



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KİSTİK EKİNOKOKKOZİSLİ HASTALARIN TANI
VE TAKİBİNDE YENİ MULTİEPİTOP
REKOMBİNANT PEPTİT ANTİJENİNİN KİST
SIVISI ANTİJENİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI,
İMMUN YANITIN KİSTİN EVRELERİ VE
PARAZİTİN GENOTİPİYLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Eylem Akdur ÖZTÜRK

Parazitoloji Anabilim Dalı

İZMİR
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KİSTİK EKİNOKOKKOZİSLİ HASTALARIN TANI
VE TAKİBİNDE YENİ MULTİEPİTOP
REKOMBİNANT PEPTİT ANTİJENİNİN KİST
SIVISI ANTİJENİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI,
İMMUN YANITIN KİSTİN EVRELERİ VE
PARAZİTİN GENOTİPİYLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Eylem Akdur ÖZTÜRK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül ÜNVER

Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Programı

İZMİR
2020

Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Adı Soyadı

: Prof. Dr. Ayşegül ÜNVER

Başkan(Danışman)

Üye / İmza

: Prof.Dr.Nazmiye ALTINTAŞ

Üye / İmza

: Prof.Dr. Mucide AK

Üye / İmza

: Prof. Dr. Hande DAĞCI

Üye / İmza

: Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR

Üye / İmza

: Prof. Dr. Nogay GİRGİNKARDEŞLER

Tezin Kabul Edildiği Tarih

: 22. 06. 2020

Önsöz

Kistik Ekinokokkozis (KE), her yaş grubundan insanı etkileyen ve tekrarlama ihtimali olan önemli bir halk sağlığı problemidir. Enfeksiyonun tanısında ve hasta takibinde hala standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır. KE tanısında görüntüleme ve serolojik yöntemlerin birlikte kullanımının standart bir yaklaşım olacağı belirtilmiştir. Serolojik testlerde güvenilir ve standardize edilebilir antijen arayışı devam etmektedir. Son yapılan çalışmalarda, tek bir molekül yerine birden fazla tanımlanmış immunodominant epitop içeren antijenlerin kullanılmasının serolojik testlerin tanı performansını artıracağı bildirilmiştir.

Buradan hareketle çalışmamızda üretilen multiepitop rekombinant peptit antijenin (recDipol) tanı performansı Kist Sıvısı (KS) antijeni ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın bu konuda çalışmayı planlayan araştırmacılarda yeni sorular ve farklı bakış açısı oluşturmalarını umuyoruz.

İzmir, 25.06.2020

Eylem Akdur ÖZTÜRK

Özet

Kistik Ekinokokkozisli Hastaların Tanı ve Takibinde Yeni Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin Kist Sıvısı Antijeni ile Karşılaştırılması, İmmun Yanıtın Kistin Evreleri ve Parazitin Genotipiyle İlişkilendirilmesi

Kistik Ekinokokkozis (KE) *Echinococcus granulosus*'un metasestod evresinin neden olduğu ihmal edilen zoonotik bir enfeksiyondur. KE her yaş grubundan insanı etkileyen önemli bir halk sağlığı problemidir ve Türkiye'nin de içinde bulunduğu pek çok ülkede endemik olarak görülmektedir. KE tanısında öncelikli olarak klinik bulgular ve görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Hastalığın erken dönem tanısında, klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda görüntüleme yöntemlerinin ve serolojik testlerin birlikte kullanılmasının standart bir yaklaşım olacağı bildirilmiştir. Serolojik testlerde temel antijenik kaynak olarak en çok kist sıvısı (KS) antijenleri kullanılmaktadır. KS antijenlerinin standardizasyonu oldukça zordur. Bu nedenle farklı laboratuvarlarda farklı sensitivite ve spesifite değeri vermektedir. KE'nin cerrahi ve medikal tedavisinden sonra %2-25 oranında nüks ihtimalinin bulunduğu bildirilmiştir. KS antijenlerine karşı oluşan antikorların dolaşımında uzun süre kalması hasta takibi açısından da dezavantaj oluşturmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda rekombinant antijenlerde umut verici sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Kist sıvısının son immunoproteom analizine göre, immunodominant epitoplarının bir kist evresinden (Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre) diğerine değiştiği ve birden fazla tanımlanmış immunodominant epitop içeren antijen kullanımına ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.

Bu amaçla çalışmamızda öncelikle AgB1, AgB2 ve Ag5'e ait immunodominant epitoplar belirlenmiş ve bu epitopları içeren gen bölgelerinin sıralı klonlaması ile multiepitop rekombinant peptit antijeni (recDipol) elde edilmiştir. RecDipol ve KS'nın tanı performansı, cerrahi veya Percutaneous- Aspiration- Injection- Respiration (PAIR) işlemi uygulanan 149 KE hastası ve 70 kontrol grubu (49 diğer paraziter enfeksiyonu bulunan hasta ve 21 sağlıklı birey) IgG-ELISA yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca 28 takip hastasının değişen sürelerde (6- 36 ay) Ultrasonografi ve serolojik yöntemlerle takibi yapılmıştır.

Genotipik çeşitlilik ve immun yanıt arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla genotip analizi yapılan 20 hastaya ait serum örnekleri KS ve recDipol antijenleri kullanılarak IgG-ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

KS ve recDipol'un sensitivitesi sırayla %82,55 ve %78,52 iken spesifitesi sırayla %91,43 ve %95,71 olarak değerlendirilmiştir. KS antijenin sensitivitesi DSÖ sınıflamasına göre aktif (CE1 ve CE2) ve geçiş (CE3A ve CE3B) evresinde recDipol'den yüksek iken aktif olmayan (CE4 ve CE5) kistlerde recDipol oldukça yüksek seropozitivite göstermiştir. RecDipol'un sensitivitesinin kist evreleriyle ilişkisi istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($P= 0.041$).

Takibi yapılan 28 hastanın 1 (%3,5)'i KS ile 6 (%21,4)'ü recDipol ile tüm takip boyunca seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca 5 (%17,85) hastada KS antijeni ile 6 (%21,42) hasta da recDipol ile takip sonunda seronegatifleşme görüldü. Nüks ihtimali bulunan bir hastanın Serolojik Indeks (SI) değerinde her iki antijenle de artma görülmüştür.

Genotip analizi yapılan 20 hastanın (16 G1, 1 G2, 2 G3 ve 1 G1/3) kanları IgG-ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. G1 genotipi dışındaki hastaların hepsi her iki antijene karşı seropozitif iken, G1 genotipindeki hastaların %87,5'i KS ile %75'i recDipol ile seropozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak; recDipol antijeni ile özellikle aktif olmayan (CE4 ve CE5) kistlerin tanısında ve spesifitesinde umut verici sonuçlar elde edilmiştir. RecDipol'un spesifik epitoplara içeren gen bölgelerinden oluşmasına rağmen KE hastalarının başlangıç kanlarında KS'ne oranla daha fazla negatif sonuçlar elde edilmesi, recDipol'un tanı ve hasta takibindeki performansının sınırlılığı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler; *Echinococcus granulosus*; kistik ekinokokkozis; multiepitop rekombinant antijen; serolojik tanı; hasta takibi; genotip

Abstract

Comparison of the New Multiepitop Recombinant Peptide Antigen with the Cystic Fluid Antigen in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Cystic Echinococcosis, Association of the Immune Response with the Cyst Stages and the Genotype of the Parasite

Cystic Echinococcosis (CE) is a neglected zoonotic infection caused by the metacestode stage of *Echinococcus granulosus*. CE is an important public health problem that is affecting people in all age groups and appears to be endemic in many countries including Turkey. Clinical findings and imaging methods are primarily used in the diagnosis, however, synchronous use of imaging methods and serological tests in early diagnosis of the disease, clinical and epidemiological research will be a standard approach. Hydatid fluid (HF) is used as the main antigenic resource for serological diagnosis. Standardization of HF antigens is considerably difficult. This causing different sensitivity and specificity results in different laboratories. The recurrence rate of CE is 2-25% after surgical and medical treatment. Besides, long-term persistence of antibodies in circulation against HF is another problem in follow-up.

Recently, promising results have been reported about recombinant antigens. According to immunoproteomic analysis, immunodominant epitopes change from one cyst stage (according to World Health Organization (WHO) classification) to another and antigens are required that including multiple defined immunodominant epitopes.

For this purpose, multiepitope recombinant peptide antigen (recDipol) was obtained by sequential cloning of immunodominant epitopes belong to AgB1, AgB2 and Ag5. Diagnosis performance of recDipol and HF was compared with 149 CE patients who had surgery or Percutaneous- Aspiration- Injection- Respiration (PAIR) procedure, and 70 control groups (49 patients with other parasitic infections and 21 healthy individuals) using the IgG-ELISA method. Besides, 28 patients were followed up with Ultrasonography and serological methods for varying periods (6-36 months). Sera samples of 20 patients with genotype analysis were analyzed in the term of relationship with genotypic diversity and immune response using IgG-ELISA method.

The sensitivity of HF and recDipol were evaluated as 82,55% and 78,52%, while specificity was 91,43% ve 95,71%, respectively. While the sensitivity of HF antigen is higher than recDipol in the active (CE1 and CE2) and transition (CE3A and CE3B) stage, recDipol showed very high seropositivity in the inactive (CE4 and CE5) cysts. The relationship with the sensitivity of recDipol and cyst stage was statistically meaningful ($P = 0.041$).

Out of 28 follow up patients, 1 (3,5%) with HF and 6 (21,4%) with recDipol were evaluated seronegative during the whole follow-up. In addition, seronegativeization was observed in 5 (17,85%) patients with HF antigen and in 6 (21,42%) patients with recDipol at the end of follow-up. Serological Indeks (SI) value of increased one patient who has the possibility of recurrence at the end of the follow-up period with both antigens.

20 patients with genotype analysis (16 G1, 1 G2, 2 G3 and 1 G1/3) were analyzed using IgG-ELISA. All patients except the G1 genotype were seropositive against both antigens, While 87,5% of patients in the G1 genotype were seropositive with HF and 75% with recDipol.

As a result, promising results were obtained with recDipol antigen especially in the diagnosis of inactive (CE4 and CE5) cysts and specificity. Although recDipol consists of gene regions containing specific epitopes, negative results in the initial blood of CE patients were evaluated as the limited performance of recDipol in diagnosis and follow-up patients.

Keywords; *Echinococcus granulosus*; cystic echinococcosis; multiepitope recombinant antigen; serodiagnosis; follow up; genotype

İçindekiler

Önsöz.....	I
Özet.....	III
Abstract	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini	X
Şekiller Dizini.....	XII
Grafikler Dizini	XIII
Kısaltma Listesi.....	XIV
1.Giriş	1
2.Genel Bilgiler.....	3
2.1. <i>Echinococcus granulosus</i> 'un Taksonomis	3
2.2. <i>Echinococcus granulosus</i> 'un Genel Morfolojisi	5
2.3. <i>Echinococcus granulosus</i> 'un Yaşam Döngüsü	6
2.4. Epidemiyoloji	7
2.5. Tanı.....	8
2.6. Tedavi	12
2.7. Korunma ve Kontrol.....	13
3.Gereç ve Yöntem	14
3.1. Parazit metaryalleri	14
3.2. Genel Laboratuvar Teknikleri.....	14
3.2.1. Moleküler biyoloji teknikleri	14
3.2.2. Genel protein analiz teknikleri	22
3.3. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin tasarlanması, klonlanması ve elde edilmesi	23
3.3.1. Klonlamanın tasarımı.....	24
3.3.2. Hedef gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu.....	29
3.3.3. Hedef gen bölgelerinin hazırlanması	29
3.3.4. pGEX-4T3 vektörün hazırlanması.....	31
3.3.5.Hedef gen bölgelerinin pGEX-4T ile ligasyonu	33
3.3.6. Multiepitop rekombinant peptit antijeninin ekspresyonu ve saflaştırması.....	35

3.4. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin Tanı Değerinin ELISA Yöntemiyle Araştırılması.....	38
3.4.1. Çalışmada kullanılan serum örneklerinin toplanması	38
3.4.2. ELISA'ların optimal koşullarının belirlenmesi	40
3.4.3. ELISA protokol	40
3.4.4. ELISA sonuçların yorumlanması	41
3.5. Kist Materyallerinin Moleküler Karakterizasyonu	43
3.5.1. Örneklerin Toplanması.....	43
3.5.2. Genomik DNA'nın İzolasyonu	43
3.5.3. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (COX1) Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	44
3.5.4. PCR Ürünlerinin Agaroza Jelde Yürütülmesi	46
3.5.5. Dizi Analizinin Yapılması.....	46
3.5.6. İmmunolojik yanıtın araştırılması	46
4. Etik Kurul Onayı	47
5. Bulgular	48
5.1. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijenin Eldesi	48
5.1.1. Hedef gen bölgelerinin sıralı klonlaması	48
5.1.2. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijenin ekspresyonu ve saflaştırılması	51
5.2. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijenin Serolojik Tanıdaki Yerinin Değerlendirilmesi	53
5.2.1. Kullanılan serum paneli ve hasta özellikleri.....	53
5.2.2. ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi	55
5.3. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin KE'li hastaların takibindeki yerinin değerlendirilmesi	61
5.3.1. Kullanılan serum paneli ve hasta özellikleri.....	61
5.3.2. ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi	62
5.4. Kist Materyallerinin Moleküler Karakterizasyon Bulguları	66
5.4.1. İncelenen hastaların Genel Özellikleri.....	66
5.4.2. PCR bulguları	67
5.4.3. Dizi Analizi Sonuçları	68
5.4.4. Hastaların Demografik ve Klinik özelliklerinin Kistin Genotipiyle İlişkilendirilmesi.....	75

5.4.5. İmmun yanıtın kistin genotipiyle ilişkilendirilmesi.....	76
6.Tartışma	78
7. Sonuç ve Öneriler.....	92
8.Kaynaklar.....	94
9.Teşekkür	107
10.Ekler	109
11.Özgeçmiş.....	115



Tablolar Dizini

Tablo 1. Kistik Ekinokokkoz Etkenlerinin Taksonomisi.....	3
Tablo 2. RT-PCR ile First Strand cDNA Sentez Protokolü.....	15
Tablo 3. PCR genel koşulları.....	16
Tablo 4. PCR için reaksiyon karışımı.....	16
Tablo 5. Sekanslama primerleri.....	21
Tablo 6. Kullanılan antijenlerin özellikleri.....	23
Tablo 7. Klonlamada kullanılan antijenlerin nükleotit ve amino asit dizileri.....	26
Tablo 8. Multiepitop rekombinant peptit antijenin üretiminde kullanılan gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri.....	29
Tablo 9. Restriksiyon enzimlerine ait tanıma dizisi ve kesim bölgeleri.....	30
Tablo 10. PCR ürünlerinin kesim işlemleri için reaksiyon karışımları.....	30
Tablo 11. Vektörlerin kesim işlemleri için reaksiyon karışımları.....	32
Tablo 12. Her bir antijenin sıralı ligasyon işlemleri için reaksiyon karışımları.....	34
Tablo 13. COX1 Gen Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler.....	42
Tablo 14. PCR için Reaksiyon Karışımı.....	43
Tablo 15. PCR koşulları.....	43
Tablo 16. Hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete dağılımı.....	51
Tablo 17. Kist özellikleri.....	53
Tablo 18. Recdipol ve KS antijenleri ile IgG ELISA sonucu pozitif ve negatif (+/-) hasta sayısı.....	54
Tablo 19. ELISA testindeki Recdipol ve KS antijenlerinin tanı değerinin parametreleri.....	55
Tablo 20. KS ve Recdipol antijenlerinin sensitivitelerinin kistin sayısı, yerleşim yeri ve büyüklüğüne göre dağılımı.....	57
Tablo 21. KS ve Recdipol antijenlerinin sensitivitelerinin farklı kist evrelerine göre dağılımı.....	57
Tablo 22. Hasta sayısı ve takip süreleri.....	59
Tablo 23. Tüm takip boyunca KS ve recDipole karşı seronegatif olan hastaların klinik özellikleri.....	61
Tablo 24. Takip süresi sonunda hastaların seropozitivite durumu.....	63
Tablo 25. Hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete dağılımı.....	64
Tablo 26. Pairwise Comparison yöntemi tablosu.....	70

Tablo 27. Örneklere ait sekans dizilerinin Genbank'ta bulunan referans diziler ile sıralama sonucunda bulunan nükleotit değişiklikleri.....	72
Tablo 28. Demografik özelliklerin genotipik çeşitliliğe göre dağılımı.....	73
Tablo 29. Kist özelliklerinin genotipik çeşitliliğe göre dağılımı.....	74
Tablo 30. ELISA sonuçlarının genotipik çeşitliliğe göre dağılımı.....	75



