolanjit riski nedeniyle kullanılmamaktadır. Etil alkol, setrimid ve hipertonic tuzlu su da komplikasyonlara yol açabilmektedir. Bununla beraber, kistin hacmi ve safra yollarıyla ilişkisi her zaman doğru olarak tahmin edilemeyeceğinden skolisidal ajanların rutin olarak verilmesi önerilmemektedir (42, 59).

Antihelmintik tedavi, 7 mm çaptan küçük, izole kistler varsa ve minimal adventisyel reaksiyon olması durumunda etkili; komplike, çoklu kompartmanlı, yavru kistleri olan veya kalsifiye, kalın adventisyel reaksiyonlu kistlerde daha az etkili olmaktadır (59). Benzimidazol türevlerinden albendazol bu gruptan diğer ajanlara göre barsaktan daha iyi emilmekte ve kiste daha iyi penetre olmaktadır (42). Prazikuantel ise herhangi bir nedenle kist rüptürü veya kist sıvısının sızımı (perkütan aspirasyon biyopsisi) sonrasında verilebilmektedir. Ameliyat öncesinde albendazol, protoskoleksleri inaktive etmek, kistin bütünlüğünü değiştirmek ve kistin gerilimini azaltmak için kullanılmaktadır (52). Böylece hem sekonder rekürrens engellenmekte hem de güvenli kist manipülasyonu mümkün olmaktadır (25, 42).

Son zamanlarda yeni bir tedavi yöntemi olan PAIR (puncture, aspiration, instillation of protoscolicidal agent and respiration) cerrahiye alternatif olarak kullanılmaktadır. Özellikle albendazol tedavisi ile beraber kullanılması, komplike olmayan karaciğer KE'u için cerrahi tedaviye alternatif bir yöntemdir. Biliyer ilişkinin olduğu durumlarda PAIR, sklerozan kolanjite yol açabilmektedir (45).

KE, rekürrensi sık olan bir paraziter enfeksiyon olması nedeniyle tedavi sonrası 3-6 aydan 10 yıla kadar rekürrens takip edilebilmektedir (42). Takipte USG kullanılabileceği gibi, USG tarafından saptanamayacak büyüklük ve lokalizasyondaki rekürren kistler için serolojik yöntemlerden de yararlanılabilmektedir. Ancak antikorların kistler tedavi edildikten sonra da serumda saptanabilmesi, yeni kist oluşumunu belirlemeyi zorlaştırmaktadır.

Bu nedenle kistin varlığı ve canlılığını saptamak için serumda antijen aranması yolu da takipte kullanılabilecek bir yöntemdir (22).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Serumlar

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Göğüs Cerrahisi Klinikleri, Numune Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ve SSK Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'ne KE ön tanısıyla yatırılmış ve operasyon sonrasında tanısı doğrulanmış 84 hasta kanı alınmış ve serumları ayrılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Kontrol grubu olarak 47 sağlıklı insanın kanları ve çapraz reksiyonları saptayabilmek için de başka paraziter hastalıkları olduğu belirlenmiş 20 hastanın (*E. histolytica*, 3; *G. lamblia*, 2; *T. saginata*, 5; *T. gondii*, 5; *T. canis*, 3; *A. lumbricoides*, 2) kanları alınmış ve serumları ayrılarak -20°C'de saklanmıştır.

3.2. Antijen hazırlanması

3.2.1. Kist sıvısı

Çubuk ve Nallıhan'daki mezbahalarda tespit edilen KE'lu bir koyunun karaciğeri ve bir sığırın akciğer ve karaciğeri alınarak soğuk bir ortamda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'na ulaştırılmış ve burada aseptik koşullarda kist sıvısı aspire edilmiştir (15). Steril olduğunun anlaşılması üzerine koyun karaciğeriindeki kist sıvısı kullanılmamış ve fertil olan sığır karaciğer ve akciğeriindeki kistlerin sıvılarından faydalanılmıştır. Bunların içine 1g/l sodyum azide ve 5mM EDTA eklenerek metalloproteaz aktivite engellenmeye çalışılmıştır (10, 49). Santrifüj edilerek protoskoleksler çöktürülmüş ve üstteki hidatik kist sıvısı alınmıştır. Daha sonra kist sıvısı ve protoskoleksler ayrı ayrı kullanılına kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Afinite kromatografisinin uygulanması

Heparin ile kaplanmış akrilik bilyaları içeren suspansiyonun (Sigma H-5263) 15 ml'si ile 1.0x20cm'lik kromatografi kolonu (Sigma C-3919) doldurulmuştur. Kolon, 3mM-tris (hydroxymethyl) aminomethane, pH 7.4 ve 30mM CaCl₂ ile dengelenmiştir. Dondurulan kist sıvısı çözülerek içine 30 mM CaCl₂ ilave edilmiş ve 5 defa kolondan geçirildikten sonra kolon, dengeleme tamponuyla yıkanmıştır. Elüsyon, 1M NaCl ile gerçekleştirilmiştir. Tuzun elde edilen sıvıdan uzaklaştırılmasında, bu sıvının %0.1 sü kroza karşı benzoyl ile kaplanmış selüloz diyaliz tübü (Sigma D-7884) kullanılarak diyaliz edilmesi yöntemi uygulanmıştır. 80 tübe ikişer mililitre olacak şekilde toplanan örneklerin ilk önce kalitatif olarak protein tayini Coomasie yöntemi ile yapılmış ve protein bulunduğu renk reaksiyonu ile tespit edilen tüpler, yoğunluklarına göre havuzlanarak protein miktarları Folin-Lowry yöntemiyle saptanmıştır.

Folin-Lowry Yöntemi:

A) Na ₂ CO	35 g
NaOH	1 g
Na-K tartarat	0.025 g
d H ₂ O	250 ml
B) CuSO ₄ .5H ₂ O	125 mg
d H ₂ O	25 ml

C) A (50 ml) ve B (1 ml) solüsyonları kullanılmadan hemen önce karıştırılmıştır.

D) Folin ve Ciocalteu's fenol reaktanı 1/9 oranında sulandırılmıştır.

Protein standardı olarak kullanılan sığır serum albumini 2mg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve 2 kat dilüsyonları yapılmıştır. Protein tayini yapılan örnekler, 1/10, 1/20 ve 1/50 oranında sulandırılmıştır. Mikroplaklara 40 µl

standart ve örnek sulandırımından konmuş, C solüsyonundan kuyucuklara 160 µl eklenmiş, karıştırılmış ve oda ısısında 10 dakika inkube edilmiştir. D solüsyonundan 60 µl ilave edilerek karıştırılmış, oda ısısında karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Mikroplaklar, optik dansite 660 nm'ye ayarlanarak ELISA okuyucusunda okutulmuştur.

3.3. Antijenik preparasyonların tanımlanması

SDS-PAGE Laemmli (1970) yöntemi, %15 jel sistemi ve Bio-rad'ın geniş aralıklı, boyanmış SDS-PAGE standartları (Bio-rad 161-0318) kullanılarak yapılmış (6, 17, 35, 55), daha sonra immunoblotting uygulanmıştır (5, 15).

3.3.1. SDS-PAGE'in yapılması

3.3.1.1. Separasyon jelinin (%15) hazırlanması

1.5 M TRİS pH:8.8	2.5 ml
%30 acrylamide/0.8 bisacrylamide	4.85 ml
%10 SDS	100ml
d H ₂ O	2.5 ml
%10 amonyum persülfat	50 ml
TEMED	5 ml

TRİS, acrylamide/bisacrylamide ve SDS distile su içinde karıştırıldıktan sonra taze olarak hazırlanan %10 amonyum persülfat eklenmiş, yüklemenden hemen önce de TEMED ilave edilmiştir.

Cam plakların tarak uzunluğu ölçülerek 1 cm aşağısı işaretlenmiş ve daha önceden eritilen %2 agarozla alt tarafı kapatılan bu plaklar arasına, işaretlenen noktalara kadar pipet yardımıyla hazırlanan solüsyon konmuş, üzerine 1 ml butanol ilave edilerek jelin yüzeyinin düzleşmesi sağlanmış ve polimerizasyon için 30 dakika beklenmiştir.