Şekiller Dizini

Şekil 1. <i>Echinococcus</i> türlerinin taksonomisi	3
Şekil 2: KE'un Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırılması.....	8
Şekil 3. Ekspresyon vektörü pGEX-4T3.....	25
Şekil 4. I- AgB1'in PC amplifikasyon ürünü, II-A; pGEX-4-T3 + AgB1 ligasyonu ürünü, II-B; <i>Bam</i> HI ve <i>Eco</i> RI enzimleri ile restriksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 5. I- AgB2'nin PC amplifikasyon ürünü, II-A; pGEX-4-T3 + B1+B2 ligasyon ürünü, II-B; <i>Bam</i> HI ve <i>Sal</i> I enzimleri ile restriksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 6. I-Ag5'in PC amplifikasyon ürünü, II; pGEX-4-T3 + B1+ B2 + Ag5 ligasyon ürününün <i>Bam</i> HI ve <i>Not</i> I enzimleri ile restriksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	48
Şekil 7. Multiepitop rekombinant peptit antijeninin ekspresyon ürününün SDS-PAGE ile analizi.....	49
Şekil 8. Multiepitop rekombinant peptit antijeninin saflaştırma ürününün SDS PAGE ile analizi.....	50
Şekil 9. Pozitif örneklerin bir kısmının jel görüntüsü.....	65
Şekil 10. 20 örneğe ait sekans sonuçları ile referans dizilerinin sıralama sonuçları.....	69
Şekil 11. Örneklerin filogenetik analiziyle elde edilen ağacın görünümü.....	71

Grafikler Dizini

Grafik 1. Kist evrelerinin dağılımı.....	52
Grafik 2. RecDipol ve KS antijenlerinin sensitivite, spesifite ve doğruluk oranlarının karşılaştırılması.....	55
Grafik 3. KS ve recDipol antijenlerinin sensitivitelerinin kist evrelerine göre oranları.....	58
Grafik 4. Takip sonunda SI değeri yükselen hastanın aylara göre SI değerinin dağılımı.....	62



Kısaltma Listesi

ABZ	:	Albendazol
AE	:	Alveoler Echinococcosis
Ag 5	:	Antijen 5
AgB	:	Antijen B
BSA	:	Bovine Serum Albümin
BT	:	Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	:	complementary DNA
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G	:	Genotip
GST	:	Glutasyon-S-Transferaz
HERACLES	:	The Human Cystic Echinococcosis ReseArch in CentraL and Eastern Societies
HRM	:	High Resolution Melting Analysis
IFAT	:	Immunofluorescence Antibody Tests
IFN	:	Interferon
Ig	:	Immunglobulin
IHA	:	Indirect Haemagglutination Test
IPTG	:	Izopropil β -D-tiogalaktozit
KE	:	Kistik Ekinokokkozis
LAMP	:	Loop-Mediated İsothermal Amplification
LB	:	Luria-Bertani
MR	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
OD	:	Optik Dansitise
ORF	:	Open Reading Frame
PAIR	:	Percutaneous Aspiration Injection Respiration
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCR	:	Polimeraz Chain Reaction
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SI	:	Serolojik Indeks
STE	:	Saline/Tris/EDTA
USG	:	Ultrasonografi

1.Giriş

Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus* cinsine ait helmintlerden *E.granulosus*' un metasestod formunun neden olduğu insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkileyen önemli bir halk sağlığı problemidir (Altintas, 2003; Atkinson vd., 2013; Silva, 2010).

KE, Antartika hariç tüm kıtalardaki ülkelerde kozmopolit bir dağılım göstermektedir (Manciulli vd., 2017). Dünya genelinde KE'nin prevelansının yaklaşık olarak altı milyon civarında olduğu bildirilmiştir (Siracusano vd., 2009).

Enfeksiyon, enfekte son konakların (köpekler, kurtlar gibi karnivorlar) dışkılarıyla atılan *E. granulosus* yumurtalarının ara konaklar (insan ve koyun, keçi, sığır, domuz gibi çiftlik hayvanları) tarafından ağız yoluyla alınmasıyla oluşmaktadır (Silva, 2010). Yavaş büyüme özelliğinde olan hidatik kistler, en sık karaciğerde (%52-%77), sonra akciğerlerde (%10-%40) ve nadiren diğer organlarda (%10) görülmektedir (Akcam vd., 2014).

KE tanısında öncelikli olarak klinik bulgular ve Ultrasonografi (USG), Bilgisayarlı Tomografi (BT) veya Manyetik Rezonans görüntüleme (MR) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (Brunetti vd., 2010). Enfeksiyonun erken döneminde klinik tanının zor olması nedeniyle KE tanısında, klinik ve epidemiyolojik araştırmalarda görüntüleme yöntemleri ile serolojinin birlikte kullanılmasının standart bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir (Siracusano vd., 2009).

Serolojik testlerde temel antijenik kaynak olarak en çok kist sıvısı (KS) antijenleri kullanılmaktadır. KS antijenlerinin laboratuvar koşullarında üretilmediği ve KE ile enfekte hayvanlardan elde edildiği için standardizasyonu oldukça zordur. Bu nedenle farklı laboratuvarlarda farklı sensitivite ve spesifite değeri vermektedir (Siles-Lucas vd., 2017). Ayrıca kistin yerleşimine, evresine ve tedavi türüne göre değişmekle birlikte operasyon sonrası %2 ile 24, PAIR sonrası < %15 ve ABZ tedavi sonrası %25 oranında nüks ihtimali bulunmaktadır (Kabaalioğlu vd., 2006; Smego vd., 2003; Stojkovic vd., 2009).

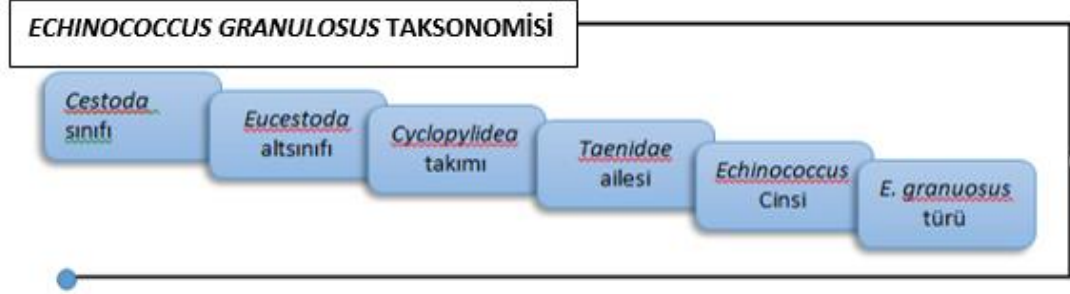
Hasta takibi, tekrarlayan kistlerin mümkün olan en kısa sürede tespiti ile etkili medikal tedavi imkanı sunmasından dolayı giderek önem kazanmaktadır. KS antijenlerine karşı üretilen antikörlerin dolaşımında uzun süre kalması hasta takibinde dezavantaj oluşturmaktadır(N. Ben Nouir vd., 2009).

Son yıllarda KE serolojik tanısında umut verici gelişmeler olsa da bu amaçla en çok kullanılan KS, AgB, Ag5 antijenlerinin ve rekombinant formlarının KE tanı ve takibinde yeterli olmadığı bildirilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2015). KS' nın son immunoproteom analizine göre, spesifik immunodominant epitoplarının bir kist evresinden (DSÖ sınıflandırmasına göre) diğerine değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle serolojik tanı yöntemlerinde kullanılan antijenlerin tanı performansını geliştirmek amacıyla tek molekül yerine birden fazla tanımlanmış immunodominant epitop içeren antijen (multiepitop rekombinant protein) kullanımına ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Lv vd., 2016; Sarkari ve Rezaei, 2015).

Bu araştırmada KE enfeksiyonunun serolojik tanısında ve takibinde yaşanan sorunların çözümü için üretilen multiepitop rekombinant peptit antijenin (recDipol) tanı performansının KS antijeni ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.Genel Bilgiler

2.1. *Echinococcus granulosus*'un Taksonomisi



Şekil 1. *Echinococcus* türlerinin taksonomisi

E.granulosus 'un genel taksonomideki yeri Şekil 1 'de gösterilmiştir.

Önceki yıllarda yüksek genotipik ve fenotipik çeşitliliğe sahip tek tür olarak bilinen *E. granulosus*, son taksonomik düzenlemelere göre 5 alt türden oluşan bir kompleks olarak kabul edilmektedir. *E. granulosus* sensu lato olarak adlandırılan bu kompleks, fenotipik karakter ve gen dizi analizlerine dayanarak *E. granulosus* sensu stricto, *Echinococcus equinus*, *Echinococcus ortleppi*, *Echinococcus canadensis* ve *E.felidis* olmak üzere 5 alt türe ayrılmıştır (Ito vd., 2017). KE etkenlerinin tür, genotip ve suşları Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 1. Kistik Ekinokokkozis Etkenlerinin Taksonomisi (Ito vd., 2017)

Tür ^a	Suş/Genotip
<i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto	Koyun Suşu/G1-3
<i>Echinococcus canadensis</i> ^b	
<i>E. canadensis</i> (G6/7)	Deve ve domuz suşu/G6 /7
<i>E.canadensis</i> (G8)	Cervid suşu/G8
<i>E. canadensis</i> (G10)	Cervid suşu /G10
<i>Echinococcus ortleppi</i>	Sığır suşu/G5
<i>Echinococcus equinus</i>	At suşu /G4
<i>Echinococcus felidis</i>	Aslan suşu

^a Bütün listelenen türler tek bir tür olarak ele alınmıştır, *E. granulosus*.

^b Genotip özelliklerine göre üç intraspesifik gruba ayrılmıştır

Roming ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Koyun, Tazmanya Koyunu ve buffalo suşlarının (G1-G3) *E. granulosus* s.s. türünü oluşturduğu ve *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* *E. canadensis* (G6-10) ve *E. felidis*' in ayrı tür olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Romig vd., 2017).

Yapılan çalışmalarda Türkiye'de ağırlıklı olarak G1 (koyun suşu) görüldüğü bildirilmiştir (Erdoğan vd., 2017; Ergin vd., 2010; Utuk vd., 2008). Šnábel ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile Türkiye'de ilk kez G7 (domuz suşu) tespit edilmiştir (Šnábel vd., 2009). Şimşek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ilk kez G6 (deve suşu) bulunduğu bildirilmiştir (Simsek vd., 2011). Aydın İlinde 20 örnekle yapılan çalışmanın sekans sonuçlarına göre örneklerin %75'i G1 genotipi, % 25'i ise G6/7 (deve/domuz suşu) olarak bulunmuştur (Oral Babaoğlu vd., 2018).

Genotip ve immun yanıt ilişkisi

Yapılan çalışmalarda aynı antijenin farklı genotiplerde dizi varyasyonları bulunduğu gösterilmiştir (Haag vd., 2004; Kamenetzky vd., 2005; Muzulin vd., 2008). Ayrıca bazı antijenlerin alt gruplarını eksprese eden gen bölgelerinin bazı genotiplerde bulunmadığı bildirilmiştir. Jiang ve arkadaşları serolojik testlerde yanlış negatif sonuçların nedenlerinden birinin de parazitin genotipi olduğunu belirtmişlerdir (Jiang vd., 2012). AgB2'nin G1 ve G2 genotipleri tarafından eksprese edilirken G5 ve G6/7 genotiplerinde eksprese edilmediği gösterilmiştir.

Genotipik farklılıkların yanlış pozitif sonuçlara da neden olabileceği ve daha detaylı araştırmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Manzano-román vd., 2015).

Bu nedenle daha homejen ve standardize edilebilir bir rekombinant antijen üretilebilmesi için yukarda belirtilen faktörlerin dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir (Siles-Lucas vd., 2017). Etebar ve arkadaşları yaptığı çalışmada protoskolekste bulunan EPC1 gen bölgesinin hem G1 hem de G6 genotipinde %100 benzerlik gösterdiğini ve bu bölgeden üretilen rekombinant antijenin serolojik testlerde kullanımın faydalı olacağını belirtmişlerdir (Etebar vd., 2013).

2.2. *Echinococcus granulosus*'un Genel Morfolojisi

E. granulosus'un yumurta, larva (metasestod/hidatik kist) ve erişkin olmak üzere üç farklı morfolojik formu bulunmaktadır.

2.2.1. Erişkin Formu

Baş (skoleks), boyun ve gövdeden (strobilia) oluşan *E. granulosus*'un erişkin formu; 2-1 mm boyunda ve 0.6 mm enindedir. Baş kısmının çapı 0.26-0.36 mm olup dört tane kaslı çekmeni, bir rostellumu ve rostellumda iki sıra halinde dizilmiş çengelleri bulunmaktadır (Özbilgin & Kilimcioğlu, 2007). Gövde 2 ila 7 halka arasında değişmekle birlikte, çoğunlukla 3 halkadan oluşmaktadır. Parazite ait son halka gebe, ondan önceki halka ise olgun halka olarak adlandırılmıştır (Şenlik & Diker, 2004) .

2.2.2. Yumurta

E. granulosus yumurtalarının şekli yuvarlak ya da hafif oval olup 28-36 mikrometre çapındadır ve üç çift çengelli embriyo (onkosfer) taşımaktadır. Yumurtalar kalın çeperli ve koyu kahverengidir. Embriyoyu dış ortamdan koruyan glikoprotein yapıdaki embriyofor tabaka, yumurtaya ışınsal çizgili görünüm vermektedir (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007).

E. granulosus yumurtalarının morfolojik olarak diğer *Echinococcus* ve *Taenia* türlerinden ayırt edilemediği bildirilmiştir (Şenlik ve Diker, 2004).

2.2.3. Metasestod (Larval) Form/Hidatik Kist

E. granulosus'un metasestod ya da hidatik kist olarak adlandırılan larval formu uniloküler ve içi sıvı dolu kese şeklinde görülmektedir (Diaz vd., 2009). Hidatik kist içten dışa germinal membran, laminar membran ve bunları çevreleyen fibröz adventisyel membrandan (perikist) oluşmaktadır. Germinal ve laminar membranın parazit kökenli olduğu, adventisyel membranın ise konak savunma mekanizmanın bir ürünü olduğu belirtilmiştir (Aziz vd., 2011).

Germinal membranın yapısal olarak parazitin erişkin formunun tegümenti ile benzer özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Laminer membranın, kist sıvısının, çimlenme kapsüllerinin ve protoskolekslerin germinatif membrandan köken aldığı belirtilmiştir. Çimlenme kapsülünün germinatif membranından tomurcuklanma ile oluşan protoskoleksler, kapsülün yırtılması sonucu kist sıvısı içine dökülmekte ve “hidatik kum” görünümü oluşturmaktadır (Grubor vd., 2017; Hidalgo vd., 2016) .

Protoskolekslerin; çekmen, rostellum ve çengellerinin bulunduğu ön bölümü kist içerisinde invagine durumdadır (Şenlik ve Diker, 2004). Protoskoleks üreten kistler fertil kist, üretmeyenler ise steril kist olarak tanımlanmıştır (Aziz vd., 2011).

Üç katmandan oluşan hidatik kistin içi berrak ve temiz kist sıvısı ile doludur (Grubor vd., 2017). Kist sıvısı, metasestodun gelişimi için gerekli maddelerin yanı sıra germinal membrandan salınan proteinleri ve serum albumin, lipoproteinler, hemoglobin ve immunoglobulin gibi konağa ait proteinleri de içermektedir. Ayrıca AgB ve Ag5 gibi parazite ait immunojenik yapılar da bulunmaktadır (Mohammed vd., 2018; Siles-Lucas vd., 2017).

2.3. *Echinococcus granulosus*'un Yaşam Döngüsü

Echinococcus türleri yaşam döngülerini tamamlayabilmeleri için iki memeli konağa ihtiyaç duymaktadır (J Eckert vd., 2001) Parazitin kesin konakları karnivorlar protoskoleks içeren kistli organları yemeleri sonucu enfekte olmaktadır. Alınan protoskolokesler ince bağırsağa ulaştığında evagine olup bağırsak lümenine tutunarak 4-5 hafta içinde parazitin yumurta üreten erişkin formuna dönüşmektedir. Parazitin gebe halkasının ya da yumurtasının kesin konak dışkıyla atılmasıyla döngü devam etmektedir (McManus vd., 2003).