3.3.1.2. Stacking jelin hazırlanması

0.5M TRIS pH:6.8	2.5 ml
%30 acrylamide/0.8 bisacrylamide	1.3 ml
%10 SDS	100 ml
d H ₂ O	6.1 ml
%10 amonyum persülfat	50 ml
TEMED	10 ml

"Separating jel" ile aynı şekilde hazırlanmıştır. "Separating jel" in polimerizasyonu tamamlandıktan sonra üstündeki butanol dökülerek 2 defa distile su ile yıkanmış, hazırlanmış olan "stacking jel", pipet ile diğer jelin üstüne dökülmüş, taraklar hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiş ve polimerizasyon için 30 dakika beklenmiştir.

Bu arada çukur başına 10 µl olacak şekilde hesaplanan ve bire bir oranında örnek tamponu (sample buffer) ile sulandırılan antijen ile jel başına 10 µl olacak şekilde molekül ağırlık standardı kapaklı eppendorf tüplere konmuştur.

Sample Buffer:

0.5M TRIS pH:6.8	1.2 ml
%10 SDS	2 ml
Gliserol	1 ml
Bromphenol blue	2 mg
d H ₂ O	4.8 ml

Hepsi karıştırıldıktan sonra sample buffer alikotlara ayrılarak -20°C'de saklanmıştır.

“Stacking jel”in polimerizasyonu gerçekleştikten sonra taraklar çıkarılmış, cam plaklar, elektroforez aletine yerleştirildikten sonra iki cam plak arası ve elektroforez aletinin haznesi yürütme tamponuyla doldurulmuştur.

Yürütme tamponu (Running buffer):

SDS	3 g
Trisma base	9 g
Glisin	4.32 g
d H ₂ O	600 ml

pH:8.3 olacak şekilde hazırlanmış ve 5 kez sulandırılarak kullanılmıştır.

Çukurlar içine molekül ağırlık standartları ve antijen-sample buffer karışımı, ince ve künt uçlu özel bir enjektör yardımıyla konmuştur. Elektroforez aletinin kapağı anot ve katod uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatılmış ve 170 V, 36 A akımda ayrıştırma işlemi başlatılmıştır. Antijenle birlikte konan sample buffer içindeki işaretleyici boya jelin dibine geldiğinde akım kesilip elektroforez durdurulmuştur.

3.3.1.3. Jelin boyanması

Jelin boyanması işlemi ayrılan protein bantlarını görmek amacıyla yapılmıştır. Ancak blotting işlemi ile devam edileceği zaman bu işlem uygulanmamıştır.

Aralık bantları (Spacer) çıkarılarak cam plaklar ayrılmıştır. Eldivenler ve jel ıslatılmış, jel alınıp çalkalayıcı üstüne konan bir petri kutusunun içindeki tespit solüsyonunda 30 dakika tutulmuştur. Sonra boyama solüsyonunun içinde 30 dakika bırakılmış ve boyanın fazlasını almak için bantlar meydana çıkana kadar renk açma solüsyonu içinde çalkalanmıştır.

Tespit solüsyonu:

%50 (v/v) metanol ve %10 (v/v) glasiyel asetik asit distile su içinde hazırlanmıştır.

Boyama solüsyonu:

Coomasie blue	200 mg
Glasiyel asetik asit	20 ml
Metanol	90 ml
d H ₂ O	90 ml

Boya ve glasiyel asetik asit karıştırıldıktan sonra metanol ve distile su ilave edilmiştir.

Renk açma solüsyonu:

Metanol	100 ml
Glasiyel asetik asit	100 ml
d H ₂ O	800 ml

Metanol ve asetik asit karıştırıldıktan sonra distile su eklenmiştir.

3.3.2. İmmunoblotting yapılması

6 adet kurutma kağıdı ve bir adet nitroselüloz membran 8x9 cm boyutlarında kesilmiş, membran distile su ile bir dakika ıslatılmış ve kurutma kağıtları transfer tamponu ile 5 dakika yıkanmıştır.

Transfer tamponu:

Tris base	1.76 g
Glisin	8.7 g
SDS	3 g
d H ₂ O	40 ml
Metanol	60 ml

Tris base, glisin ve SDS, distile su ile karıştırılıp, metanol kullanımdan önce eklenmiştir.

Blotting aletine önce 3 kurutma kağıdı sonra membran, jel ve en üste de 3 kurutma kağıdı daha konmuştur. Üzerinden Pastör pipeti yuvarlanarak hava kalması engellenmiş ve kapak kapatılarak 45 dakika 50 A sabit akım uygulanmıştır. Çıkarılan membran protein bağlama kısımlarına non-spesifik bağlanmanın engellenmesi için TBS-T, süt tozu ve sodyum azide solüsyonu içinde bir gece çalkalanmıştır.

TBS-T (yıkama solüsyonu):

Tris base	2.42 g
NaCl	8 g
1M HCl	3.8 ml

Elde edilen hacim, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve pH:7.6'ya ayarlanmıştır. İçine 1 ml Tween 20 ilave edilen bu sıvıdan 100 ml alınmış ve %3 sığır serum albumini ve % 0.2 sodyum azide (bloklama solüsyonu) eklenmiştir.

Bloklama işleminden sonra TBS-T ile 15 dakikalık bir yıkama ve 5'er dakikalık 2 yıkama yapılmıştır. KE olduğu operasyonla ve serolojiyle kanıtlanmış bir hastanın serumu, 10 ml TBS-T ve 100 mg sığır serum albumini karışımında 1/500 olacak şekilde sulandırıldıktan sonra membranın üzerine konmuş ve çalkalayıcıda çalkalanarak 2 saat inkube edilmiştir. Yıkama solüsyonu (TBS-T) ile 15 dakikalık bir ve 5'er dakikalık 2 yıkama yapıldıktan sonra sekonder antikor (HRP conjugated goat anti-human immunoglobulin G, Sigma A-0293) 1/10.000 sulandırılarak membran üstüne dökülmüş ve bir saat çalkalanarak inkube edildikten sonra membran bir defa 15 dakika ve 4 defa da 5'er dakika yıkanmıştır. Enhanced Chemiluminescence (ECR) yapılmak üzere 2 ayrı ECR reaktanı (RPN 2109) karıştırılarak membrana uygulanmıştır (29). Karanlık odada membrandaki bant ışınları filme alınmış ve daha sonra geliştirme (developing) solüsyonundan, sudan ve tesbit (fixing) solüsyonundan geçirilmiştir. Banyosu yapılan film kurutularak bantlar, film üstünde gözlenmiştir.

3.4. Lateks partiküllerinin kaplanması

Lateks partikülleri (Polystrene latex beads, Sigma LB-8 dia: 0.813 μ ve Sigma LB-3 dia: 3 μ), adsorpsiyon yöntemine göre tek tabaka kaplama için gerekenden fazla proteini bulunduracak şekilde kaplanmıştır (70).

Kaplama/yıkama tamponu:

Glisin 0.15 g

d H₂O 100 ml

pH:9.2'ye ayarlandıktan sonra %0.2 NaCl eklenmiştir.

Bloklama tamponu:

Kaplama/yıkama tamponu içine %2 sığır serum albumini konarak hazırlanmıştır.

Kaplarken:

Kaplama/yıkama tamponu 2.7 ml

Antijen suspansiyonu 10 ml

Bloklama tamponu 1 ml

Lateks suspansiyonundan 0.3ml en son olarak eklendikten sonra çalkalanmaya başlanmış ve bu işlem 6 saat oda ısısında sürdürülmüştür.

İnkubasyon süresinin sonunda 3600 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı atılarak, kaplanmış lateks partikülleri 10 ml olacak şekilde kaplama/yıkama tamponuyla sulandırılmıştır.

3.5. Lateks aglütinasyon testinin uygulanması ve değerlendirilmesi

Serumlar, doğrudan ve 1:5 sulandırılarak çalışılmıştır. Siyah zemin üstünde 50 µl hasta serumu ve 35 µl kaplanmış lateks suspansiyonu karıştırılmış ve 10 dakika elle rotasyon hareketi yaptırılarak aglütinasyon açısından gözlenmiştir. Eğer 10 dakika içinde makroskopik aglütinasyon gözlendiyse sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

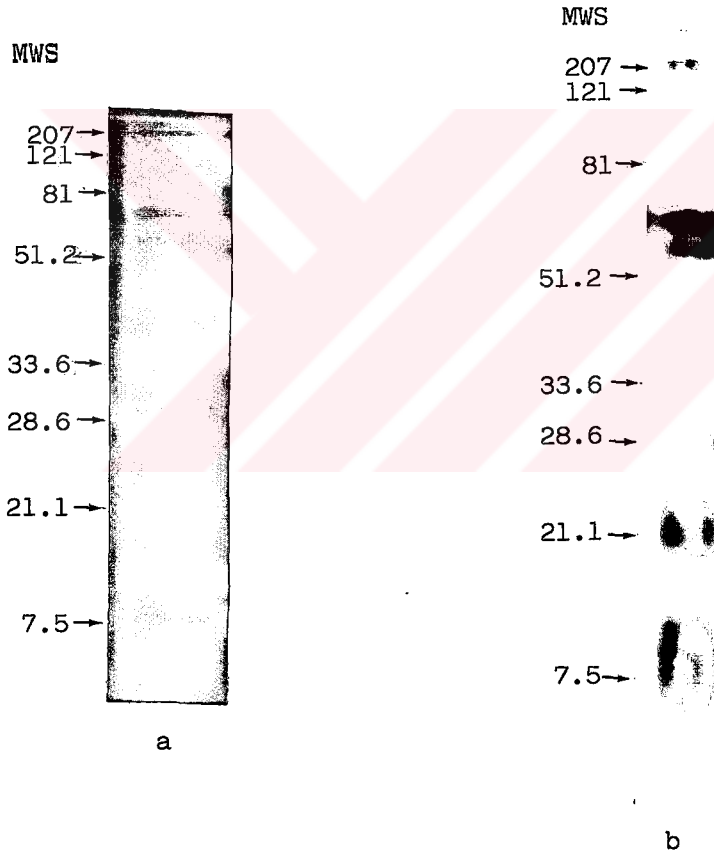
3.6. Ticari latex aglütinasyon kitinin uygulanması ve değerlendirilmesi

Alfa Biotech Echinococcosis AgglutinoTest (Lot no: 5288) üretici firmanın talimatlarına uyularak yapılmış ve serumlar doğrudan ve 1:5 sulandırılarak çalışılmıştır. 5 dakika içinde aglütinasyon gözlenmesi pozitif olarak yorumlanmıştır.



4. BULGULAR

Çalışmamızda, heparin ile kaplanmış akrilik bilyalar ile yapılan afinite kromatografisi sonucu elde edilen lipoprotein fraksiyonu, elüsyon sırasında 2'şer ml olacak şekilde 80 tüpte toplanmıştır. Bu tüplerdeki sıvılardan Coomasie boyama yöntemi ile kalitatif protein tayini yapıldığında en kuvvetli renk reaksiyonunu veren tüplerdeki sıvılar birleştirilmiş ve yapılan Folin-Lowry kantitatif protein tayini ile en yüksek protein içeriği, 201 mg/l olarak belirlenmiştir.



Resim-1 a) SDS-PAGE: Antijen 5 (52 kDa, 62 kDa) ve antijen B (8kDa, 21kDa)'ye ait olduğu düşünülen antijen bantları (Coomasie blue ile boyama). MWS: molekül ağırlık standardı. b) Immunoblotting: Aynı bantların özgül reaksiyon vermesi (ECL yöntemi).

Bu fraksiyonun karakterizasyonu, SDS-PAGE ve immunoblotting uygulanarak yapılmıştır. Böylelikle saflaştırma sırasında, KE tanısında önemli olduğu belirlenmiş, antijenik bantlardan herhangi bir kayıp olup olmadığı anlaşılmaya çalışılmış ve önemli bir kayıp olmadığı sonucuna varılmıştır. SDS-PAGE sonrası jelin, Coomassie blue yöntemiyle boyanması sonucunda 8 kDa, 21 kDa, 52 kDa, 62 kDa ağırlığında antijen bantlarının varlığı saptanmıştır (Resim 1).

SDS-PAGE işleminden sonra, boyama yapılmadan, immunoblotting gerçekleştirilmiş, Western blotting sonrası ECL yöntemiyle görüntülenen bantlar arasında 8 kDa, 21 kDa, 52 kDa, 62 kDa ağırlığındaki bantlar KE'a spesifik olarak saptanmıştır (Resim 1).

Antijen preparasyonu ile 0.8 μ ve 0.3 μ çaplı lateks partikülleri kaplanmış, 0.3 μ çaplı lateks partiküllerinin istenen duyarlılıkta bulunmaması sonucu 0.8 μ çaplı lateks partikülleri tercih edilmiştir. Lateks partikül suspansiyonu ve antijen suspansiyonu, partikül/protein oranı 1g/0.06g olacak şekilde karıştırılmıştır. Siyah zemin üstünde 50 μ l hasta serumu ile 35 μ l kaplanmış lateks suspansiyonu karıştırıldıktan sonra 10 dakika makroskobik aglütinasyon için beklenmiş ve gözle görülebilir aglütinasyonun varlığında sonuç pozitif olarak yorumlanmıştır.

KE olduğu operasyon ile kanıtlanmış 84 vaka serumu 1:5 sulandırıldığında, 78 tanesi LAT ile pozitif bulunmuş, bunlar arasında 8 tanesi doğrudan çalışıldığında negatif çıkarken, 1:5 sulandırımında pozitif sonuç vermiştir. Hazırladığımız antijen ile 47 sağlıklı kontrol serumunun, doğrudan çalışılan 15 tanesinde yalancı pozitiflik saptanmış, fakat 1:5 sulandırımında, bunların 9 tanesi negatif çıkarken sadece 6 tanesi pozitif bulunmuştur, ancak hepsinin de pozitifleşmesi geç ve zayıf olmuştur. Diğer paraziter hastalığı olanlardan (*E. histolytica*, 3; *G. lamblia*, 2; *T. saginata*, 5; *T. gondii*, 5; *T. canis*, 3; *A. lumbricoides*, 2), *T. saginata* enfeksiyonu ve *T. gondii* enfeksiyonu olan iki hasta hazırladığımız antijen ile pozitif sonuç vermiştir (Tablo 1).

Ticari lateks aglütinasyon kitiyle uygulama, üreticinin talimatlarına göre yapılmış, 5 dakika sonunda gözle görülebilen aglütinasyonun olması pozitif olarak yorumlanmıştır. KE'u olan 84 hastanın doğrudan çalışılan ve 1:5 sulandırılan serumlarından 79 tanesi pozitif, 5 tanesi negatif olarak bulunmuştur. Bunlar, bizim kitimizle de negatif sonuç vermiştir. Ayrıca pozitif olarak bulunan serumlardan biri de saflaştırdığımız antijen ile negatif sonuç vermiştir. Sağlıklı kontrol serumlarının ticari kitle doğrudan çalışıldığında biri dışında hepsinin ve diğer paraziter hastalığı olan hastalardan alınan serumların tamamının negatif oldukları gözlenirken bu yanlış pozitif sonuç da 1:5 sulandırımında ortadan kalkmıştır (Tablo 1). Ticari kit ve bizim saflaştırdığımız antijen ile yapılan LAT arasında, serumlar 1:5 sulandırılarak çalışıldığında, yüksek düzeyde bir uyum saptanmıştır ($\kappa=0.89$ ve $p<0.001$). Hazırladığımız antijen ile kapladığımız LAT'nin , serumlar doğrudan ve 1:5 sulandırılarak çalışıldığında hesaplanan duyarlılık ve özgüllükleri Ki kare testi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0.05$).