İnsanlar ve diğer ara konaklar *E. granulosus* yumurtalarını ağız yoluyla alarak enfekte olmaktadır. Mide ve bağırsak enzimlerinin etkisi ile yumurtadan serbest hale gelen onkosfer, çengelleri ile bağırsak villuslarına tutunarak kan ya da lenf yoluyla pasif olarak karaciğere taşınmaktadır. Karaciğere tutunamayan onkosferler akciğer, böbrek, dalak, kas ve beyin gibi diğer organlara yerleşmektedir (Eckert vd., 2001). Onkosferin organlara ulaşması ile metasestod evresi şekillenmeye başlamaktadır (Şenlik ve Diker, 2004).

2.4. Epidemiyoloji

KE, Antartika hariç tüm kıtalardaki ülkelerde kozmopolit bir dağılım göstermektedir. Dünya genelinde KE prevalansının yaklaşık 6 milyon civarında olduğu bildirilmiştir (Siracusano vd., 2009).

Ülkemizde insan KE'ine ait olgu sayıları çoğunlukla hastane kayıtlarından elde edilmektedir. KE ile ilgili verilerin düzenli ve doğru bir şekilde toplanamaması nedeniyle Sağlık Bakanlığı verilerinin enfeksiyonun gerçek prevalansını yansıtmadığı bildirilmiştir (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007).

Yazar ve ark.ları tarafından yapılan ve Türkiye'nin yedi bölgesinin de dahil edildiği çalışmada 2001-2005 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'ndan elde edilen verilere göre 14789 KE olgusunun %13,13'ünün Marmara Bölgesinden, %16,94'ünün Ege Bölgesinden, %16,09'unun Akdeniz Bölgesinden, %38,57'sinin İç Anadolu Bölgesinden, %5,70'inin Karadeniz Bölgesinden, %6,80'inin Doğu Anadolu Bölgesinden ve %2,75'inin Güneydoğu Anadolu Bölgesinden olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca Sağlık Bakanlığı'ndan alınan verilere göre olgu/nüfus oranının 6,30/100.000 olduğu bildirilmiştir (Yazar vd., 2008).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalar ve derlemeler de enfeksiyonun ülkemizdeki durumu hakkında bilgi vermektedir (Açıkgöz vd., 2009; Akalin vd., 2014; Aksu vd., 2013; Delibaş vd., 2006; Cengiz vd., 2015; Ertabaklar vd., 2012; Hakverdi vd., 2009; Özkol vd., 2005).

Altıntaş ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, İzmir ve çevresinde yaşayan insanlardan alınan 2055 kan örneği incelenmiş ve %3,45 (7/2055) oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Altintas vd., 1999).

The Human Cystic Echinococcosis ReseArch in CentraL and Eastern Societies (HERACLES) projesi kapsamında Türkiye'den 6 ilden (Şanlıurfa, Bitlis, Edirne, Balıkesir, Ankara ve Aksaray) incelenen toplam 8618 kişiden 53'ünde abdominal kistik ekinokokkozis tespit edilmiştir (Tamarozzi vd., 2018)

2.5. Tanı

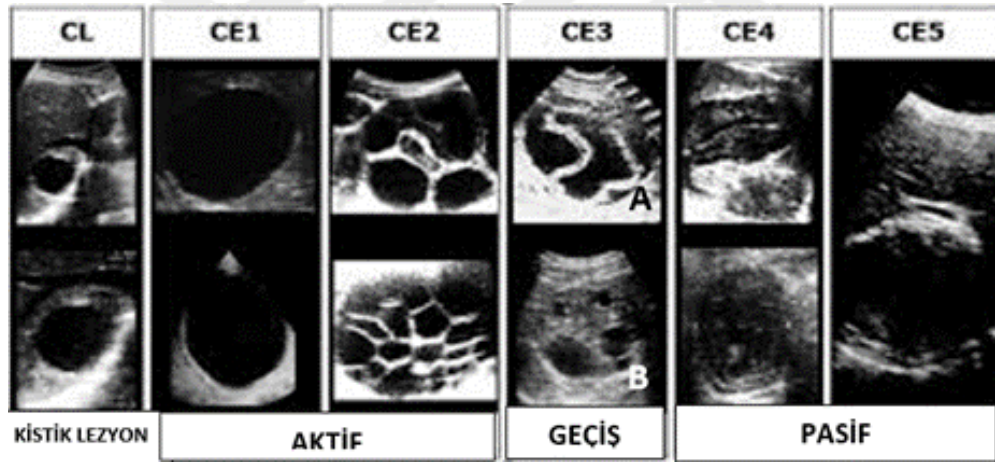
KE tanısında klinik bulgular, görüntüleme teknikleri ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca kist materyallerinin histolojik ve mikroskopik olarak incelenmesi sonucu protoskoleklerin varlığının gösterilmesiyle de direkt tanı konulabilmektedir (Brunetti vd., 2010).

2.5.1. Görüntüleme Teknikleri

Hidatik kistlerin; ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MR) ile görüntülenebildiği ve değerlendirildiği bildirilmiştir.

Ultrasonografi ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Sınıflandırılması

DSÖ, hidatik kistlerin içeriğine ve duvarlarının görünümüne göre 5 temel grupta (CE1-CE5) sınıflandırılmasını önermiştir (Brunetti vd., 2010). (Şekil 2)



Şekil 2. KE'un DSÖ sınıflandırması (Brunetti vd., 2010)

CE1 tipi (uniloküler) ve CE2 tipi (multiloküler) kistler protoskoleks bulundurma olasılığından dolayı aktif kist olarak tanımlanmaktadır (Siracusano vd., 2009). CE3 tipi kistler geçiş grubu olup dejenerasyonun başladığı evre olarak bildirilmiştir. CE3 tipi kistler; yüzen membranların görüldüğü CE3a ve ağırlıklı olarak kız vezikülleri bulunduran CE3b tipi olmak üzere iki grupta değerlendirilmektedir (Brunetti vd., 2010). CE4 tipi kistler hiperekojen dejeneratif içerikli, CE5 tipi ise kalsifiye kistler olup inaktif olarak kabul edilmektedir (Siracusano vd., 2009).

2.5.2. Serolojik Tanı

Serolojik tanı yöntemleri ile *E. granulosus*'un konak vücudunda oluşturduğu humoral ve hücrel immun yanıtın ölçülmesi ve dolaşımdaki antijenlerin tespiti yapılabilmektedir (Siles Lucas vd., 2017).

Hasta serumlarında spesifik antikorların saptanması serolojik tanıda oldukça sık tercih edilen bir yöntemdir. Spesifik IgG antikorlarının ve alt tiplerinin (IgG1-4) tespiti ile kist aktivitesi, nüksü ve hasta takibi ile ilgili umut verici gelişmeler bulunmaktadır. Nüksü ya da aktif büyüyen kisti bulunan hastalarda IgG1 ve IgG4 yüksek seviyelerde görülürken kist infiltrasyonu ya da kalsifikasyonu görülenlerde azaldığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2012).

KE tanısında kullanılan başlıca serolojik yöntemler Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Haemagglutination Test (IHA) ve Immunoblotting (IB) olup birçok laboratuvar da temel antijenik kaynak olarak en çok kist sıvısı (KS) antijenleri kullanılmaktadır. Doğal (ham), kısmen ya da tamamen saflaştırılmış (AgB ve Ag5) KS antijenlerinin serolojik testlerde standardizasyonu zor olup, farklı laboratuvarlarda farklı sensitivite ve spesifite verebilmektedir (Manzano-román vd., 2015). Kist sıvısına karşı spesifik IgG-ELISA testinin sensitivitesinin %64,8 ile %100 arasında değiştiği gösterilmiştir (Siles-Lucas vd., 2017).

Bu kapsamda temel antijenik kaynak olarak KS kullanılmasının bazı sakıncaları bulunmaktadır. Bunlardan ilki, KE hastalarının bir kısmının kist sıvısına karşı serolojik olarak negatif olmasıdır. CE1 tipi erken dönem kistleri veya CE4 ve CE5 tipi inaktif kistleri bulunan hastaların genellikle seronegatif olduğu bildirilmiştir. Göz veya beyin gibi korunaklı bölgelerde bulunan kistik lezyonların da genellikle serolojik değerlendirmede gözden kaçtığı belirtilmiştir (Higuera vd., 2016). KE hastaların %30-40 kadarı seronegatif olduğundan negatif serolojik test sonucunun, kistik ekinokokkozisin varlığını dışlamakta yetersiz olduğu bilinmelidir (Higuera vd., 2016; Zhang vd., 2012)

Kist sıvısının serolojik testlerde antijenik kaynak olarak kullanılmasının bir diğer sıkıntısı da alveolar echinococcosis (AE), cysticercosis, schistosomiasis ve fascioliasis gibi diğer parazitik enfeksiyonlarla çapraz reaksiyon sonucu yanlış pozitif sonuçlar vermesidir (Manzano Román vd., 2015; Siles Lucas vd., 2017).

Son yıllarda rekombinant antijenlerin, daha yüksek konsantrasyonda antijen kullanımına imkan sağladığı ve daha yüksek sensitivite/spesifite gibi avantajlar sunduğu bildirilmiştir (Lin vd., 2008). Bu anlamda en çok çalışılan iki KS antijeni, en immunojenik olan AgB ve Ag5 olarak bildirilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2015).

AntijenB (AgB): 120-160 kDa büyüklüğünde olup AgB1, AgB2, AgB3, AgB4 ve AgB5 alt gruplarından oluşmaktadır. Bu alt gruplardan her biri *E.granulosus* ve *E. multilocularis* türleri arasında %90 benzerlik gösterdiği, düşük oranda da olsa *Taenia* cinsi ile benzer antijenlere sahip olduğu ve bu benzerliklerin çapraz reaksiyonların nedeni olduğu bildirilmiştir (Manzano-román vd., 2015). Rekombinant AgB alt sınıflarının KE tanısındaki performansını araştırmak için yaptıkları çalışmanın sonucunu AgB1 > AgB4 > AgB2 > AgB5 > AgB3 olarak bildirmişlerdir (Sarkari ve Rezaei, 2015). USG ile takibi yapılan KE hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada farklı kist evrelerinin antijen salınım açısından farklılıklar gösterebildiği belirtilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada rekombinant AgB antijeni kullanılarak çalışılan ELISA'nın sensitivitesi CE1, CE2, CE3, ve CE4/CE5 kist evresine sahip hastalarda sırayla %74, %96, %90, ve %56 olarak bildirilmiştir. AgB'nin alt gruplarının rekombinant formlarına ait sensitivitenin %55 ile %94,6 arasında değiştiği bildirilmiştir (Manzano Román vd., 2015).

Antijen5 (Ag5): Kist sıvısının ısıya dayanıksız, yaklaşık 400 kDa ağırlığında oldukça immunojenik bir bileşenidir. Ag5'in *E.multilocularis* ve *Taenia* cinsi tarafından salınan bazı proteinlerle %90'dan fazla benzerlik göstermesi nedeniyle AE ve cysticercosis başta olmak üzere diğer hastalıklarla çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir. Ayrıca Ag5'in CE1 ve CE5 kist evrelerinde antikor salınımında rol aldığı ve bu durumun sensitivitedeki düşüklüğün nedenleri arasında olabileceği bildirilmiştir. Yayınlanan makalelerde Ag5'in sensitivitesinin %50 ile %87,5 arasında değiştiği gösterilmiştir.

Ag5'in erken dönem aktif kistleri ve geç dönem inaktif kistleri saptamada faydalı olabileceğinden bahsedilmiştir (Manzano-román vd., 2015). Antijen kaynağı olarak rekombinant Ag5 antijeninin kullanıldığı bir çalışmada ELISA-IgG ile %65 sensitivite gösterilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; KE serolojik tanısında ağırlıklı olarak kullanılan KS, AgB, Ag5 ve bunların rekombinant formlarının KE tanı ve takibinde yeterli olmadığı bildirilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2015). KS'nın son immunoproteom analizine göre, spesifik immunodominant epitoplarının bir kist evresinden (Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre) diğerine değişiklik gösterdiği ve bunun sonucu olarak da serolojik tanıda birden fazla tanımlanmış immunodominant antijen (multiepitop rekombinant protein) kullanımına ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Sarkari ve Rezaei, 2015).

2.5.2.1. Hasta Takibinde Serolojinin Yeri

KE'in cerrahi ya da medikal tedavi sonrasında %2-25 arasında nüks ihtimali bulunduğu bildirilmiştir (Boubaker vd., 2014; Nour vd., 2008).

Enfeksiyonun erken tanısı etkili medikal tedavi imkanı sunarak morbitide ve mortalitede azalmaya neden olmaktadır (Siracusano vd., 2009). Hasta takibi, klinisyenlere enfeksiyonun prognozu ve nüks oranını değerlendirme imkanı sunduğu için giderek önem kazanmaktadır (Boubaker vd., 2014; Brunetti ve Junghanss, 2009)

KE hasta takibinde yaygın olarak görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle yeni büyüyen kistlerin ve kistin canlılığının tespitinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu amaçla hasta takibinde uygun serolojik testlerin kullanılmasının tanıya yardımcı olacağı bildirilmiştir (Nour vd., 2008).

KE hastalarının cerrahi ve medikal tedavi sonrası yaklaşık 6 yıl takibinin yapıldığı bir çalışmada IgE, IgG1 ve IgG4' ün aktif KE'nin serolojik tanısında değerli olduğu gösterilmiştir (Tenguria ve Naik, 2014).

KE tedavisinde cerrahi yöntemler sonrası hidatik kist antijenlerinin dolaşıma katılmasıyla immun yanıt uyarılmaya devam etmekte ve operasyon sonrası 3 ay boyunca spesifik IgG antikor seviyelerinde artış gözlenebilmektedir. Ancak operasyondan 6 ay sonra spesifik IgG antikor düzeyinin artmaya devam ettiği durumlarda nüks düşünülmesi gerektiği bildirilmiştir.

Akciğer yerleşimli KE' de cerrahi tedavi sonrası antikor seviyelerinin karaciğer kist hidatigine oranla daha hızlı düştüğü gözlenmiştir (Gönlügür vd., 2004). Cerrahi ve medikal tedavinin etkinliğini değerlendirmek için operasyondan önce ve tedaviyi takiben 6 ay, 1 yıl, 2 yıl, 3 yıl ve 4 yıl sonra görüntüleme yöntemleri ve serolojik yöntemlerle hasta takibi önerilmektedir (Tenguria vd Naik, 2014).

Siles-Lucas ve ark. tarafından KE'nin serolojik tanı ve takibinin anlatıldığı çalışmada dolaşımdaki antijenlerin ve sitokinlerin saptanmasının avantajları ve dezavantajları detaylı bir şekilde anlatılmıştır (Siles Lucas vd., 2017).

2.5.3. Moleküler Teknikler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction -PCR) kökenli yaklaşımlar *Echinococcus sensu sitricto* (s.s.) içinde gözlenen türlerin, genotiplerin ve haplotiplerin tanımlanması ve *E. granulosus sensu lato* (s.l.) ve *E. multilocularis*'in ayırıcı tanısı için kullanılmaktadır. *Echinococcus* türlerinin moleküler analizi için Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), multiplex-PCR, High Resolution Melting Analysis (HRM), Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ve PCR sonrası sekanslama yöntemleri kullanılması önerilmektedir (Avila vd., 2017) .

2.6. Tedavi

KE tedavisi için şu anda cerrahi, PAIR, medikal ve “İzle ve Bekle” olmak üzere 4 farklı tedavi seçeneği önerilmektedir (Tirado vd., 2018)

Cerrahi yöntemler, KE tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Higuita vd., 2016). Cerrahi yöntemler KE'de ilk tedavi seçeneği olarak kabul edilmesine rağmen operasyon sonrası önemli oranda mortalite (yaklaşık %2), morbitide ve nüks (%2-25) görüldüğü bildirilmiştir (Brunetti, 2015) .

PAIR (Puncture, Aspiration, Injection, Re-aspiration) yönteminin opere edilemeyen hastalarda, operasyon sonrası nüks şekillenen hastalarda ve kemoterapiye yanıt vermeyenlerde endike olduğu bildirilmiştir (Brunetti vd., 2010). Bu yöntemde anafaksi ve nüks riski bulunduğu belirtilmiştir (McManus vd., 2012).

KE medical tedavisinde Albendazol (ABZ) türevi ilaçlar tercih edilmektedir. Küçük, aktif ve komplike olmayan kistlerde 3-6 ay arası ABZ kullanımıyla başarılı tedavi oranının %30 olduğu bildirilmiştir (Brunetti vd., 2010). İzle ve Bekle yönteminin, komplike olmayan CE4 ve CE5 tipi kistlerin bir çoğunun zamanla kalsifiye ve inaktif olması nedeniyle görüntüleme yöntemleriyle tedavi edilmeden takibinin yapılması esasına dayandığı belirtilmiştir (McManus vd., 2012).