Tablo-1 Hasta, sağlıklı kontrol ve diğer paraziter hastalığı olanlardan alınan serum örneklerinin, doğrudan ve 1:5 sulandırımında, ticari LAT ve hazırlanan antijenle yapılan LAT sonuçları.

		Hasta serumları n:84	Kontrol serumları n:47	Diğer paraziter hastalıklara ait serumlar n:20
Ticari LAT (doğrudan)	Pozitif	79	1	0
	Negatif	5	46	20
Ticari LAT (1:5 sulandırım)	Pozitif	79	0	0
	Negatif	5	47	20
Hazırlanan antijen ile uygulanan LAT(doğrudan)	Pozitif	70	15	2
	Negatif	14	32	18
Hazırlanan antijen ile uygulanan LAT (1:5 sulandırım)	Pozitif	78	6	2
	Negatif	6	41	18

5. TARTIŞMA

KE'un serolojik tanısı ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (2, 16, 36, 41, 78), bununla beraber standart antiserum ve antijenin elde edilememesi, yöntemlerdeki farklılıklar ve bazı durumlarda cerrahi olarak KE tanısı doğrulanmış vaka serumlarının çalışılmaması, değişik laboratuvarlara ait sonuçların karşılaştırılmasını imkansız kılmıştır (2, 74). Duyarlı ve özgül bir serolojik test, hem KE'da erken tanı ve tedaviyi sağlamakta hem de KE olmayan bazı vakalarda gereksiz cerrahi müdahaleyi önlemektedir. Son 10 yılda yapılan çalışmalarla, hidatidoza özgül antikorların araştırılmasında, duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça gelişmiş metodlar bulunmuştur (2, 48).

KE tanısında kullanılan antijenin cinsinin, hazırlanma şeklinin, testlerdeki değişik pozitiflik kriterlerinin, kistin canlılığı ve lokalizasyonunun ve parazitin süşunun serolojik testlerin özgüllüğünü ve duyarlılığını değiştirdiği bilinmektedir (64).

KE'un, özgül olmayan antijenlerin kullanıldığı testlerde saptandığı halde USG ile tespit edilememesi, çapraz reaksiyonlar ile olduğu kadar kistlerin bu görüntüleme yöntemi ile saptanamayacak kadar küçük veya yerleşim yeri itibarıyla bu yönlü tanıya olanak vermeyecek bir konumda olması ile de açıklanabilir. Açıklaması ne olursa olsun, USG ile serolojinin beraber kullanılması ve serolojik testlerin de daha özgül antijenlerle yapılması tanıyı doğrulayıcı uygulamalardır (20, 77).

Ürdün'de KE'a kadınlarda erkeklerden daha fazla rastlanmış ve parazit biyolojisi ve parazite karşı bağışık yanıtta cinsiyetin etkisi üzerinde durulmuştur (1). Bizim çalışmamızda da kadınlarda % 61.7, erkeklerde % 38.3 oranında KE tanısı serolojik olarak doğrulanmıştır.

Yapılan serolojik testlerde farklı antijenlerin aktif olabileceği öne sürülmüştür. Maksimum duyarlılık elde etmek için çok özgül antijenlerin belli testlerde denenmesi gerekmektedir (41, 54). Çalışmamızda, duyarlılıktan ödün vermemek için tanıda değeri olan tüm lipoprotein antijenlerinin saflaştırılması

tercih edilmiştir. Koyun, sığır ve domuz kist sıvıları antijen kaynağı olarak Western blotting yönteminde kullanılmış ve tanısal olarak önemli olan bantlar hepsinde de bulunmuştur (78). Aynı çalışmada, sığırdan sağlanarak liyofilize edilen kist sıvısında zemin daha az boyanmış ve buna bağlı olarak daha net bantlar ortaya çıkmıştır. Bizim kullandığımız sığır kist sıvısı ile de Western blotting yönteminde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada insan kist sıvısının LAT için daha uygun olduğu bildirilmişse de daha sonraki çalışmalarda sığır kist sıvısı ile de çok iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir (26). Ancak sığır kist sıvısından elde edilen antijenlerin "prozone fenomeni"ne daha çok yol açtıkları ve diğer kist sıvılarından daha az reaktif oldukları konusunda çalışmalar bulunmaktadır (31). Çalışmamızda lipoprotein antijen suspansiyonuyla hazırladığımız kitin duyarlılığı, serumlar sulandırılmadan ve 1:5 dilüsyonda çalışıldığında sırasıyla, % 83 ve % 93 bulunmuştur. Alınan sonuçlar, sığır kist sıvısı antijenlerinin düşük reaktiviteye sahip olduğu görüşünü desteklememektedir. "Prozone fenomeni"ne 8 (%9.5) hastada rastlanmıştır ve bu bulgu ilk görüşü destekler niteliktedir. KE'da duyarlılığın yüksek olmasının nedeni, genellikle antijenlerin kuvvetli cevap oluşturması ile açıklanabilir (40).

Toplama sırasında kist sıvısı içindeki proteolitik enzimlerin, sıvı proteinlerinde degradasyona yol açması, tanıda kullanılan hidatik kist sıvısı antijenlerinde görülen değişkenlikten, kısmen de olsa sorumludur. Kist sıvısı EDTA ile saklanırsa metalloproteazların katıldığı yıkım önlenebilmektedir (49). Bu nedenle çalışmamızda, aspirasyondan sonra kist sıvısı içine EDTA ve sodyum azide ilave edilmiştir.

Williams ve ark. çok adımlı bir işlemde sonra elde ettikleri lipoprotein fraksiyonunu, İHAT ve immunoelektroforez testleriyle değerlendirmiş ve duyarlılığı çok düşük bulmuşlar, bunu da saflaştırma sırasında meydana gelen antijen kaybına bağlamışlardır (79). Fakat yaptığımız çalışmada, afinite kromatografisi ile antijen kaybı çok aza indirgenmiş ve daha önce bu antijenlerle çalışmış olan Barbieri ve ark.'nın bulduğu duyarlılık (% 87) ve özgüllükle (% 88) uyumlu bir sonuca varılmıştır (10).

Değişik saflaştırma protokollerinin, antijenlerin özgül IgG antikorlarını tanıma yeteneğini değiştirebileceği ve tanısal değerlerini belirleyebileceği rapor edilmiştir (69). Bu nedenle elde ettiğimiz lipoprotein fraksiyonuna, saflaştırma yönteminden sonra antijenlerin karakterizasyonu ve tanı değerlerinin saptanabilmesi amacı ile, SDS-PAGE ve immunoblotting yapılmış ve lateks aglütinasyon yöntemiyle reaktifliği test edilmiştir.

Saflaştırma sırasında hidatik kist sıvısının konağa ait olan ve non-spesifik reaksiyonları uyaran bileşenleri de elimine edilmiş, sığır serum albumini bizim saflaştırdığımız fraksiyonda gözlenmemiştir. Barbieri ve ark. bizim yöntemimize benzer bir uygulama ile kist sıvılarını saflaştırmış, saflaştırılmadan önce ve sonra alınan sıvı örnekleri ile yaptıkları immunoblotting sonucunda reaktif antijenlerin aynı olduğunu göstermişlerdir (10).

Antijen B'nin alt üniteleri olan 8, 16 ve 21 kDa bantlar, tanısal testlerde değerli bulunmuştur (33, 48, 68, 78). Bir çalışmada bulunan 12 kDa antijenin muhtemelen 8 kDa antijene denk geldiği gözlenerek bu durum, yüksek molekül ağırlık standartları kullanılmasına bağlanmıştır (68). Bizim çalışmamızda geniş aralıklı molekül ağırlık standardı kullanıldığından bu molekül 8 kDa olarak saptanmıştır. Antijen 5'in 52 ve 62 kDa antijenleri de tanıda değerli bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, SDS-PAGE ve immunoblotting sonrası, antijen 5 ve antijen B'ye ait olduğu bildirilen bantlardan 8, 21, 52 ve 62 kDa bantlar gözlenmiştir. 30 ve 67 kDa arasında çapraz reaktif antijenlerin bulunduğu saptanmıştır (21, 32, 49, 82). Çalışmamızda sağlıklı kontrollerde ve diğer paraziter hastalığa sahip olanlarda görülen çapraz reaksiyonlar bu antijenlere bağlı olabilir.

Kist sıvısındaki antijen mozaïği, serolojik testlerin standardizasyonu ve yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Özellikle yüksek parazitizm gösteren toplumlarda yanlış pozitiflik oranı artmaktadır (60). Amaç, tanı metodlarında duyarlılığı da dikkate alarak yüksek özgüllükte sonuçlar verebilecek antijen veya antijen kokteyllerini elde etmektir.

LAT, iyi bir seroepidemioloji testi olarak görünmektedir; çünkü kolay uygulanabilir, duyarlı, özgül ve diğer tekniklerle korelasyonu iyi olan bir testtir (74, 76, 77). İHAT'den daha özgül olduğunu belirten yayınlar yanında (74) daha az özgül olduğunu vurgulayan yayınlar da vardır (16, 26, 64). Bu açıdan IgG'nin kullanıldığı KE immun tanısında özgüllüğü arttırmak için antijen saflaştırma yöntemlerinin etkisi büyüktür (68, 69). Tüm vakalarda daha özgül sonuç elde etmek için ELISA'da titrelerin kullanılması, ELISA daha duyarlı gibi bildirilmekteyse de LAT duyarlılığını ona yaklaştırmaktadır (18, 63).

Uruguay'da yapılan bir çalışmada USG ile karşılaştırılınca ELISA ve LAT'nin duyarlılığı düşük (% 28-48) ama özgüllüğü iyi (% 85) bulunmuştur. Duyarlılığın bu kadar düşük olmasında saflaştırılmamış antijenlerin kullanılmasının etkisi olduğu belirtilmiştir (14).

Cerrahi olarak tanısı doğrulanmış hastalarda yapılan LAT, % 92 özgül ve % 70 duyarlı bulunmuştur (39, 71). Yapılan çalışmalarda, LAT duyarlılığı ortalama olarak % 75'in üstündedir (40). Syfres ve Kagan (1963), LAT'ini İHAT ve bentonit flokülasyon testi kadar duyarlı olduğunu belirtmektedirler. LAT'inde taze serumun, inaktive edilmiş seruma oranla çok daha reaktif olduğu bildirilmiştir (31). İnaktivasyonun yanlış pozitifliği giderdiği yolunda yayınlar olmasına rağmen (26), inaktive serumla taze serum arasında bir fark olmadığı da rapor edilmiştir (76). Çalışmamızda yanlış pozitifliklerin 1:5 sulandırımında ortadan kalktığı gözlenmiş ve bu nedenle serumlar inaktive edilmemiştir.

Barbieri ve ark., çalışmaları sonucunda saflaştırılmamış antijen ile yapılan ELISA ile, bizim antijenimize benzer heparin bağlayan lipoprotein fraksiyonu ile, lateks aglütinasyonu sonuçlarını, sırasıyla duyarlılık % 94-% 91 ve özgüllük % 86-% 92 olmak üzere, benzer bulmuşlardır. Adı geçen araştırmacılar, LAT'nin pratik ve standart yanılgıların en aza indirilebildiği bir yöntem olduğu için, özellikle E. multilocularis ve T. solium enfeksiyonlarının fazla görülmediği bölgelerde tercih edilebilir olduğunu vurgulamışlardır (10). Yurdumuzda da bu durum geçerli olduğundan bizim sonuçlarımız desteklenmektedir

Elde ettiğimiz antijen suspansiyonuyla kapladığımız lateks partikülleri sulandırılmamış serum ile %68'lik bir özgüllük gösterdiği halde bu oran, 1:5 dilüsyonda % 87'ye yükselmiştir. Daha az özgüllükte antijenler kullanılırsa ELISA, LAT, IHAT gibi duyarlılığı yüksek olan testlerin yanında daha özgül olan immunoblotting gibi doğrulayıcı testler kullanılması gerekebilecektir (42).

Lateks partikül çapının değişmesinin testin etkinliğini değiştirdiğine daha önce de değinilmiştir (64). Yapılan çalışmalarda 0.1-0.5 μ çaplı lateks partiküllerinin daha duyarlı sonuçlara yol açtığı bulunmuştur (10, 16, 41, 64, 75). Çalışmamızda 0.8 μ çaplı lateks partikülleri kullanıldığında 0.3 μ çaplıya göre daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir. Büyük çaplıların daha kolay muamele edilmesinin rolü olabileceği düşünülmüştür.

Kullandığımız ticari kitin duyarlılığı ve özgüllüğü, serumlar sulandırılmadan sırasıyla %94 ve %97; 1:5 dilüsyonda ise %94 ve %100 olarak bulunmuştur. Materiales y Reactivos adlı ticari LAT ile yapılan bir çalışmada, radyolojik görüntüleme ile ve çoğunun da cerrahi olarak pozitif bulunduğu 50 hastada LAT ile özgüllük %100 ve duyarlılık % 67 bulunmuştur. Kontrol olarak kullanılan serumların paraziter hastalık yönünden negatif olanlarının seçilmesi muhtemelen özgüllük oranını yükseltmektedir. Testin pozitifliğinin larvanın durumuna ve membran bütünlüğüne bağlı olduğu, bu nedenle yanlış negatif sonuçların kalsifiye kistlerde daha çok olduğu ve en çok pozitif sonucu rüptüre veya enfekte kistlerin verdiği bildirilmiştir (36, 78). Bizim çalışmamızdaki kistlerin % 26'sı tip I, % 11'i tip II, % 40'ı tip III ve % 22'si tip IV olarak sınıflandırılmış hastalardan oluşmaktaydı.

Yine Materiales y Reactivos, S.A ticari kiti kullanılarak yapılan bir çalışmada LAT, 1:5 dilüsyon ve üstü pozitif olarak kabul edilmiş, duyarlılığı % 83 ve özgüllüğü % 96 olarak bulunmuştur. Çapraz reaksiyonun görülebileceği durumlar, başta distomatoz, şistozomiyaz, sistiserkoz, filaryoz, taeniosis saginata, askariyoz, trişinoz gibi paraziter hastalıklar ayrıca malignensiler olarak bildirilmiştir (3, 12, 19, 32, 40, 51, 66). *E. granulosus* serolojisinde diğer paraziter hastalıklar ve malignensilere ek olarak, karaciğer hastalıkları

ve şiddetli eozinofilili vakalarda çapraz reaksiyonların olduğunu bildiren pekçok çalışma mevcuttur (3, 32, 61, 66, 68).

Türkiye'de çapraz reaksiyon açısından önemli olan alveolar ekinokokoz da nadiren görülmektedir. 1962-1995 yılları arasında gözlenen 207 vakadan çoğu Batı Anadolu Bölgesi'nde görülmekte iken KE Türkiye'nin her tarafında yaygın olarak gözlenen bir enfeksiyondur (8). Çalışma için materyal topladığımız dönem içinde alveolar ekinokokoza rastlanmadığı için bu hastalarla KE hastalarını çapraz reaksiyon açısından değerlendirme olanağı bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda diğer parazitlerle enfekte hastalardan *T. Saginata* ve *T. Gondii* ile enfekte 2 (%10) hastada çapraz reaksiyon gözlenmiştir.

Testlerde yüksek özgüllük sağlamak ve yanlış pozitiflikleri engellemek için fraksiyone edilmiş ve sulandırılmış antijenlerle çalışılması gerekmektedir. Yüksek duyarlılıktaki antijenler ve inaktive edilmemiş serum kullanıldığında 1:5 dilüsyonda hem yanlış pozitiflikler engellenecek, hem de "prozona fenomeni"ne bağlı yanlış negatiflikler önlenecektir (31, 76). Bu nedenle çalışmalarda genellikle LAT için pozitiflik sınırı 1:5 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda, 8 hastada "prozona fenomeni" izlenmiştir. Bu serumlar, ticari kitle pozitif sonuç verirken kendi hazırladığımız lateks kiti ile negatif sonuç vermiş, ancak, 1:5 titrede sonuçların kuvvetle pozitifleştiğini gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, test edilen 53 serum içinde LAT, % 82 duyarlı bulunmuştur. "Prozona fenomeni" olan bir tanesinde, bizim çalışmamıza benzer şekilde sulandırılmadan negatifken 1:5 sulandırımında kuvvetli pozitif sonuç alınmıştır (80).