2.7. Korunma ve Kontrol

KE'un tanı ve tedavisinde yaşanan zorluklar nedeniyle enfeksiyondan korunma ve kontrolünün giderek önem kazandığı görülmüştür (Azizi vd., 2015).

Korunma ve kontrol programlarındaki başarı parazitin yaşam döngüsünün kırılması ile mümkün olacağı, bu kapsamda enfeksiyondan korunma ve kontrolü için yeni yaklaşımlar üzerinde durulması gerektiği bildirilmiştir. Bu yaklaşımlar; i) Çiftlik hayvanlarında etkili aşılama, ii) Köpeklerde *E. granulosus* erişkin formuna karşı potansiyel aşı geliştirilmesi, iii) Özel eğitim programları, iv) İnsanlar ve kesin konaklar için daha iyi tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, v) Daha etkili antiparazitik tedavinin uygulanması, vi) Mümkün olan en uygun maliyetli uygulamaların belirlenmesi için matematiksel modellerin kullanılması şeklinde bildirilmiştir. KE kontrolünün matematiksel modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, koyun sürülerinin %90'ından fazlasının aşılama şartıyla aşılanmanın etkili bir kontrol stratejisi olabileceğini göstermiştir (Craig vd., 2007).

Koyunlarda onkosferal *E. granulosus* antijeni (EG95) ile yapılan geniş çaplı aşılama çalışmasında yüksek derecede koruma sağlandığı ve kist sayılarında yaklaşık %90 ile 100 arası azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yeniden bir enfeksiyon şekillenmediği durumlarda 6 yıl boyunca koruyuculuğun devam ettiği bildirilmiştir (Eckert & Deplazes, 2004).

3.Gereç ve Yöntem

3.1. Parazit Materyalleri

Parazit materyalleri elde etmek için enfekte koyunların karaciğerlerinde bulunan hidatik kistler kullanılmıştır. Steril koşullarda hidatik kistten aspire edilen kist sıvısı protoskoleksler çökene kadar oda ısısında bekletilmiştir. Protoskoleks ve partiküllerden ayrılan üst sıvı (süpernatant) 50 ml'lik falkonlara alınarak 5 dakika boyunca 3.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstteki kist sıvıları steril falkonlara bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Protoskoleksler birkaç kez Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandıktan sonra -80°C'e kaldırılmıştır. Kist sıvısı ve protoskoleksler immunolojik testlerde ve rekombinant proteini üretirken gen dizileri elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

3.2.1. Moleküler biyoloji teknikleri

Multiepitop rekombinant peptit antijeninin eldesi sırasında uygulanan tüm moleküler teknikler Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) /İSPANYA Enstitüsü'nde yapılmıştır.

3.2. Genel Laboratuvar Teknikleri

3.2.1.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

RNA izolasyonu için öncelikle -80°C'de muhafaza edilen protosoleksler çözdürülmüştür. Protoskoleksler Purelink® RNA Mini kitinde (ThermoFisher) bulunan ve RNA'yı endojen RNAzlardan korumak amacıyla guanidinyum izotiyosiyanat içeren çözelti ile parçalanmış ve homojenize edilmiştir. Üretici firmanın talimatları uygulanarak total RNA ekstrakte edilmiş ve -80°C'e kaldırılmadan önce konsantrasyonu ölçülmüştür. Daha sonra total RNA'dan First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılarak RT-PCR ile cDNA sentezlenmiştir. (Tablo 2).

Tablo 2. RT-PCR ile First Strand cDNA Sentez Protokolu

Bileşenler	Miktar
10x Reaksiyon tamponu	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
10 mM dNTP karışımı	2 µl
Primer Oligo-p(dT) ₁₅	2 µl
RNaz inhibitör	1 µl
Reverse Transkriptaz	0.8 µl
Rna örneği	4-6 µl
H ₂ O (DNaz & RNaz içermeyen)	2-4 µl
Total hacim	20 µl

RT-PCR reaksiyon karışımı 25°C’de 10 dakika, 42°C’de 60 dakika, 99°C’de 5 dakika ve 4°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan cDNA ürünü -20°C’de muhafaza edilmiştir. cDNA’lar, PCR reaksiyonunda hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu için kalıp nükleik asit olarak kullanılmıştır.

3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR-Polymerase Chain Reaction)

PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır (Watson vd., 1992).

1. DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon): DNA molekülünün çift sarmal yapısının 90°C’nin üzerinde sıcaklık uygulayarak birbirinden ayrılması aşamadır.

2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing-Bağlanma): Denatürasyon sonrası primerlerin, tek zincir olarak açılmış olan DNA’lar üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlandığı aşamadır.

Bu bağlanma, istenen DNA dizisinin AT/GC içeriğine göre değişen ve kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağlarının oluşmasını sağlayan uygun bir sıcaklıkta (TA, bağlanma sıcaklığı) oluşmaktadır.

3. Primer Uzaması (Elongasyon) : Tamamlayıcı DNA zincirinin üzerine bağlanan primerler ve DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılması aşamasıdır.

Tablo 3’de PCR genel koşulları verilmiştir. Her bir antijenin amplifikasyonu için kullanılan bağlanma sıcaklığı ve döngü sayısı ilgili yerlerde detaylandırılacaktır.

Tablo 3. PCR genel koşulları

Basamak	Sıcaklığı (°C)	Zaman	Tekrar
1. Basamak	94	2 dak.	
2. Basamak : Döngünün başlangıcı			
Denatürasyon	94	15 sn.	
Annealing(Bağlanma)	40-68	30 sn.	
Elongasyon(uzama)	72	40 sn.	
3.Basamak: Tekrar döngüsü			35 Tekrar
4.Basamak: Son uzama	72	7 dak.	
3.Basamak: Koruma /Bekleme	4		

PCR işlemlerinde, Techne TC-512 Termal Cyler kullanılmıştır. Her reaksiyonda negatif kontrol olarak ultra saf su (Milli –Q water) kullanılmış olup toplam reaksiyon hacmi 50 µl olan PCR karışımı Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. PCR için reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar (µl)
Polimeraz reaksiyon tamponu 10X (MgCl ₂ 15 µM)	5
dNTP karışımı 10 mM	5
Primer Forward 10 µM	1
Primer Reverse 10 µM	1
Taq polimeraz	0.25
DNA	2 – 6
Ultra saf su(Milli-Q)	24-30
Toplam hacim	50

3.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerinin ve kesim işlemlerinin analizinde ve uygun fragmentlerin saflaştırılmasında agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır.

Agaroz jel hazırlanırken, TBE (90 mM Tris, 90 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 8.0) tampon çözeltisine %1 oranında agaroz (Sigma) ilave edilmiş ve mikrodalga fırında kaynayana kadar ısıtılıp hafif hafif karıştırılarak çözündürülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiye 1/10.000 konsantrasyonda SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermofisher) boyası eklenmiştir. Elde edilen homojen karışım kuyucuk oluşması için tarak yerleştirilen jel kalıplarına dökülmüş ve jel donuncaya kadar beklenmiştir.

DNA Gel Loading Dye 6x (Thermofisher) yükleme boyası ile hazırlanan örnekler 1×TBE tampon çözeltisi içinde bulunan jelin kuyularına yüklenmiştir. İlk kuyucuğa GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Invitrogen) moleküler marker aktatılmıştır. Elektroforez uygulamaları 100V akım altında, 30-40 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonucu UV transillüminatör kullanılarak görüntülenmiş ve ChemiDoc MP System (Bio-Rad) jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.2.1.4. Agaroz jellerinden DNA'nın saflaştırılması

Transillüminatörün yüzeyinde UV ışık kaynağı ile görünür hale getirilen hedef DNA bantları bir bistüri yardımıyla kesildikten sonra mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. DNA saflaştırma işlemi için StrataPrep DNA Gel Kit (Cat. No. 400768) kullanılmıştır. 10 mg jel başına 200 µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenerek 50°C ısı bloğunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu karışım mikrospin kolonlara aktarıldıktan sonra 11.000 xg 30 saniye santrifüj edilmiştir. 700 µl yıkama solüsyonu mikrospin kolonlara aktarılmış ve santrifüj işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Mikrospin kolonlar yeni ependorflara aktarılmış ve 50 µl steril su kullanılarak maksimum hızda 1 dk santrifüj işlemi sonrası DNA elde edilmiştir.

Saflaştırılan DNA, NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies) ile analiz edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.1.5. Nükleik asitlerin konsantrasyon ölçümü

Nükleik asitlerin konsantrasyon ölçümünde UV visible Thermo Scientific NanoDrop serie 2000 spektrofotometrisi kullanılmıştır. NanoDrop yazılımı açılıp, nükleik asit uygulaması seçildikten sonra steril su ile ‘boş’ ölçüm yapılmış ve sonrasında optik yüzeyler; temiz, kuru bir laboratuvar mendili ile silinmiştir. Nükleik asit örneklerinin ‘saflık’ dereceleri 260 nm dalga boyunda, kontaminasyon varlığı A260/A280 ve A260/A230 formülleriyle değerlendirilmiştir. Beklenen saflık değeri; DNA ve RNA olması durumuna göre sırayla 1,8 ile 2,0 olarak kabul edilmiştir.

3.2.1.6. Kompetant Hücre Hazırlanması

Bakterilerin serbest DNA’yı içine alabilen kompetant hücrelere dönüştürülmesi için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- Kompetant hale getirilecek bakterilerin bir alikotu, ampisilin içeren 10 ml steril Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine aktarılmış ve 37°C’de, çalkalayıcı etüvde (New Brunswick Scientific) 200 rpm’de gece boyunca bekletilmiştir.
- Ertesi gün, 10 ml kültür 100 ml LB’ye aktarıldıktan sonra Optik Dansite (O.D)₆₅₀ 0.2 değerine ulaşana kadar aynı koşullar altında inkübe edilmiştir.
- 100 ml kültür daha sonra 4 steril tüpe (25 ml) bölünüp 4°C’de 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Pelletler, her 50 ml’lik kültür için 10 ml olacak şekilde soğuk 0,1 M kalsiyum klorür ile yeniden süspanse edilmiştir.
- Karışım 4°C’de 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Pelletler, her 50 ml’lik kültür için 2 ml olacak şekilde soğuk 0,1 M kalsiyum klorür ile yeniden süspanse edilmiştir.
- Elde edilen bakteri süspansiyonu 200 µl’lik alikotlar halinde -80°C’de %50 gliserol ile saklanmıştır.

3.2.1.7. Transformasyon

Kompenant hale getirilen hücrelerin hedef gen bölgelerini kapsayan DNA'yı içine alması ve genomuna ile birleştirmesi işlemi olan transformasyon aşamasında BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) ekspresyon vektörü kullanılmıştır.

Transformasyon işleminden önce, 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar plakları hazırlanmıştır.

Transformasyon protokolü;

- Daha önceden 200 µl alikot halinde -80°C'de saklanan kompetant bakteri stoğu çözünene kadar buzda bekletildikten sonra 100' er µl olacak şekilde önceden soğutulmuş iki mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 10'ar µl ligasyon ürünü ve kontrol reaksiyon ürünü kompetant bakterilerin üzerine eklendikten sonra tüp dışına hafifçe vurularak alt-üst edilmiştir.
- Bakteriler 20 dakika boyunca buz içerisinde bekletildikten sonra karışımlara 30 saniye boyunca 42°C su banyosunda ısı şoku uygulanmıştır.
- Daha sonra 2 dakika boyunca buz içerisinde bekletilen bakterilerin üzerine 37°C'de inkübe edilmiş ve antibiyotik içermeyen 0.6 ml LB sıvı besiyeri eklendikten sonra yavaşça homojenize edilmiştir.
- Bakteriler 37°C'de 1 saat 180-220 rpm çalkalayıcı etüvde inkübe edildikten sonra 4.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip konsantre hale getirilmiştir.
- Konsantre hale getirilen bakteriler, LB agar plaklara steril cam yayma çubukları ile ekildikten sonra 37°C inkübatörde bir gece bekletilmiştir.

3.2.1.8. Bakteriyel Plazmidlerin Saflaştırılması

Gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılan plaklardan steril pipet ucu yardımıyla 10-12 adet koloni seçilmiştir. Her bir koloni 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra 37°C’de çalkalayıcı etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kültürden %50 gliserol içinde ve -80°C’de muhafaza edilmek üzere bir miktar ayrılmıştır. NucleoSpin® Plasmid (NoLid ref 740588.250) kitinde tavsiye edilen protokolde küçük modifikasyonlar yapılarak saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Plazmid saflaştırma protokolu

- Gece boyu inkübe edilen 5 ml kültür, 11.000 xg (Microfuge® 22R, Beckman Coulter)’de 30 saniye santrifüj edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Pelletler, 250 µl resüspansiyon tamponu ile yeniden süspanse edildikten sonra mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir.
- Her tüpe 250 µl liziz tamponu ilave edildikten sonra 4- 6 kez yavaşça elle alt–üst edilip oda ısısında 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra 300 µl Nötralizasyon tamponu eklenmiş ve mavi renk kaybolana kadar elle alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Karışım 5 dakika 11.000 xg de santrifüj edilmiştir. Üst sıvının temiz olmadığı durumlarda bu basamak tekrarlanmıştır.
- Santrifüj sonrası elde edilen üst sıvılar mikrospin kolonlara aktarıldıktan sonra 1 dakika 11.000 xg’de santrifüj edilmiş ve altta toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Mikrospin kolonlara 600 µl yıkama tamponu eklendikten sonra 1 dakika 11.000 xg’de santrifüj edilmiştir.

- Yıkama işleminden sonra tüplere hiçbir tampon eklenmeden 2 dakika 11.000 xg’ de santrifüj edilerek son kurutma işlemi uygulanmıştır.
- Son olarak, mikrospin kolonlar yeni ependorflara yerleştirildikten sonra kolonlara 50 µl Milli-Q water /steril damıtılmış su aktarılmıştır.
- 1 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildikten sonra 1 dakika 11.000 xg’de santrifüj edilerek plazmid DNA elde edilmiştir.
- DNA konsantrasyonu ölçüldükten sonra -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.9. DNA sekanslama ile klonlamanın doğrulanması

Plazmid DNA’larının, restriksiyon enzimleri ve PCR ile analizinden sonra hedef gen bölgelerinin doğru pozisyonda plazmide aktarıldığını doğrulamak amacıyla sekanslama işlemi yapılmıştır.

Sekanslama, Sanger Sekanslama metodu kullanılarak Salamanca Üniversitesi’nde gerçekleştirilmiştir. Plazmidin 5 µl’si, her bir sekanslama primerinin (Tablo 5) 1 µl’si ile çift yönlü sekanslama yapılmak üzere gönderilmiştir. Analiz sonucu, Chromas 2.62 (Technelysium) uygulaması kullanılarak görselleştirilmiştir. Elde edilen tüm nükleotit sekansları BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizi ile doğrulanmış ve multalin yazılımı (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) kullanılarak orijinal diziyle hizalanmıştır. Ayrıca bu dizilere karşılık gelen amino asit dizileri DNASTAR Lasergene v.12.3.1 yazılımı ile elde edilmiştir.

Tablo 5. Sekanslama primerleri

Primer İsimleri	Dizi	Vektör
PGEX forward	5'GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	pGEX
PGEX reverse	5'CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'	pGEX

3.2.2. Genel protein analiz teknikleri

3.2.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) elektrofrezis kiti kullanılmıştır. Elektrofrezde kullanılmak üzere %4'lük yoğunlaştırıcı/yığıcı ve %12'lik ayırıcı jeller hazırlanmıştır. İlk kuyucuğa 14.4 ve 116 kDa arasında 8 bant içeren Protein MW Marker (Thermo Scientific) yüklenmiştir. Örnekler yükleme tamponu (0,5 M Tris, pH 6.8, %0,4 SDS), bromofenol mavisi (%0,4), 2-merkaptoetanol (%2,5) ve gliserol (%10) içeren 4xTM çözeltisi ile hazırlanmış ve jele yüklemekten önce 5 dk kaynatılmıştır. Jel, elektrofrez/yürütme tampon çözeltisi (0,025 Tris-HCl, 0,192 M Glisin, %0,1 SDS, pH 8.3) ile doldurulmuş elektrofrez küvetine yerleştirilmiştir. Güç kaynağı, yaklaşık 60 dakika boyunca 30 volta programlanmıştır.

3.2.2.2. Poliakrilamid jellerinin Coomassie mavisi ile boyanması

Elektrofrez tamamlandıktan sonra jeller, protein bantlarının görüntülenebilmesi için metanol (%50), damıtılmış su (%40), asetik asit (%10) ve Coomassie Mavisi (%0,05) içeren boyama solüsyonunda ve çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, jeller deiyonize su (%88), asetik asit (%7) ve metanol (%5) içeren destaining solüsyonu ile muamele edilmiştir. Protein bantları görünene kadar birkaç saat boyunca düzenli aralıklarla destaining solüsyonu değiştirilmiştir. Protein bantlarının varlığı ışıklı bir platformda kontrol edilmiş ve jel görüntüleri ChemiDoc MP Sisteminde (Bio-Rad) alınmıştır.

3.2.2.3. Protein konsantrasyonunun değerlendirilmesi

Proteinlerin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile %12'lik poliakrilamid jelde Bovine Serum Albümin (BSA) standartlarla karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Standartların farklı konsantrasyonlarda (0,002 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,5 mg/ml) çözeltileri hazırlanmıştır. 20'şer µl standart çözeltileri ve 20 µl örnek jele yüklenmiştir. Proteinler, elektrofrez işleminden sonra ChemiDoc System MP (Bio-Rad) sistemi ile görüntülenmiştir. Bu yazılımla örneklerin konsantrasyonu standartlarla karşılaştırarak belirlenmiştir.

3.3. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin tasarlanması, klonlanması ve elde edilmesi

Multiepitop rekombinant peptit antijeni, Şubat-Ağustos 2016 tarihleri arasında bulunduğum Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) /İSPANYA Enstitüsü'nde Prof. Dr. Mar Siles Lucas ve Post. Doc. Raul Manzano Roman ile birlikte çalışarak başarılı şekilde elde edilmiştir. Proje giderleri Avrupa Birliği tarafından desteklenen HERACLES projesi -602051 (<http://www.heracles-fp7.eu/>) tarafından karşılandı.

Çalışmamızda multiepitop rekombinant peptit antijenin (recDiPol) eldesinde immunolojik tanı potansiyeli bulunan ve rekombinant olarak üretilmesi önerilen AgB1 ve AgB2 ve Ag5 antijenleri kullanılmıştır (Carmena vd., 2006; Virginio vd., 2003). Bu antijenlerin bazı moleküler özellikleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Daha sonra seçilen antijenlerin her biri için nükleotid ve amino asit dizileri ayrıntılı olarak ilgili bölgede açıklanmaktadır.

Tablo 6. Kullanılan antijenlerin özellikleri

Antijen	GenBank	Bölge Kodlaması Boyutu (bp)	Uzunluk (aa)	Moleküler ağırlık (Kda)	İzoelektrik noktası
B1	AF143813.1	243	81	9,2	9,1
B2	U15001.1	272	90	9,5	10,3
Ag5	JF970202.1	1452	484	54,8	6,7

3.3.1. Klonlamanın tasarımı

Çalışmamızda AgB1, AgB2 ve Ag5'in en reaktif immunodominant epitoplarını içeren gen bölgelerinin kullanıldığı bir klonlama stratejisi tasarlanmıştır. Belirlenen gen bölgelerinin aynı ekspresyon vektöründe sıralı klonlaması ve antijen kaynağı olarak tek bir rekombinant polipeptit antijeninin üretilmesi amaçlanmıştır.

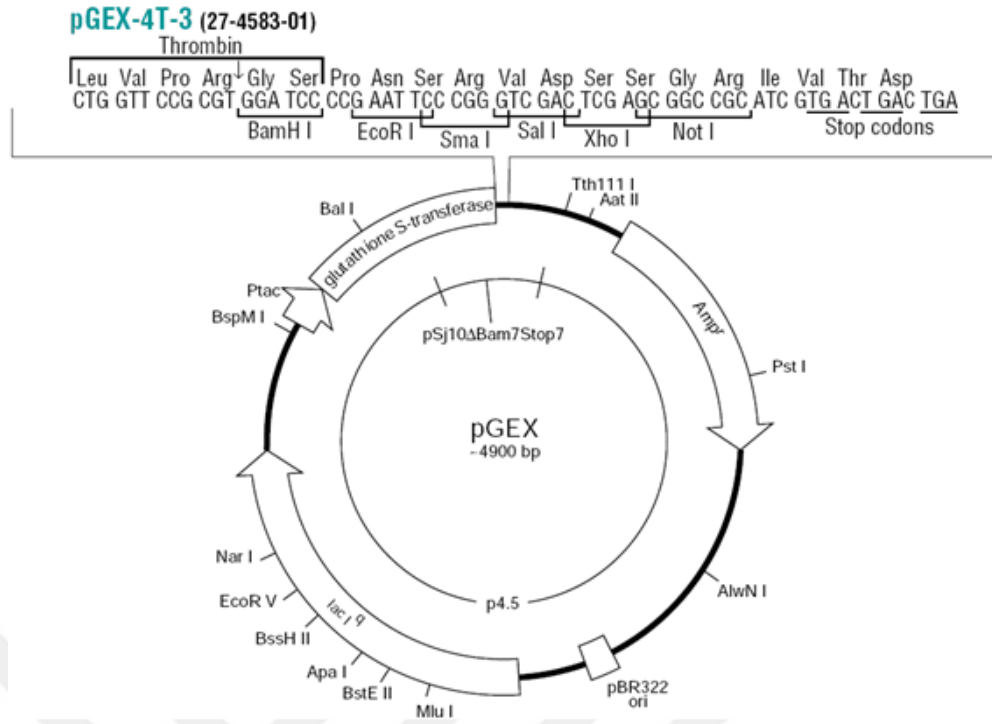
3.3.3.1. Vektör seçimi

Çalışmamızda, hedeflenen sıralı klonlama ile uyumluluğu göz önünde bulundurularak pGEX-4T-3 ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Bu vektörün tercih edilme nedenlerinden biri de çoklu klonlanma bölgesinin 5 ucunda Glutasyon-S-Transferaz (GST) –Tag bölgesini bulundurmasıdır. GST, ökaryotların 26-kDa'luk ortak bir proteini olup ilk olarak *Schistosoma japonicum*'dan klonlanmıştır.

Bu vektörler; GST etiketli rekombinant proteinlerin kimyasal olarak indüklenebilmesi ve yüksek düzeyde ekspresyonu için lacIq genini içerecek şekilde tasarlanmıştır. Ekspresyon, laktoz analog izopropil β -D-tiogalaktozit (IPTG) tarafından lacIq genin kontrolü altındaki tac promotörünün indüklenmesi ile gerçekleşmektedir. Füzyon proteinlerinin afinite matrisinden salınması için çok ılımlı elüsyon koşulları sağlaması, proteinlerin antijenite ve fonksiyonel aktivitesi üzerindeki etkilerini en aza indirdiği bildirilmiştir. Ayrıca, seçilebilir işaretleyici olarak da Ampicilin dirençli geni bulundurduğu belirtilmiştir(Harper ve Speicher, 2011).

pGEX-4T-3 vektörü ayrıca Thrombin tanıma bölgesi içermektedir. Böylece Trombin kullanılarak Trombin tanıma bölgelerine sahip füzyon proteinlerinin bu bölgeden kesilmesi ve rekombinant proteinin GST grubundan ayrılması sağlanmaktadır.

Kullanılan pGEX-4T-3'e ait vektör haritası Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Ekpresyon vektörü pGEX-4T3

3.3.1.2. Antijenik bölgelerinin saptanması

AgB1, AgB2 ve Ag5'in antijenitesi en yüksek ve en reaktif epitoplarının lineer olarak belirlenmesinde "on-line" SVMTriP (sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php) biyoinformatik programı kullanılmıştır. Program tarafından hidrofiliklik, esneklik, ikincil yapı ve polarite gibi parametrelerle oluşturulan algoritma sonucu önerilen immunodominant epitoplar seçilmiş ve bu epitopları içeren gen bölgeleri (hedef gen bölgeleri) belirlenmiştir.

Bahsedilen antijenlerin seçilen epitoplarına ve bu epitopları içeren gen bölgelerine ait nükleotit ve aminoasit dizileri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Klonlamada kullanılan antijenlerin nükleotit ve amino asit dizileri

Antijen	Sekansı
AgB1	>AF143813.1 <i>Echinococcus granulosus</i> antigen B8/1 gene, complete cds ttctgcatgcttctcgctctggctctcgtctcattcgtgggtggttactcaggcgtaggtcacactaccctc cctcatctccacctcattcacgctcgcatctgccactctcttctcttcttcttcttcttcttccatttagtgatgatggc ctcacctcgacgtcgaggagtgatgaaaatgtttggcgaagtgaagtacttcttcgaacgtgatccgttgggt cagaaagtggttgacctctaaaggaactggaagaagtgttcagttgttgaggaagaagctacgcatgg cactcaggtcccacctcagaggggtgattgctgaaggtgaatagaggtgccaatacactgtcatgtgactagtc atagattttgctc MLLALALVSFVVVTQADDGLTSTSR SVMKMFGEVKYFFERDP LGQKVVDLLKELEEVEQLLRKKLRMALRSHLRGLIAEGE
AgB2	>U15001.1 <i>Echinococcus granulosus</i> antigen B 8 kDa subunit precursor mRNA, complete cds gtgtgtatctgcgtgtgacatttgggagacaatcgcataatgaggacttacatccttctctcttctgtctc cgtggcttctcgtggccgtcgttaagctaaaatgatgagccaaaagcacacatggggcaagtggtaaaaaaa gatgggggaacttcgagacttcttagaaatgatccactgggtcaaagactgtcgtcttggcaatgacc taactgccatttgcagaagctgaattgaagattcgtgaggtgctgaagaagtatgtaagaattgggtgga agaaaaagatgatgattcaagtaagtcgctcgggacacatgattgcctaataattctactaccatcccat MRTYILLSLALVAFVAVVQAKDEPKAHMGQVVKRWGELRD FFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVILKKYVKNLVEEKDD DSK
	>JF970202.1 <i>Echinococcus granulosus</i> Ag5 mRNA, complete cds atggcgagatcgcgcccttggatcgtttctgtctcttcgccaccgccgctcttggttgag ctcactctcgatccagatgaactcgtaaggcgagcgagaggtcacgggtggttctactttacgactcaaatg gcgcaacactgatgttaatcgagcctcttctaccgcgagaacatttacgacggctggtcgggtggagtg

Ag5	agtgtccccccatacctgcctcgaacatcgctatcgctgtgtggacgactcctacactcaaccggtcaacta cctcacctcctctgcccgcacatgccccctcaagtacattgcagaggagagaccgtgtgaagacaagtccaactg <u>catcatcaactcgaaaccgtcagaagaactaactagaatgcaagaaaagtgcggcatcagaggatcggt</u> tgataaaaatactgcaaagcccagccgtcgaagatggaaagatatggacgatgatgaagccgatgacg ctgaggccgaagaacgtggcgagtagcagagtcgaaaggctaccatatagcttaaagattcttggtggaa aaagcgccaaatcaaagagctggccgtggcatgttggaatctacaaagcagccaattacaacgcttccg agggattgactcgcttgaagtctgaaaacatcatatgcgggggcacactgattacaccacgatgggttctg actgcggcgacactgcttaaagccaattttcggctcctcgaatgccttgcttttggcattccagcgccattga acacggacgagatgaagcccattttcctgctcgttcgagccggtgacactgttctggagggtacgcgtact cgaaacgagcaggagagcgatcatgtggtcgacctggtcgctcattcatccgattgggttgcceaacgtgt tgatagtccattcgatgtagctctgttgagactcgagacacgtgtgaacattgagagtgacgggtcgggcg ttgcttgctacccaaaaatgcagatgcaacaccggcggaggacgcagtttgccttccgttggtgggt gagaaatctcgaccataagcaagccgcgacgcccgcctaccttcttaatcccttctctggccttttgg cgtttgggaacgtcgaccacagcgaccacttcctgaatgagattagggtctccatcgaccacctgagaag tgcttccatcatgacgatgaaaatgaggccaaatctgcgtggcagctctaataaggcggttgcgcaggcgac acaggaggtgactcttctgccgaaatgaggaggtggacgggtgtacgtgtacggtgtgatgggtcgggac ccacgcagtactgtaagtcacgtcgttggtctacaactcgggtgggcagtgatccagtggatcaaccgctacg cagtctaa MARSRPLWIVFVCLFATAALGLELTLPDELVKAQRESHGGFY FYDSNGATLMFNRS LFVYRENIYDGWSRWSECSPTCLEHRYRRCVD DSYTQPVNYLTSSARICPFKYIAEERPCEDKSN <u>CIINSKPSEELTRMQE</u> <u>KCGIRGSFDKNTAKPSRRRWKMDDEADDAEAEERGEYESERLPYS</u> <u>LKILGGKSAKSKSWPWHV</u>GIYKAANYNASEGLTRLKSENIICGGTLIT PRWVLTAHCLKPIFGSSNALPFGIPAPLNTDEMKPILLVRAGDTVLE <u>GTRTRNEQESDHVVDLVVIHP</u>DWVAQRVDSFPDVALLRLETPVNIES DGAGVACVPKNADATPAEDAVCFVSGW <u>GEKSRPISKPRRRRPTE</u>FNP FFWPFGRLWERRPQRPTSLNEIRVSIDPPEKCFHHDDENEQAICAGSSN KGVCAGDTGGGLFCRNEEDGRWYVYGVMSGPTQYCKSRRWLNS VGSVIQWINRYAV
-----	--

Nükleik asit dizisinde koyu renkle gösterilenler hedef gen bölgeleri, altı çizili bölgeler primeler

Aminoasit dizisinde kırmızı renkle gösterilenler hedef gen bölgesi, altı çizili bölgeler immonodominant bölgeler

3.3.1.3. Primer tasarlama

Hedeflenen gen bölgesi, ekspresyon vektörüne klonlanmadan önce genomik veya vektör DNA'dan PCR ile çoğaltılmalıdır. Bunun için ilk adım gerekli primerlerin tasarlanmasıdır.

Primerler, klonlanacak gen bölgesinin ekspresyon vektöründe aktarılacağı bölgedeki restriksiyon enzim bölgeleri ile uyumlu uca sahip olacak şekilde DNASTAR Lasergene v.12.3.1 yazılımı kullanılarak tasarlanmış ve sentezlenmesi için Invitrogene gönderilmiştir. Tanınmayı kolaylaştırmak için primerlere serbest bazlar eklenmiştir.

Ayrıca klonlanacak gen bölgelerinde ve vektör içerisinde, seçilen restriksiyon enzimleri ile benzer kesim bölgelerinin bulunmamasına dikkat edilmiştir. Primerler G1 genotipini amplifiye edecek şekilde tasarlanmıştır.

AgB1'e ait immunodominant epitopları içeren gen bölgesinin amplifikasyonu ve ligasyonu için primerin 5'ucuna *Bam*HI, 3'ucuna ise *Eco*RI enzimine ait tanıma bölgeleri ilave edilmiştir. AgB2'de hedeflenen gen bölgesine ait primerin ise 5'ucuna *Eco*RI, 3'ucuna ise *Sall* restriksiyon enzim bölgeleri eklenmiştir. Ag5'de hedeflenen gen bölgesine ait primerin hem Forward hem Reverse kısmına ise *Not*I enzimine ait tanıma bölgesi ve Reverse primerine TTA durdurma kodonu ilave edilmiştir. Bahsedilen antijenler için tasarlanan primerlerin listesi Tablo 8'de verilmiştir.

3.3.2. Hedef gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu

PCR işlemleri ile Tablo 8’de gösterilen spesifik primerler ve bağlanma sıcaklıkları kullanılarak genel protokolda tarif edildiği gibi hedeflenen her bir bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8. Multiepitop rekombinant peptit antijenin üretiminde kullanılan gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri

Epitop		Primer	Enzim	Bağlanma sıcaklığı
AgB1	5' Forward	CCC <u>GGATCC</u> tacttcttgaacgtgatccg	<i>Bam</i> HI	50°C
	3' Reverse	CCC <u>GAATTC</u> aatcaaccctctgaagtggga	<i>Eco</i> RI	
AgB2	5' Forward	CCC <u>GAATTC</u> gatgagccaaaagcacacatgg	<i>Eco</i> RI	50°C
	3' Reverse	CCC <u>GTCGAC</u> atacttcttcagcacctcacg	<i>Sall</i>	
Ag5	5' Forward	GGG <u>GCGGCCGC</u> tgcatcatcaactcgaaacc	<i>Not</i> I	55°C
	3' Reverse	CCC <u>GCGGCCGC</u> <u>TTA</u> gaaggtaggacggcgg	<i>Not</i> I	

Kırmızı renkli harfler; enzim bölgeleri

Mavi renkli harfler; durdurma kodonu

PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra beklenen boyuttaki DNA bantları jelden bir bistüri yardımıyla kesilmiştir. DNA, StrataPrep DNA Jel Ekstraksiyon kiti (Stratagene) ile saflaştırılmış ve konsantrasyonu ölçüldükten sonra kullanılmaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.3. Hedef gen bölgelerinin hazırlanması

Restriksiyon işlemleri sırasında Fast Digest-Thermo Scientific enzimleri ve bu enzimlerin %100 aktivitesini destekleyen FastDigest Green tamponu kullanılmıştır. Kullanılan restriksiyon enzimlerine ait dizi ve kesim bölgeleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Restriksiyon enzimlerine ait tanıma dizisi ve kesim bölgeleri

Enzimler	Tanım Dizileri
BamHI	5' ...G [^] GATCC... 3' 3' ...CCTAG [^] G ... 5'
EcoRI	5' ...G [^] AATTC... 3' 3' ...CTTAA [^] G... 5'
SalI	5' ...G [^] TCGAC ... 3' 3' ...CAGCT [^] G... 5'
NotI	5' ...GC [^] GGCCGC.. 3' 3' ...CGCCGG [^] CG.. 5'

Her bir hedef gen bölgesi için hazırlanan restriksiyon reaksiyon karışımları (Tablo 10) 1 saat boyunca 37°C'de ısı bloğunda inkübe edilmiştir. Daha sonra restriksiyon enzimleri, 80°C'de 20 dakika inkübe edilerek ısıyla etkisizleştirilmiştir. Restriksiyon işlemleri sırayla AgB1, AgB2 ve Ag5 antijenlerine ait gen bölgelerinde uygulanmıştır.