Çalışmamızda, KE olduğu operasyon ile doğrulanmış 84 vakanın ticari kit ve bizim kitimizle sırasıyla 5 ve 6'sında negatif sonuç elde edilmiştir. Yanlış negatiflik için dolaşımdaki immun komplekslerin etkili olabileceği (16, 21), ayrıca kistin kendisinin de bazı özgül IgG'leri alıp kist içi kompleks oluşturabileceği (21) savları, Richard-Lenoble ve ark. tarafından araştırılmış ve 13 hastadan sadece 2'sinde immun komplekslerin olduğu ve onların da

serolojik olarak negatif sonuç vermediği anlaşılmıştır (62). Bu farklılığın, çalışmaların endemik ve endemik olmayan bölgelerde yapılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Eğer bir bölgede düşük beslenme düzeyleri ve yüksek viral, bakteriyel ve protozoon koenfeksiyon prevalansı olursa, suboptimal bağışık yanıtlar oluşabilmektedir (21). Ayrıca antijen salınımı ve sonuçta immun komplekslerin oluşumu, antikor düzeyini bağışıklık baskılayıcı özgül mekanizmalarla direkt veya indirekt olarak düşürebilmektedir. Yapılan bir çalışmada 10 cm'den büyük çaplı akciğer kistlerinde 6-10 cm çaplı olanlardan daha az antikor düzeyi bulunmuştur (71). Tüm bunlar duyarlılığı azaltıcı etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır. KE olduğu cerrahi ile doğrulanmış hastaların seronegatif olmasının başka nedenleri de olabilmektedir: a)Çok iyi korunan bir kistten antijen sızımı, saptanabilir antikor oluşumunu uyarmada yetersiz kalabilmesi,

b) Kist yerleşim yerindeki küçük antijen sızıntıları, lokal olarak oluşturulan antikorlarla nötralize edilebilmesi

c) Lokal bir immunolojik defekt, özgül antikor oluşumunu engelleyebilmesi bunlar arasında yer almaktadır. Ayrıca çocuklarda da titreler düşük olabilmekte ve yerleşimden bağımsız olarak intakt hiyalin kist varlığında da duyarlılık azalmaktadır (64).

6. SONUÇLAR

Lipoprotein antijen fraksiyonunun elde edilmesi için heparin üzerinden afinite kromatografisi uygulanması kolay ve tek basamaklı bir saflaştırma yöntemi olarak değerlendirilmiştir.

Bu saflaştırma yöntemi sırasında, tanısal açıdan önemli antijenlerde kayıp olmadığı SDS-PAGE ve immunoblotting yöntemleri kullanılarak gösterilmiştir.

Elde edilen lipoprotein antijen fraksiyonu, tanıda ticari lateks aglütinasyon kitiyle 1:5 titrede yüksek düzeyde uyumlu ve kullanılabilecek özgüllük (% 93) ve duyarlılıkta (% 87) bulunmuştur.

Pozitiflik kriterinin 1:5 olması gerektiği kabul edilmiş. Çünkü kapp (κ) istatistiğine göre sulandırmadan ve 1:5 dilüsyonda yapılan testlerin sonuçları arasında orta derecede uyum olmasına rağmen özgüllük ve duyarlılıklarında belirgin bir farklılık oluşmuştur. Sulandırmadan yapılan testte duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 88 ve % 68 çıkarken, 1:5 dilüsyonda % 93 ve % 87 olarak bulunmuştur.

Kaplanan lateks suspansiyonunun en iyi reaksiyonu, 1 g/0.06 g lateks partikülü ve antijen protein miktarı olduğunda verdiği gösterilmiş, ayrıca en fazla duyarlılığa 0.8 µ çapında lateks partikülü kullanıldığında ulaşılmıştır.

Lateks aglütinasyon testi uygulanırken, 10 dakika beklenmesi gerektiği sonucuna varılmış, çünkü pozitif serumlarda sonucun 10. dakikada ortaya çıkabileceği görülmüştür.

Sonuç olarak saflaştırdığımız LAT'nin 1:5 sulandırımında, ticari kit ile uyumlu duyarlılık (% 93) ve özgüllükte (% 87), kolay uygulanabilir ve çabuk sonuç veren bir test olması nedeni ile rutin tanıda kullanılabileceği düşünülmüştür.

7. ÖZET

Echinococcus granulosus'un metasestod formunun yol açtığı kistik ekinokokoz (KE), ülkemizde hem halk sağlığı hem de sosyoekonomik açıdan önemli bir zoonozdur. Yapılan çalışmalar, KE tanısında görüntüleme yöntemlerinin, serolojik yöntemlerle doğrulanması gerekliliğini ortaya koymuştur, bununla birlikte serolojik testlerin duyarlılığı ve özgüllüğünde büyük oranda antijen standardizasyon eksikliğine bağlı olarak farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kolay standardize edilebilir, duyarlı ve özgül bir serolojik yöntem, KE'un doğru tanısı için gereklidir.

Tanısal açıdan önemli antijenleri elde etmek ve bu kozmopolitan zoonozun tanısını koyabilmek için bugüne kadar kist sıvısı ve çeşitli kist elemanları (protoskoleksler, kist duvar yapıları gibi) kullanılmıştır. Bu antijen kaynaklarından en zengini ve değerlisi kist sıvısı olarak bildirilmiştir. Kist sıvısının içeriği çok karmaşıktır ve hem konak hem de parazit kaynaklı pek çok antijeni içerir. Tanıda daha özgül testlerin oluşturulması açısından bu antijenlerin saflaştırılması ve özgül antijenlerin elde edilmesi önemlidir. Ancak bu özgülleşme sağlanırken, duyarlılık feda edilmemelidir. Bu amaçla literatürde pek çok yöntem bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda uyguladığımız yöntem, tek basamaklı, pratik bir yöntem olup afinite kromatografisini kapsamaktadır. Lipoprotein yapısında olduğu bilinen, tanısal önemi olan kist sıvısı antijenlerinin heparine bağlanmasını esas alan bu yöntem, hızlı bir şekilde antijen saflaştırılmasını sağlamıştır. Daha sonra, bu antijenik suspansiyonun karakterizasyonu amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve immunoblotting uygulanmıştır. SDS-PAGE ile protein bantları ortaya konmuş, immunoblotting ile de bu bantların KE'lu hasta serumuyla karşılaştırılması sonucu reaktifliği saptanmıştır. Sonuçta tanısal önemi olan antijenlerde duyarlılığı etkileyecek bir kayıp olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen antijenik preparasyon, KE olduğu operasyonla kanıtlanmış 84 hasta serumu, 47 sağlıklı kontrol serumu ve diğer paraziter hastalıkları olan

20 hasta serumu kullanılarak serolojik yönden lateks aglütinasyon testiyle denenmiş ve ticari lateks aglütinasyon testinin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bizim antijenimizle hazırladığımız lateks aglütinasyon testinin duyarlılığı ve özgüllüğü 1:5 sulandırmada sırasıyla % 87 ve % 93 bulunmuş ve ticari kitle uyumlu çıkmıştır.

Sonuç olarak elde edilen antijenik suspansiyon ile hazırlanacak serolojik testler, ülkemizde endemik olan KE tanısı için pratik ve güvenilir bulunmuştur.



8. SUMMARY

Purification of Specific Antigens from Hydatid Cyst Fluid and Comparison with a Commercial Antigen by Using Latex Agglutination Method

Cystic Echinococcosis (CE) caused by the metacestode stage of *Echinococcus granulosus* is one of the most important socioeconomic and public health problems in Turkey. Several studies show that radiological imaging methods should be confirmed by immunodiagnostic tests for the diagnosis of CE. However, there are differences between the sensitivity and specificity of the serologic tests, probably due to the lack of standardization of antigenic preparations. Thus, a specific and sensitive test that could be easily standardized is needed for the diagnosis of this disease.