Tablo 10. PCR ürünlerinin kesim işlemleri için reaksiyon karışımları

Antijen	Bileşenler	Hacim (µl)
AgB1	DNA	40
	<i>BamHI</i>	2
	<i>EcoRI</i>	2
	Bufferx10	5
	H ₂ O	1
AgB2	DNA	40
	<i>EcoRI</i>	2
	<i>SalI</i>	2
	Bufferx10	5
	H ₂ O	1
Ag5	DNA	40
	<i>NotI</i>	2
	Bufferx10	5
	H ₂ O	3
Toplam Hacim		50

Restriksiyon ürünlerinin saflaştırılması için tüm restriksiyon reaksiyon karışımları inkübasyon sonunda agaroz jelde yürütülmüştür. Beklenen boyuttaki DNA bantları jelden kesilerek StrataPrep DNA Jel Ekstraksiyon kiti (Stratagene) ile saflaştırılmıştır. DNA konsantrasyonu ölçüldükten sonra ligasyon aşamasında kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

AgB1 – *Bam*HI- *Eco*RI—Kesilmiş/Saflaştırılmış: 3,7 ng/ µl

AgB2—*Eco*RI- *Sal*I--- Kesilmiş/Saflaştırılmış: 4,5 ng/ µl

Ag5 --- *Not*I----- Kesilmiş/Saflaştırılmış: 4,7 ng/ µl

3.3.4. pGEX-4T3 vektörün hazırlanması

Ligasyon aşamasında kullanılmak için çoğaltılan ve konsantrasyonu belirlenen pGEX-4T3 vektörü, hedef gen bölgelerinin ligasyon işlemine hazırlanması sırasında kullanılan restriksiyon enzimleri kesilerek doğrusal forma getirilmiştir.

Aynı zamanda, sıralı klonlama işlemlerinin her birinden önce vektörün kendine ligasyonunu önlemek amacıyla vektörün 5’ucundaki fosfat grupları alkaline fosfataz FastAP (Thermo Scientific) kullanılarak defosforile edilmiştir. Defosforilasyon işlemi doğrudan restriksiyon işlemleri sırasında kullanılan tampon içinde gerçekleştirilmiştir. Böylece hem restriksiyon reaksiyonu hem de defosforilasyon işlemleri aynı anda gerçekleştirilebilmiştir. Restriksiyon reaksiyon bileşenleri Tablo 11’de verilmiştir.

Kesilecek vektör konsantrasyonları

pGEX-4T3: 147.1 ng/µl,

pGEX-4T3 +AgB1: 137.7 ng/µl,

pGEX-4T3 +AgB1+ AgB2: 281 ng/µl

Tablo 11. Vektörlerin kesim işlemleri için reaksiyon karışımları

Bileşenler	Hacim (µl)	Bileşenler	Hacim (µl)	Bileşenler	Hacim (µl)
pGEX-4T3 (1 µg)	6,8	pGEX-4T3-AgB1 (1 µg)	7,3	pGEX-4T3-AgB1-AgB2 (1 µg)	4
<i>BamHI</i>	1	<i>EcoRI</i>	1	<i>NotI</i>	1
<i>EcoRI</i>	1	<i>Sall</i>	1		
Buffer 10x	2	Buffer 10x	2	Buffer 10x	2
FastAP	1	FastAP	1	FastAP	1
Steril su	8,2	Steril su	7,7	Steril su	12
Toplam Hacim	20		20		20

Restriksiyon reaksiyon karışımları, 1 saat boyunca 37°C’de ısı bloğunda inkübe edilmiştir. Daha sonra restriksiyon enzimleri, 80°C’de 20 dakika bekletilerek ısıyla etkisizleştirilmiştir. Son olarak, restriksiyon reaksiyon karışımı agaroz jelde yürütüldükten sonra vektöre ait bantlar kesilmiş ve StrataPrep DNA Jel Ekstraksiyon kiti (Stratagene) ile saflaştırılmıştır. DNA konsantrasyonu ölçüldükten sonra ligasyon aşamasında kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Kesilmiş/Defosforile edilmiş/Saflaştırılmış: K/D/S

K/D/S-pGEX-4T3: 15,4 ng/µl

K/D/S-pGEX-4T3 + AgB1: 51,5 ng/µl

K/D/S -pGEX-4T3 +AgB1+ AgB2: 10,1 ng/µl

3.3.5. Hedef gen bölgelerinin pGEX-4T3 ile ligasyonu

Ligasyon reaksiyonları (Tablo 12), T4 DNA Ligasyon kiti (Thermofisher) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef gen bölgesi/vektör oranı DNA konsantrasyonlarına bağlı olarak 5: 1 ya da 3:1 oranında seçilmiş ve aşağıdaki formül ile ligasyon reaksiyonunda kullanılacak vektör ve hedef gen bölgesinin miktarları hesaplanmıştır. Ligasyon reaksiyonları gece boyunca 4°C’de gerçekleştirilmiştir.

$$\frac{\text{vektör(ng)} \times \text{insert boyutu(kb)}}{\text{vektör boyutu(kb)}} \times \frac{\text{insert molar miktarı}}{\text{vektör molar miktarı}} = \text{insert (ng)}$$

Sıralı klonlama;

İlk ligasyon, *Bam*HI-*Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesilen/defosforile edilen/saflaştırılan pGEX4-T-3 ile daha önce ligasyon için hazırlanmış AgB1 antijenine ait hedef gen bölgesi arasında gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonları, genel transformasyon protokolünde açıklandığı gibi *E.coli*’nin ekspresyon suşu BL21-CodonPlus (DE3) –RIL’e transforme edilmiştir. Ampicilin dirençli koloniler seçilmiş ve kolonilerden plazmidler saflaştırıldıktan sonra *Bam*HI-*Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Restriksiyon reaksiyon karışımı agaroz jelde yürütüldükten sonra bantların uygun boyutta olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca, AgB1’e ait hedef genin varlığını analiz etmek için AgB1 Forwad ve AgB1 Reverse primerleri kullanılarak PCR ile ikinci doğrulama basamağı uygulanmıştır. Son olarak hedef gen bölgesinin doğru pozisyonda yerleştiğini ve Open Reading Frame (ORF)’i doğrulamak için sekanslama yapılmış ve pGEX-4T3 vektörünün AgB1’e ait hedef gen bölgesini içerdiği gösterilmiştir.

AgB1’e ait hedef gen bölgesini bulundurduğu doğrulanan ve *Eco*RI-*Sall* restriksiyon enzimleri ile kesilen/defosforile edilen/saflaştırılan pGEX4-T-3 ile daha önce ligasyon için hazırlanmış AgB 2’e ait hedef gen bölgesi arasında ligasyon gerçekleştirilmiştir. Bir önceki ligasyon aşamasında uygulanan doğrulama basamakları (enzim kesimi, AgB1 Forwards-AgB2Reverse primerleri ile PCR ve sekanslama) tekrarlanmış ve pGEX-4T3 + AgB1 vektörünün AgB2’e ait hedef gen bölgesini içerdiği doğrulanmıştır.

Son ligasyon ise AgB1 ve AgB2'e ait hedef gen bölgelerini bulundurduğu doğrulanmış ve *NotI* restriksiyon enzimi ile kesilen/defosforile edilen/saflaştırılan pGEX4-T-3 ile daha önce ligasyon için hazırlanmış Ag5'e ait hedef gen bölgesi arasında gerçekleştirilmiştir. Diğer ligasyon reaksiyonlarında uygulanan doğrulama basamakları (enzim kesimi, AgB1Forward-Ag5Reverse primerleri ile PCR ve sekanslama) tekrarlanmış ve pGEX-4T3 + AgB1+ AgB2 vektörünün Ag5'e ait hedef gen bölgesini içerdiği doğrulanmıştır.

Her bir ligasyon aşamasında paralel olarak, hedef gen bölgesi içermeyen ligasyon reaksiyonu da gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiş ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Özetle, her bir klonlama aşamasından sonra uygun pozisyonda yerleşmiş hedef gen bölgelerinin varlığı enzim kesimi, PCR amplifikasyonu ve sekanslama ile analiz edilmiştir. Daha sonra hedef gen bölgelerini içerdiği doğrulanmış plazmitler *E. coli*'nin ekspresyon suşu BL21-CodonPlus (DE3) –RIL'e transforme edilmiştir. Füzyon proteinlerinin ekspresyonu için kültürün bir kısmı kısmı -20°C'de %50 gliserolde muhafaza edilmiştir.

Tablo 12. Her bir antijenin sıralı ligasyon işlemleri için reaksiyon karışımları

Bileşenler	Hacim (µl)	Bileşenler	Hacim (µl)	Bileşenler	Hacim (µl)
pGEX-4T3- K/DF/S (100 ng)	6,5	pGEX-4T3- AgB1 K/DF/S (100 ng)	2	pGEX-4T3- AgB1-AgB2- K/DF/S (100 ng)	10
Ag B1 fragment	3,8	Ag B2 fragment	4	Ag5 fragment	9,8
Ligaz	1	Ligaz	1	Ligaz	1
Buffer 10x	2	Buffer 10x	2	Buffer 10x	3
Steril su	6,7	Steril su	11	Steril su	6,2
Toplam hacim	20		20		30

*K: kesilmiş. DF: Defosforile edilmiş. S: Saflaştırılmış

3.3.6. Multiepitop rekombinant peptit antijeninin ekspresyonu ve saflaştırması

Multiepitop rekombinant peptit antijeninin ekspresyonu, sekanslama ile hedef gen bölgelerini içerdiği doğrulanan plazmitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Hernandez-Gonzalez vd., 2007).

Protein ekspresyon protokolü;

- %50 gliserol stokta muhafaza edilen ve hedef gen bölgelerini içerdiği doğrulanan plazmitin bulunduğu BL21 ekspresyon hücreleri kullanılmıştır.
- Bakteriler 100 µg/ml ampicilin içeren 25 ml LB sıvı besiyerine aktarılmış ve 37°C çalkalayıcı inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra başlangıç kültürü aynı konsantrasyonda ampicilin içeren 475 ml LB sıvı besiyerine transfer edilmiştir. Çalkalayıcı etüvde (160 rpm) O.D.₅₉₅ değeri 0,7-0,8 ulaşana kadar 37°C’de derecede bekletilmiştir.
- Protein ekspresyonunun uyarılması için final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklenmiş ve 15°C’de 150 rpm’de 16 saat inkübe edilmiştir.
- Hücreler, sabit açılı rotorlu (Kubota 6900, rotor RA-1500) ve soğutulmuş santrifüjde 5.000 rpm’de 7 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı uzaklatırılmış ve pellet 15 mL soğuk STE tampon (0,5 M NaCl;10 mM Tris-HCl pH = 8; 1 mM EDTA) ile yeniden süspanse edilmiştir.
- Karışım 30 dk buzda inkübe edildikten sonra final konsantrasyonu 5mM DTT ve %1 olan Triton x-100 ilave edilip 4°C’de 20 dakika çalkalayıcı etüvde bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonunda karışım -80°C’de dondurulmuştur.

- Çözdürme işleminden sonra karışım 10-15 saniye süre ile 10 kez sonike edilip 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüjden sonra üst sıvı (süpernatant) toplanmıştır.
- Pelletler 5 ml STE tampon içinde tekrar süspanse edilmiştir. Sonikasyon basamakları ve santrifüj tekrarlandıktan sonra elde edilen üst sıvı bir önceki basamakta elde edilen üst sıvı ile birleştirilmiş ve 20 dakika boyunca 4°C’de 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Rekombinant proteini değerlendirmek için üst sıvı (çözünür fraksiyon) ve pelletten (çözünmeyen protein) örnekler alınıp Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ile yürütülmüştür.

Saflaştırma

- Çözünür haldeki proteinlerin saflaştırılması için Glutathione-Sepharose® 4B (GE Healthcare, 17-0756-01) reçine kullanılmıştır.
- Glutathione-sepharose 4B reçinenin bulunduğu şişe, içindeki bulamacı yineden süspanse etmek için yavaşça elle alt üst edilmiştir. Pipet yardımı ile 1,5 ml Glutathione-Sepharose 4B reçine bir tüpe aktarılmıştır.
- 500 × g 5 dakika santrifül edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Daha sonra 1x PBS ile 15 dakika boyunca 100 rpm’de yavaşça karıştırılarak (Intelli-Mixer) birkaç kez yıkanmıştır. Her yıkama sonrası düşük hızda santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Rekombinant proteinin üretiminde elde edilen 10 ml üst sıvıya 1x PBS içinde dengelenmiş 1 ml Glutathione-sepharose 4B reçine eklenip Intelli-Mixer’da karıştırılarak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ile inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonunda karışım 1.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve reçineye bağlı olmayan proteinlerin varlığını kontrol etmek için SDS –PAGE de yürütülmek üzere üst sıvıdan örnek alınmıştır.
- Reçine 3 ml PBS ile 3 kez yıkanmıştır.
- Reçine pelletine 1 ml elüsyon tamponu (50 nM Tris-HCl içinde 10 nM indirgenmiş glutation, ph:8) eklendikten sonra karıştırılarak 1 saat 4°C’de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda karışım 1.000 rpm de santrifüj edilmiş ve üst sıvı (elüat) toplanmıştır. Bu basamak yeni füzyon proteinleri elde etmek için tekrarlanmıştır. Üst sıvılar SDS-PAGE ile analiz edilene kadar muhafaza edilmiştir.
- Son olarak, saflaştırılmış antijenin konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.4. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin Tanı Değerinin ELISA Yöntemiyle Araştırılması

Multiepitop rekombinant peptit antijenin tanı değeri ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmalar Prof. Dr. Nazmiye Altıntaş'a ait araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve araştırma giderlerinde YÖK tarafından sağlanan Öğretim Elemanı Yetiştirme Programı (ÖYP) araştırma bütçesi kullanılmıştır.

3.4.1. Çalışmada kullanılan serum örneklerinin toplanması

Multiepitop rekombinant peptit antijenin ve kist sıvısının KE'li hastaların tanısı ve takibindeki değerinin araştırılması amacıyla çalışmamıza Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde cerrahi ya da PAIR işlemi uygulanan ve kist evresi bilinen hastalar, bilgilendirilmiş onamları ile çalışmaya dahil edilmiştir. KE hastalarının işlem sırasında kırmızı kapaklı tüplere 5 cc kan örnekleri alınarak, serumları ayrılmış ve -20°C'de çalışmada kullanıncaya kadar muhafaza edilmiştir. Her bir hastanın demografik ve klinik özellikleri kaydedilmiştir. Takip hastaları operasyondan hemen sonra, 3. ay, 6. ay ve çalışma süresince 6'şar aylık periyodlarla takip kanları alınıp Girişimsel Radyoloji bölümünde USG ile nüks açısından değerlendirilmesi planlanmıştır.

Daha önce benzer çalışmalarda kullanılmak üzere Prof. Dr. Nazmiye Altıntaş (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD) tarafından oluşturulan kist hidatik serum arşivinden benzer kriterleri sağlayan hastaların serumları ve kontrol grubu ile Doç. Dr. Ülkü Karaman (Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD) tarafından sağlanan diğer parazit enfeksiyonlarına ait serumlar da çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmada opere edilen ya da PAIR işlemi uygulanan ve kist evresi bilinen 149 KE hastası ile parazitolojik ve/veya serolojik yöntemlerle diğer parazitik enfeksiyona sahip olduğu gösterilen 49 hastaya (4 alveoler echinococcosis, 5 fasciolosis, 10 taeniasis, 10 toxocariasis, 6 trichinellosis, 1 hymenolepiasis, 3 leishmaniasis, 3 toxoplasmosis, 2 giardiasis ve aşağıda detaylandırılan 5 miks enfeksiyon) ait serum örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca serolojik ve ultrasonografik tetkiklerde negatif olduğu gösterilen 21 sağlıklı bireye ait serum örnekleri IgG-ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir.

(Miks enfeksiyon 1; toxocariasis, ascariasis, Miks enfeksiyon 2; trichuriasis, ascariasis, Miks enfeksiyon 3; toxocariasis, trichuriasis, toxoplasmosis, ascariasis ve Miks enfeksiyon 4- 5 ; trichinellosis, toxocariasis)

3.4.2. ELISA yönteminin optimal koşullarının belirlenmesi

ELISA yönteminde kullanılacak antijenlerin (recDipol ve KS) optimal konsantrasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda antijenlerle ELISA plakları kaplanmıştır. Ayrıca farklı serum dilüsyonları (1/50 ile 1/300) ve ikincil antikor konsantrasyonları (1/2500 ile 1/10000) kullanılarak standardizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.4.3. ELISA protokol

- **Antijen Aşaması:** PBS ile dilüsyonu yapılan antijenler (0,4 µg/ml), düz tabanlı ELISA plaklarına (NUNC, A649246) 100'er µl olacak şekilde dağıtılmış ve 4°C'de bir gece bekletilmiştir.
- **Bloklama Aşaması:** Bir gece bekletilen plaklar boşaltıldıktan sonra her bir çukura 200 µl %5'lik Kazein-PBS ilave edilmiş, 15 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
- **Serum inkübasyonu:** Her bir hasta serumu %5 lik Kazein-PBS ile 1/100 oranında seyreltilmiştir. Bloklamadan sonra serum sulandırımıları çift çukur olacak şekilde 100'er µl plağa aktarılmıştır. Oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra tüm plak 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
- **Yıkama Aşaması:** Serum inkübasyonu sonunda plaklar yıkama cihazı kullanılarak her bir çukura 300 µl PBS aktarılacak şekilde 3 kez yıkanmıştır.
- **İkincil antikor (Konjuge) Aşaması:** Spesifik IgG'lerin saptanmasında keçiden üretilen alkalin fosfataz (AP112A, Merck) ile konjuge edilmiş anti-insan IgG kullanılmıştır. %5'lik Kazein-PBS ile 2:11000 oranında sulandırılan Anti-IgG konjuge, her bir çukura 100 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Oda ısısında 30 dakika rotator üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
- **Yıkama Aşaması:** 3 kez tekrarlanmıştır.

- **Substrat aşaması:** 11 ml substrat solüsyonundan 11 ml 4-diethylamino-2-butanol (DEAB-Merck 8.03116.1000) + 0.011 gr p-Nitrophenyl Phosphate-(p-NPP-N4645 SIGMA) her çukura 100'er µl olacak şekilde aktarılmış ve kromojenik reaksiyon gerçekleşmesi için oda ısısında karanlık ortamda renk değişimi gözleninceye kadar inkubasyona bırakılmıştır.
- **Okuma aşaması:** ELISA plağında şekillenen kromojenik değişiklikler plak okuyucuda (Bio-Tec/µQUANT,MQX200) 405 nm'de değerlendirilmiştir.

3.4.4. ELISA sonuçların yorumlanması

ELISA testi yorumlama aşamasında pozitif negatif ayrımı her bir seruma ait Optik Dansite (OD) değerleri kullanılarak hesaplanan Serolojik Indeks (SI) formülü ile yapılmıştır.

SI: $(NK-S)/(NK-PK)] \times 100$ (NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, S: Serum)

NK serumu olarak OD değeri 0,1-0,2 arasında olan on sağlıklı bireye ait serumların eşit oranda birleştirilmesiyle, PK serumu olarak da OD değeri 0,4-0,5 arasında olan on KE hastasına ait serumların eşit oranda birleştirilmesiye oluşan havuz kullanılmıştır. SI kullanılarak yapılan değerlendirme ile OD değerindeki değişimlerden etkilenmeden her plak kendi içinde yorumlanmıştır.

ELISA testi yorumlanırken SI (50) değeri eşik değer olarak kabul edilmiştir. SI (50) ve üstü olan OD değerleri pozitif olarak değerlendirilmiştir. SI (50) değeri daha önce Hernandez-Gonzalez ve arkadaşları tarafından ROC analizi kullanılarak eşik değer olarak hesaplanmıştır (Hernandez-Gonzalez vd., 2007). KE hastaları arasında SI hesaplaması ile pozitif olanlar 'gerçek pozitif', negatif olanlar 'yalancı negatif' olarak değerlendirilirken kontrol serumların negatif olanlar 'gerçek negatif', pozitif olanlar 'yalancı pozitif' olarak değerlendirilmiştir.

RecDipol ve KS antijenlerinin tanı değerlerini incelemek için bazı tanı parametreleri kullanılmıştır. Kullanılan tanı parametlerinin açıklamaları aşağıda verilmiştir (Skaik, 2008; Uysal, 2012). Gerçek Pozitif: a, Yanlış Negatif: b, Yanlış Pozitif: c, Gerçek Negatif: d olarak kodlanmıştır.

Sensitivite: Hastaların test sonucunda da pozitif olarak değerlendirilmesi olasılığıdır $(a/ a+b)$.

Spesifite: Hastalık var olmadığı durumda testin sonucunun da negatif olarak değerlendirilmesi olasılığıdır $(d/c+d)$.

Pozitif olabilirlik oranı: Hastaların test sonucunda da pozitif olarak değerlendirilmesi olasılığının sağlıklı bireyin pozitif olarak değerlendirilme olasılığına oranıdır $(Sensitivite/1-Spesifite)$.

Negatif olabilirlik oranı: Hasta bireylerin test sonucunda negatif değerlendirilme olasılığının sağlıklı bireylerin negatif değerlendirilme olasılığına oranıdır.

$(1-Sensitivite/Spesifite)$

Pozitif prediktif değer: Test pozitif olarak değerlendirildiğinde hastalığın da gerçekte var olma olasılığıdır $(a/ a+c)$.

Negatif prediktif değer: Test negatif olarak değerlendirildiğinde hastalığın da var olmama olasılığıdır $(d/ b+d)$.

Doğruluk: Testin gerçekte hasta ve sağlam bireyler olarak total doğru tanı oranıdır $(a+d) / (a+b+d+c)$.

İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistik analizi IBM SPSS Statistics version 25 ile yapılmıştır.

Gruplar arası farklılıklar chi-square (ki-kare) testi ile değerlendirilmiştir.

Pearson değeri $(P) < 0,05$ olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

3.5. Kist Materyallerinin Moleküler Karakterizasyonu

3.5.1. Örneklerin Toplanması

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Kasım 2016-Ağustos 2019 yılları arasında opere edilen veya PAIR işlemi uygulanan hastalara ait kist materyalleri çalışmaya dahil edilmiştir.

Kist sıvıları santrifüj edildikten sonra protoskoleks ve çengel varlığı açısından ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Çalışmada kist sıvısında protoskoleks ve çengel tespit edilen 23 örnek kullanılmıştır. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra 3000 xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolasyonu yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.2. Genomik DNA'nın İzolasyonu

-20°C'de muhafaza edilen örnekler çözdürüldükten sonra PBS ile 3000 xg'de 5 dk santrifüj edilerek üç kez yıkanmıştır. DNA izolasyonu, Tissue-cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, cat. #: DP021/DP021-150) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- Örnekler son yıkamadan sonra 500 µl PBS eklenip yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyon üzerine 200 µl ekstraksiyon solüsyonu eklendikten sonra 10 saniye boyunca 1 kez sonike edilmiştir.
- Daha sonra mikrosantrifüj tüplerine 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir.
- Örnekler 56°C ısı bloğunda (Eppendorf) çalkalanarak bir gece inkübe edilmiş ve inkübasyon süresinde belli aralıklarla 5-10 saniye vortekslenmiştir.
- Liziz tamamlandıktan sonra doku kalıntılarını uzaklaştırmak için 14.000 xg'e 5 dk santifüj edildikten sonra pelletler yeni 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmıştır.
- 4 µl RNAz solüsyonu eklendi ve 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra lizata 200 µl Binding Solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

- 70°C’de ısı bloğunda çalkalanarak 10 dk inkübe edilmiştir.
- Karışımın bulunduğu ependorfa 200 µl Etanol eklendikten sonra vortekslenmiş ve tüm karışım toplama tüpüne yerleştirilmiş spin kolona aktarılmıştır. Maksimum hızda 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası biriken süzüntü uzaklaştırılmış ve spin kolona 300 µl Binding solüsyonu eklenip maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpüne biriken süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra 700 µl Wash Buffer eklenip maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu basamak bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Santrifüj sonrası toplama tüpüne biriken süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra etanol kalıntılarının uzaklaştırılması için 5 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve kolona 70 µl içinde nükleaz enzimi bulunmayan steril su eklenmiştir. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen genomik DNA konsantrasyonu ölçüldükten -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.3. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (COX1) Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Hedeflenen gen bölgesinin çoğaltılmasında Tablo 13’de verilen primerler kullanılmıştır.

Tablo 13. COX1 Gen Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler

Forward (JB3)	5’-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3’
Reverse (JB4.5)	5’-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3’

Her bir örnek için 40 µl hacminde PCR reaksiyon hacmi hazırlanmıştır (Tablo 14). PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler PCR Hot-Start Master Mix II (5X)-(Cat. No. : MAG02HS-II) protokolünde önerilen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Tablo 14. PCR için Reaksiyon Karışımı

Bileşen	Miktar (µl)
DNA template (50 ng)	X
Primer JB3 (10 µM)	1.6
Primer JB4,5 (10 µM)	1.6
Hot-Start Master Mix II(5X)	8
Nucleaz içermeyen su	Y (40 µl'ye tamamla)
Toplam hacim	40 µl

PCR cihazı (SensoQuest Labcycler) Tablo 15’de verilen koşullara göre programlanmıştır.

Tablo 15. PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Tekrar
1. Basamak: Ön Denatürasyon	94	3 dak.	
2. Basamak : Döngünün başlangıcı			
Denatürasyon	94	45 sn.	
Annealin(Bağlanma)	50	45 sn.	
Elongasyon(uzama)	72	45 sn.	
3.Basamak: Tekrar döngüsü			35 Tekrar
4.Basamak: Son uzama	72	10 dak.	
3.Basamak: Koruma /Bekleme	4		

PCR işlemlerinde; pozitif kontrol olarak daha önce serolojik ve moleküler tekniklerle pozitif olduğu doğrulanan hasta örneğine ait DNA, negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır.

3.5.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PCR ürünlerini görüntülemek için %1,5'luk agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jelde tarakla oluşturulan her bir kuyucuğa 2 µl yükleme boyası (6X NZYDNA loading dye) ile hazırlanan 5'er µl PCR ürünleri yüklenmiştir. İlk kuyucuğa 50 bp Thermofisher Scientific (cat:10416014) moleküler marker aktarılmıştır. Tampon solüsyonu olarak 1X Tris asetat -EDTA (TAE) [50X TAE-242 gr Tris, 100 ml 0,5 M EDTA (pH: 8), 57,1 ml asetik asit, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve pH 7.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elektroforez uygulamaları 90 volt altında 60 dakika süreyle gerçekleştirildikten sonra elektroforez sonucu UV transillüminatör kullanılarak görüntülenmiştir.

3.5.5. Dizi Analizinin Yapılması

Agaroz jelde görüntülenen PCR ürünlerinden hedeflenen boyutta gen amplifikasyonun olduğu gösterilen örnekler çift yönlü dizi analizi yapılması için Triogen Biotechnology (Germany) firmasına gönderilmiştir.

Çift yönlü sekans sonuçları genotip belirlenmesi ve sekans varyasyonlarının gösterilmesi için CLC Genomic Workbench 12.0.2. programı kullanılarak Genbank'ın (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) veri tabanında bulunan referans suşlarla analiz edilmiştir. Referans suşları olarak; erişim numaraları U50464 (Genotip 1), M84662 (Genotip2), M84663 (Genotip3), M84664 (Genotip4), M84665 (Genotip5), M84666 (Genotip 6), M84667 (Genotip7), AB235848 (Genotip 8) ve AF525457 (Genotip10) olan diziler kullanılmıştır (Oral Babaoğlu vd., 2018).

Ayrıca aynı programda bulunan Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç ve Pairwise Comparison yöntemi kullanılarak benzerlik tablosu oluşturulmuştur.

3.5.6. İmmunolojik yanıtın araştırılması

Genotip analizi yapılan hastalar ELISA yöntemi ile *E.granulosus* IgG antikor yanıt açısından değerlendirilmiştir. Antijen olarak KS ve Recdipol kullanılmıştır. ELISA protokolü bölüm 3.4.3.'de detaylı olarak verilmiştir.

4. Etik Kurul Onayı

Ege Üniveristesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahi Anabilim Dalı, Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Girişimsel Radyoloji bölümleri ile materyal sağlama konusunda iş birliği yapılan ‘Kistik Ekinokokkozisli Hastaların Tanı ve Takibinde Yeni Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin Kist Sıvısı Antijeni ile Karşılaştırılması, İmmun Yanıtın Kistin Evreleri ve Parazitin Genotipiyle İlişkilendirilmesi’ başlıklı tez çalışmamızda materyallerin toplanması ve kullanılması Ege Üniveristesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 16-9.1/13 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.

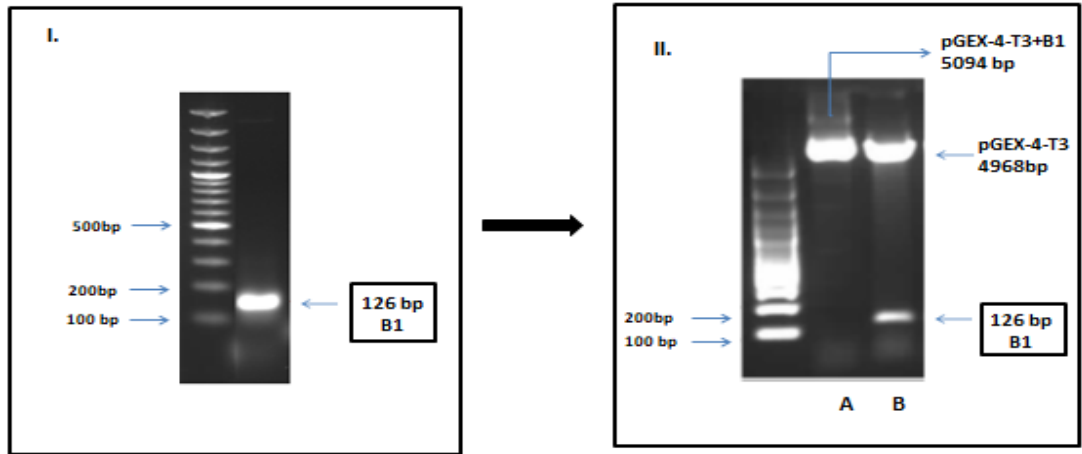


5.Bulgular

5.1. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijenin Eldesi

5.1.1. Hedef gen bölgelerinin sıralı klonlaması

Sıralı klonalama işleminde ilk olarak AgB1'e ait epitopları içeren hedef gen bölgesi klonlanmıştır. Bunun için öncelikle hedef gen bölgesi PCR ile amplifiye edilmiş ve agaroz jelde yürütülmüştür. Beklenen 126 bp (Şekil 4-I) boyutundaki fragment jelden saflaştırıldıktan sonra *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Ayrıca pGEX- 4T3 vektörü de aynı enzimlerle kesildikten sonra defosforile edilmiş ve jelde yürütüldükten sonra saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünlerin ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ürünü transforme edildikten sonra gelişen kolonilerden elde edilen plazmitler *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Ligasyon ve restriksiyon ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Beklenen 5094 bp boyutundaki pGEX-4T-3-B1 ligasyon ürünü ile 126 bp ve 4968 bp boyutundaki restriksiyon ürünleri görüntülenmiştir (Şekil 4-II).