Hydatid cyst fluid and various cyst elements (protoscoleces, cyst wall elements) have been employed in order to obtain diagnostically important antigens for the immunodiagnosis of this cosmopolitan zoonosis. Cyst fluid is reported to be the most valuable antigen source among these elements. Cyst fluid has a complex structure and involves several parasitic antigens as well as host proteins. Purification of these antigens to obtain the specific parasitic antigens is important to apply a more specific test in serodiagnosis. However, sensitivity should not be sacrificed meanwhile. Several methods are reported for this purpose and among these, our method is a one step affinity chromatography relying on the relationship between the lipoprotein antigens and heparin. This is an easy method to purify lipoprotein antigens. This antigenic preparation was then characterized by using Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting. Antigen bands were seen with SDS-PAGE and the reactivity of these antigens were tested with immunoblotting using the serum of a CE patient. As a result it was understood that there was no antigenic loss that can affect the sensitivity.

This antigenic preparation was tested serologically by using latex agglutination test with sera of 84 CE patient confirmed surgically, 47 healthy control and 20 patient infected with parasitic infections other than CE; and the results of this test were compared with the results of the commercial kit. Our results were % 87 sensitive and % 93 specific when the sera were 1:5 diluted, and these values were similar to the results of the commercial kit.

As a result, serologic tests prepared with the specific antigens we purified, are thought to be practical and reliable tests to diagnose CE which is endemic in our country.



9. KAYNAKLAR

1. Abo-Shehada MN. (1993). Some observations on hydatidosis in Jordan. J. Helminthol. 67:248-252.
2. Allerberger F, Roberts G, Dierich MP, Wilson M, Schantz PM, Auer H, Aspöck H. (1991). Serodiagnosis of echinococcosis:evaluation of two reference laboratories. Trop. Med. Parasitol. 42:109-111.
3. Altıntaş N, Özbel Y. (1991). Bazı parazitler hastalıklarının tanısında görülebilecek çapraz reaksiyonlar. T. Parazitol. Derg. 15:111-118.
4. Altıntaş N, Özcel MA. (1991). IgG and IgM levels in cyst hydatid patients before and after operation using immuno-flourescence technique. T. Parazitol. Derg. 15:31-40.
5. Altıntaş N, Yazar S. (1997). Western Blot (Immunoblotting). Parazit Hastalıklarında Tanı. Ed: Özcel MA, Altıntaş N. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:15. Ege Üniversitesi Basım evi, İzmir. s:343-372.
6. Altıntaş N, Yolasiğmaz A. (1997). Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE. Parazit Hastalıklarında Tanı. Ed: Özcel MA, Altıntaş N. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:15. Ege Üniversitesi Basım evi, İzmir. s:321-341.
7. Altıntaş N. (1991). SDS-polyacrylamide gel elektroforezi ile proteinlerin separasyonu. T. Parazitol. Derg. XV:119-129.
8. Altıntaş N. (1998). Cystic and alveolar echinococcosis in Turkey. Ann. Trop. Med. Parasitol. 6:637-642.
9. Al-Yaman FM, Knobloch J. (1989). Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. Mol and Biochem Parasitol. 37:101-107.
10. Barbieri M, Sterla S, Battistoni J, Nieto A. (1993). High performance latex reagent for hydatid serology using *Echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. Int. J. Parasitol. 23:565-572.

11. Becker K, Frieling T, Saleh A, Haussinger D. (1997). Resolution of hydatid liver cyst by spontaneous rupture into the biliary tract. *J. Hepatol.* 26:1408-1412.
12. Ben-Ismaïl R, Carme B, Niel G, Gentilini M. (1980). Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens role of anti-P1 antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19:239-245.
13. Brown HW, Neva FA. (1993). Extraintestinal larval tapeworms of human beings. In: *Basic Clinical Parasitology*. Fifth edition. Prentice-Hall International Inc. Singapore. pp: 191-203.
14. Carmona C, Perdomo R, Carbo A, Alvarez C, Monti J, Grauert R, Stern D, Perera G, Llyoyd S, Bazini R, Gemmell MA, Yarzabal L. (1998). Risk factors associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: result of a mass screening study using ultrasound and serology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:599-605.
15. Carol H, Hernandez A, Baz A, Nieto A. (1989). Lack of interspecies barriers in anti-Id stimulated antibody production against *Echinococcus granulosus* antigens. *Parasite Immunol.* 11:183-195.
16. Chemtal AK, Bowry TR, Ahmad Z. (1981). Evaluation of five immunodiagnostic techniques in echinococcosis patients. *Bull. WHO.* 59:767-772.
17. Coico R. (1994). Isolation and analysis of proteins: III. Electrophoretic separation of proteins. In: *Current Protocols in Immunology*. Eds: Coligan IE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, Shevach EM. John Wiley & Sons Inc.. pp: 8.4.1-8.4.21.
18. Coltorti EA. (1986). Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:1000-1005.
19. Craig PS, Bailey W, Nelson GS. (1986). A specific test for the identification of cyst fluid samples from suspected human hydatid infections. *Transac. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:256-257.
20. Craig PS, Rogan MT, Allan JC. (1996). Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv. Parasitol.* 38:169-250.

21. Craig PS, Zeyhle E, Romig T. (1986). Hydatid disease: research and control in Turkana. II. The role of immunological techniques for the diagnosis of hydatid disease. *Transac. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:183-192.
22. Craig PS. (1986). Detection of specific circulating antigen immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite Immunol.* 8:171-188.
23. D'Amelio R, Pontesilli O, Dayal R, Rosa FD, Barnet M, Teggi A, Brighthouse G, Lambert PH. (1985). Characterization of parasite antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF. *Allergol and Immunol.* 31:285-292.
24. Dessaint JP, Bout D, Wattre P, Capron A. (1975). Quantitative determination of specific Ig E antibodies to *Echinococcus granulosus* and Ig E levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology.* 29:813-823.
25. Di Matteo G, Bove A, Chiarini S, Capuano LG, De Antoni E, Lanzi G, Lippolis G, Campana FP. (1996). Hepatic Echinococcus disease: our experience over 22 years. *Hepato-Gastroenterol.* 43:1562-1565.
26. Dighero MW, Bradstreet MP. (1979). The serodiagnosis of human hydatid disease: 1. The routine use of latex-agglutination and complement-fixation in diagnosis. *J. Helminthol.* 53:283-286.
27. Eckert J, Thompson RCA. (1988). Echinococcus strains in Europe: a review. *Trop. Med. Parasit.* 39:1-8.
28. Eckert J, Thompson RCA. (1997). Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta. Tropica.* 64:19-34.
29. ECL Western Blotting Protocols. (1995). Amersham Life Science. Buckinghamshire England. pp: 9-18.
30. Felice GD, Pini C, Afferni C, Vicari G. (1986). Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:133-142.

31. Fischman A. (1965). Reactivity of latex and complement fixation tests in hydatid disease. *J. Parasitol.* 4:497-499.
32. Force L, Torres JM, Carrillo A, Busca J. (1992). Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. *Clin. Infect. Dis.* 15:473-480.
33. Gonzales G, Nieto A, Fernandez C, Örn A, Wernstedt C, Hellman U. (1996). Two different 8kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.* 18:587-596.
34. Gottstein B, Eckert J, Michael SA, Thompson RCA. (1987). *Echinococcus granulosus* antigens: immunoelectrophoretic and western blot analysis of hydatid cyst fluids. *Parasitol Res.* 73:186-189.
35. Hames BD. (1990). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Eds: Hames BD, Rickwood D. Second edition. IRL press. Oxford, England. pp: 1-147.
36. Hernandez AP, Sastre AS, Rubio CM, Paz M, Riba AB. (1988). A comparative study of the EAST, indirect haemagglutination, basophil degranulation and latex tests in the diagnosis of human hydatid disease. *Allergol. Et. Immunopathol.* 16:109-112.
37. Holcman B, Heath DD. (1997). The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta. Tropica.* 64:5-17.
38. Ioppolo S, Notargiacomo S, Profumo E, Franchi C, Ortona E, Rigano R, Siracusano A. (1996). Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.* 18:571-578.
39. Kagan IG, Osimani JJ, Varela JC, Allain DS. (1966). Evaluation of intradermal and serologic tests for the diagnosis of the hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15:172-179.
40. Kagan IG. (1968). A review of serological tests for the diagnosis of the hydatid disease. *Bull. WHO.* 39:25-37.

- 41.Kagan IG. (1976). Serodiagnosis of hydatid disease. In: Immunology of Parasitic Infections. Eds: Cohen S, Sadun E. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp:130-141.
- 42.Kammerer WS, Schantz PM. (1993). Echinococcal disease. Infect. Dis. Clin. North. Am. 7:605-618.
- 43.Kanwar JR, Kanwar R. (1994). Purification and Partial immunochemical characterization of a low molecular mass, diagnostic *Echinococcus granulosus* immunogen for sheep hydatidosis. FEMS Immunol and Med Microbiol. 9:101-108.
- 44.Kanwar JR, Vinayak VK. (1993). Isolation & immunochemical characterization of diagnostically relevant antigens of *Echinococcus granulosus*. Ind. J. Med. Res. 97:75-82.
- 45.Khuroo MS, Wani NA, Javid MSG, Khan BA, Yattoo GN, Shah AH, Jeelani SG. (1997) Percutaneous drainage compared with surgery for hepatic hydatid cysts. N. Engl. J. Med. 337:881-887.
- 46.Kuman HA, Altıntaş N, Ak M. (1987). İzmir ve civarında insanlarda kist hidatik hastalığına rastlanma sıklığı. T. Parazitol. Derg. 2:83-87.
- 47.Liu D, Rickard MD, Lightowlers MV. (1992). Comparative immunoelectrophoretic analysis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia pisiformis* cyst fluid antigens by hyperimmune rabbit sera. Res. Vet. Sci. 53:133-135.
- 48.Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VCW. (1989). A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:377-383.
- 49.Marco M, Nieto A. (1991). Metalloproteinases in the larvae of *Echinococcus granulosus*. Int. J. Parasitol. 21:743-746.
- 50.Markell EK, John DT, Voge M. (1992). The cestodes. In: Medical Parasitology. Seventh edition. WB Saunders Comp. Mexico. pp: 226-260.
- 51.Matossian RM. (1977). The immunological diagnosis of human hydatid disease. Transac. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2:101-104.

52. Morris DL, Taylor DH. (1988). Optimal timing of post-operative albendazole prophylaxis in *E. granulosus*. Ann. Trop. Med. Parasitology. 82: 65-66.
53. Munzer D. (1991). New perspectives in the diagnosis of Echinococcus disease. J. Clin. Gastroenterol. 13:415-423.
54. Oriol R, Williams JF, Esandi MVP, Oriol C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:569-574.
55. Ostrove S, Weiss S. (1990). Affinity chromatography: General Methods and Specialized Techniques. In: Methods In Enzymology: Guide to Protein Purification. Ed. Deutscher MP. Academic press, Inc. California, United States of America. 182: 357-380.
56. Parija SC, Ravinder PT, Subba Rao KSVK. (1997). Detection of hydatid antigen in urine by countercurrent immunoelectrophoresis. J. Clin. Microbiol. 35:1571-1574.
57. Parija SC, Sambasiva RAO R. (1986). Enhancement of sensitivity of the haemagglutination test for echinococcosis by use of *Staphylococcus aureus* protein A. J. Med. Microbiol. 22:241-244.
58. Paul M, Stefaniak J. (1997). Detection of specific *Echinococcus granulosus* antigen 5 in liver cyst biopsate from human patients. Acta Tropica. 64:65-77.
59. Perdomo R, Alvarez C, Monti J, Ferreira C, Chiesa A, Carbo A, Alvez R, Grauert R, Stern D, Carmona C, Yarzabal L. (1997). Principles of the surgical approach in human liver cystic echinococcosis. Acta. Tropica. 64:109-122.
60. Pinon JM, Sulahian A, Remy G, Dropsy G. (1979). Immunological study of hydatidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28:318-324.
61. Poretti D, Felleisen E, Grimm F, Pfister M, Teuscher F, Zuercher C, Reichen J, Gottstein B. (1999). Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:193-198.
62. Richard-Lenoble D, Smith MD, Loisy M. (1978). Human hydatidosis: evaluation of three serodiagnostic methods, the principal subclass of specific

- immunoglobulin and the detection of circulating immune complexes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72:553-559.
63. Rickard MD, Honey RD, Brumley JL, Mitchell GF. (1984). Serological diagnosis of post-operative surveillance of human hydatid disease. II. the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens. *Pathology.* 16:211-215.
64. Rickard MD. (1984). Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. I. Latex agglutination and immunoelectrophoresis using crude cyst fluid antigen. *Pathology.* 16:207-210.
65. Sanchez F, Garcia J, March F, Cardenosa N, Coll P, Munoz C, Auladell C, Prats G. (1993). Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in brood capsules and protoscolexes of *Echinococcus granulosus* of human origin. *Parasite Immunol.* 15:441-447.
66. Schantz P, Shanks D, Wilson M. (1980). Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:609-612.
67. Shariff M, Parija SC. (1993). Co-agglutination (Co-A) test for circulating antigen in hydatid disease. *J. Med. Microbiol.* 38:391-394.
68. Shepherd JC, Mc Manus DP. (1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:143-154.
69. Shibi Y, Janssen D, Osuna A. (1997). Specific recognition of hydatid cyst antigens by serum IgG, IgE, and Ig A using western blot. *J. Clin. Lab. Anal.* 11:154-157.
70. The Latex Course Book. (1999). Indiana Polis, USA.
71. Todorov T, Stojanov G. (1979). Circulating antibodies in human echinococcosis before and after surgical treatment. *Bull. WHO.* 57:751-758.
72. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. (1991). *Echinococcus granulosus* ve Parazitliği. Unat'ın Tıp Parazitolojisi, İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. Dördüncü baskı, İstanbul. s:440-453.

- 73.Üner A. (1991). Ekinokokların sistematığı ve biyolojisi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özel Kitabı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:10, Girne. s:13-28.
- 74.Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Prezioso U, Lopez-Lemes MH, Guisantes JA, Yarzabal LA. (1975). Evaluation of three immunodiagnostic tests for human hydatid disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 312-318.
- 75.Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Ricardes MI, Guisantes JA, Yarzabal LA. (1974). The immunoelectrophoretic characterization of sheep hydatid cyst fluid antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:1092-1095.
- 76.Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Ricardes MI, Prezioso U, 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. 25:617-622.
- 77.Varela-Diaz VM, Coltorti EA, De Zavaleta 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. 32:1079-1087.
- 78.Verastegui M, Moro P, Guevara A, Rodriguez T, Miranda E, Gilman RH. (1992). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. J. Clin. Microbiol. 30:1557-1561.
- 79.Williams JF, Esandi MVP, Oriol R. (1971). Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:575-579.
- 80.Williams JF. (1970). Latex agglutination tests for hydatid disease using Boerner slides. J. Parasitol. 5:1253-1255.
- 81.Yalın R, Aktan AÖ, Yeğen C, Döşl       HH. (1992) Significance of intracystic pressure in abdominal hydatid disease. Br. J. Surg. 79:1182-1183.
- 82.Yarzabal LA, Dupas H, Bout D, Naquira F, Capron A. (1977). *Echinococcus granulosus*: the distribution of hydatid fluid antigens in the tissues of the larval stage. Exp. Parasitol. 42:115-120.

- 83.Zhang L, McManus DP. (1996). Purification and N-terminal amino acid sequencing of *Echinococcus granulosus* antigen 5. Parasite Immunol. 18:597-606.