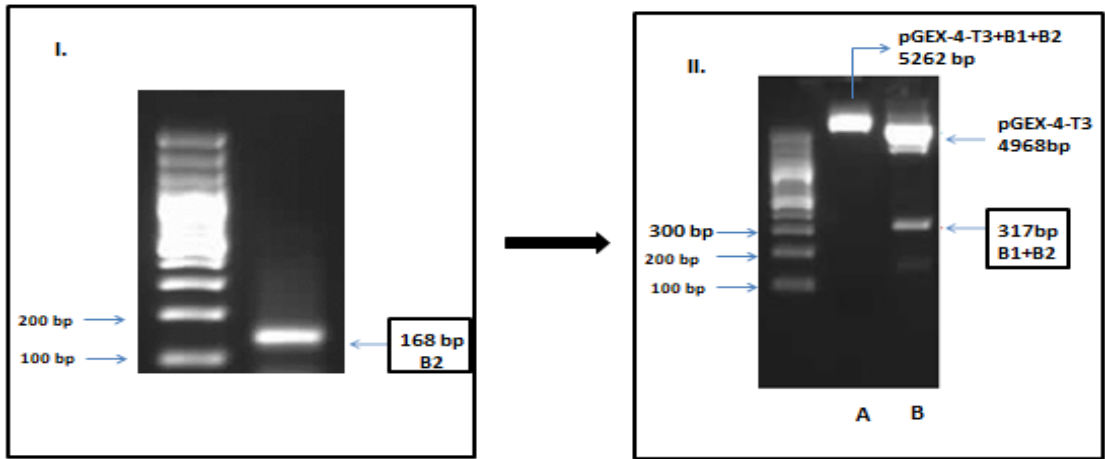


Şekil 4-I. AgB1'in PCR amplifikasyon ürünü, II-A; pGEX-4-T3 + B1 ligasyonu ürünü, II-B; *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleri ile restriksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Restriksiyon enzim kesimi ile AgB1'e ait doğru hedef gen bölgesini içerdiği gösterilen vektör, Salamanca Üniversitesi'ne sekanslanmak üzere gönderilmiştir.

Sekanslama sonucuna göre de AgB1'e ait hedef gen bölgesinin doğru pozisyonda içerdiği doğrulanan vektör ile sıralı klonlamaya devam edilmiştir.

İkinci basamak olarak, AgB2'ye ait hedef gen bölgesi PCR ile amplifiye edildikten sonra agaroz jelde yürütülmüştür. Beklenen 168 bp (Şekil 5-I) boyutundaki fragment jelden saflaştırıldıktan sonra *EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Ayrıca pGEX- 4T3+B1 vektörü de aynı enzimlerle kesilmiş, defosforile edilmiş ve jelde yürütüldükten sonra saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünlerin ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ürünü transforme edildikten sonra gelişen kolonilerden elde edilen plazmitler *EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Ligasyon ve restriksiyon ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Beklenen 5262 bp boyutundaki pGEX-4T-3+B1+B2 ligasyon ürünü ile 126 bp ve 4968 bp boyutundaki restriksiyon ürünleri görüntülenmiştir (Şekil 5-II).

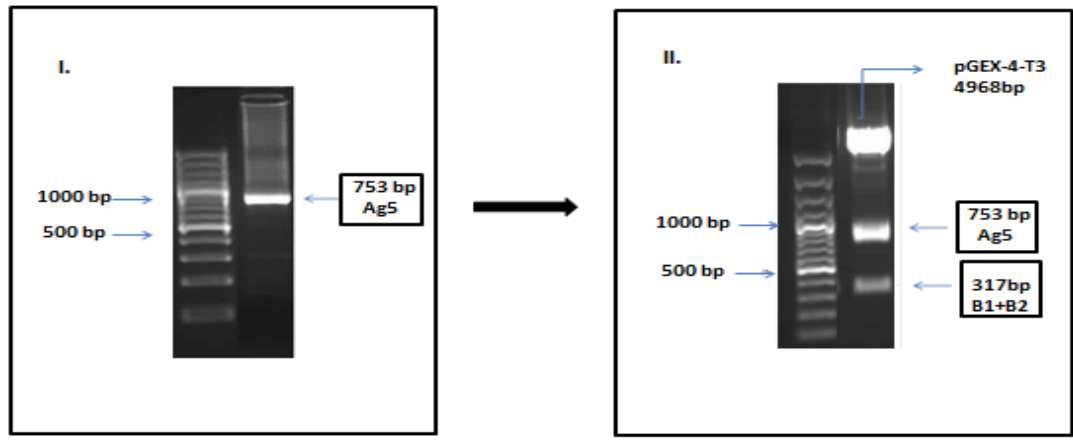


Şekil 5-I. AgB2'nin PC amplifikasyon ürünü, II-A; pGEX-4-T3 + B1+B2 ligasyon ürünü, II-B; *BamHI* ve *SalI* enzimleri ile restriksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Restriksiyon enzim kesimi ile AgB1 ve AgB2'ye ait doğru hedef gen bölgelerini içerdiği gösterilen vektör, Salamanca Üniversitesi'ne sekanslanmak üzere gönderilmiştir.

Sekanslama sonucuna göre de AgB1 ve AgB2'ye ait hedef gen bölgelerini doğru pozisyonda içerdiği doğrulanan vektör ile sıralı klonlamaya devam edilmiştir.

Son basamak olarak, Ag 5'e ait hedef gen bölgesi PCR ile amplifiye edilmiş ve agaroz jelde yürütülmüştür. Beklenen 753 bp (Şekil 6-I) boyutundaki fragment jelden saflaştırıldıktan sonra *NotI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Ayrıca pGEX-4T3+B1+B2 vektörü de aynı enzimlerle kesilmiş, defosforile edilmiş ve jelde yürütüldükten sonra saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünlerin ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ürünü transforme edildikten sonra gelişen kolonilerden elde edilen plazmitler *BamHI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve agaroz jelde yürütülmüştür. Ag5'e ait 753 bp B1+B2'e ait 317 bp ve 4968 bp boyutundaki restriksiyon ürünleri görüntülenmiştir (Şekil 6-II).



Şekil 6-I. Ag5'in PC amplifikasyon ürünü; II pGEX-4-T3 + B1+B2 +Ag5 ligasyon ürününün *BamHI* ve *NotI* enzimleri ile restriksiyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Restriksiyon enzim kesimi ile AgB1, AgB2 ve Ag5'e ait doğru hedef gen bölgelerini içerdiği gösterilen vektör, Salamanca Üniversitesi'ne sekanslanmak üzere gönderilmiştir.

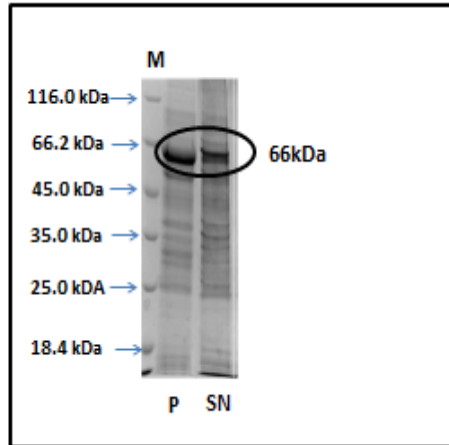
Sekanslama sonucuna göre de AgB1, AgB2 ve Ag5'e ait hedef gen bölgelerini doğru pozisyonda içerdiği doğrulanan vektör ile ekspresyon aşamasına geçilmiştir.

Klonlama işlemi sonrası elde edilen multiepitop rekombinant peptit antijeni GST etiketi de dahil 1749 bp uzunluğunda, 66.64 kDa moleküler ağırlığına sahiptir.

5.1.2. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijenin ekspresyonu ve saflaştırılması

Sekanslama sonrası AgB1, AgB2 ve Ag5'e ait hedef gen bölgelerini doğru pozisyonda içerdiği doğrulanan vektör, bölüm 3.2.1.7.'de detaylandırılan transformasyon protokolünde anlatıldığı gibi BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) ekspresyon vektörüne transforme edildikten sonra plaklara yayılmıştır. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılan plaklardan seçilen koloniler, steril pipet ucu yardımıyla 100 µg/ml ampicilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine aktarılmış ve 37°C'de çalkalayıcı etüvde gece boyu inkübe edildikten sonra her bir kültürden %50 gliserol içinde ve -80°C'de muhafaza edilmek üzere bir miktar ayrılmıştır.

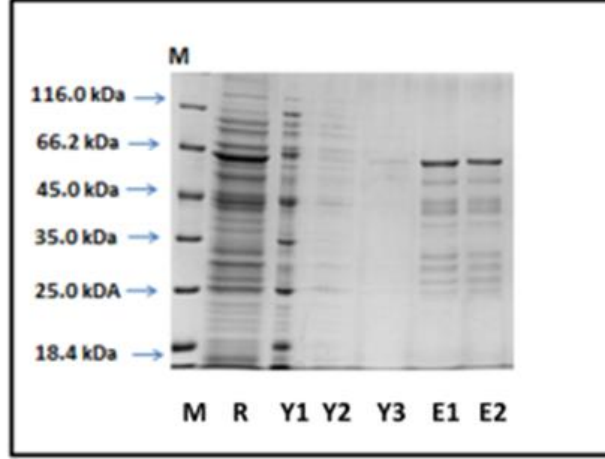
Ekspresyon işlemlerinde (Bölüm 3.3.6 detaylandırılmıştır) %50 gliserol stokta muhafaza edilen ve hedef gen bölgelerini içerdiği doğrulanan vektörün bulunduğu BL21 ekspresyon hücreleri kullanılmıştır. Multiepitop rekombinant peptit antijenin solubilitasını ve aktivitesini değerlendirmek amacıyla ekspresyon işlemleri sırasında elde edilen pelletten ve süpernatanttan örnekler alınarak SDS-PAGE ile analizi yapılmış ve hem pellette (çözünmeyen fraksiyonda) hem süpernatantta (çözünen fraksiyonda) beklenen boyutta 66 kDa'lık bant görüntülenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Multiepitop rekombinant peptit antijeninin ekspresyon ürününün SDS-PAGE ile analizi. Marker; M, Çözünmeyen (Pellet; P) , Çözünür (Süpernatant; SN)

Her örnekte de beklenen boyutta 66 kDa bant gözlenmiştir.

Multiepitop rekombinant peptit antijeninin süpernatantta da (çözünür fraksiyon) çözünür halde ekprese edildiği gösterildikten (Şekil 7) sonra bölüm 3.3.6'da detaylandırılan saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Saflaştırma protokolü uygulanırken saflaştırma aşamalarını değerlendirmek için her adımda alınan örneklerin SDS-PAGE ile analizi yapılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Multiepitop rekombinant peptit antijeninin saflaştırma ürününün SDS – PAGE ile analizi. M; Marker, R; Rezin, Y; Yıkama, E; Elüat

Saflaştırma sonrası elde edilen multiepitop rekombinant peptit antijeninin konsantrasyonu ölçülürken Bradford yöntemi kullanılmıştır. Çözünebilir halde bulunan rekombinant proteinin konsantrasyonu 0,4 µg/ml olarak ölçülmüştür.

5.2. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijenin Serolojik Tanıdaki Yerinin Değerlendirilmesi

5.2.1 Kullanılan serum paneli ve hasta özellikleri

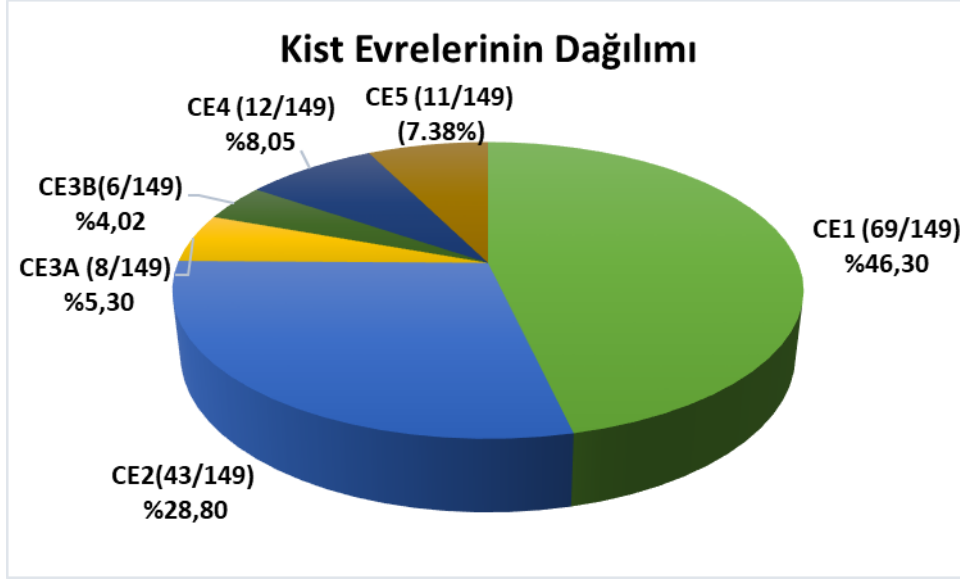
Çalışmamıza Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde opere edilen ya da PAIR işlemi uygulanan ve kist evresi bilinen 149 hasta dahil edilmiştir. Hastaların 78'i (%52,34) kadın ve 71'i (%47,65) erkek hastalardan oluşmaktadır. Hastaların en küçüğü 5, en büyüğü 85 yaşında olup enfeksiyonun en sık %24,8 ile 0-18 yaş aralığında görüldüğü tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete dağılımı

Cinsiyet			
Yaş	Kadın	Erkek	Toplam(%)
0-18	16	21	37 (%24,8)
19-28	13	6	19 (%12,75)
29-38	7	10	17 (%11,4)
39-48	6	11	17 (%11,4)
49-58	19	9	28 (%18,79)
59-68	11	11	22 (%14,7)
>68	6	3	9 (%6,04)
Toplam	78	71	149

KE hastalarının 90' ında (%61,6) tek kist görülürken 59'unda (%39,59) birden fazla kist görülmüştür. Birden fazla kist bulunan hastaların karaciğer yerleşime akciğer, dalak, böbrek, pararektal bölge ve beyin tutulumu eşlik etmiştir.

Birden fazla kisti bulunan hastalar aktif olan kistlerinin yerleşimine, büyüklüğüne ve evrelerine göre değerlendirilmiştir. Buna göre 149 hastadan 69'unun (%46,3) CE1, 43 'ünün (%28,8) CE2, 8'i (%5,3) CE3A, 6'sının (%4,02) CE3B, 12'sinin (%8,05) ve 11'inin (%7,38) CE5 evresine sahip olduğu görülmüştür (Grafik 1).



Grafik 1.Kist evrelerinin dağılımı

Hidatik kistlerin organ tutulumuna göre dağılımları incelendiğinde 135 hastada (%90,6) KC yerleşimi görülürken 14 hastada (%9,39) AC ve diğer organ tutulumları görülmüştür.

Boyutları bilinen 139 hidatik kistten 18' i (%12,08) 5 cm çapında ya da daha küçük, 74' ünün (%49,66) çapı 5 ila 10 cm arasında, 47' si (%31,54) de 10 cm çapında ya da daha büyük olarak değerlendirilmiştir. Hidatik kistlerin özellikleri Tablo 17'de özetlenmiştir.

149 KE hastasından 68' inin operasyon veya PAIR işlemi öncesi ilaç tedavisi uygulanıp uygulanmadığı bilgisine ulaşılmıştır. Bu hastalardan 52' si operasyondan önce değişik sürelerde Albendazol tedavisi alırken 16' sına herhangi antiparazitik tedavi uygulanmadığı kaydedilmiştir.

Tablo 17. Kist özellikleri

Kist özellikleri		Sayı	(%)	Toplam
Kist sayısı	1	90	%60,40	149
	>1	59	%39,59	
Kist evresi	CE1	69	%46,30	149
	CE2	43	%28,80	
	CE3A	8	%5,30	
	CE3B	6	%4,02	
	CE4	12	%8,05	
	CE5	11	%7,38	
Kist yerleşim	KC	135	%90,60	149
	Diğer	14	%9,30	
Kist çapı	50mm $\geq$	18	%12,08	149
	5mm< . <10mm	74	%49,66	
	10mm $\leq$	47	%31,54	
	Bilinmeyen	10	%6,71	

5.2.2. ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde opere edilen ya da PAIR işlemi uygulanan ve kist evresi bilinen 149 KE hastasına ait serumlar ile 70 kontrol grubuna (21 sağlıklı birey ve diğer parazitik enfeksiyonlar açısından pozitif olduğu gösterilen 49 hasta) ait serumlar *Echinococcus granulosus*'a özgü IgG antikor varlığı açısından ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. KE hasta serumları ile kontrol grubu serumlarının recDipol ve KS ile IgG ELISA sonuçları Tablo 18'de özetlenmiştir.

RecDipol ve KS antijenleri kullanılarak yapılan IgG ELISA sonucuna göre KE hastalarından 26' sı KS ile seronegatifken 32' si recDipol ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Her iki antijene karşı da seronegatif olan 11 hastanın (6 CE1 ve 5 CE2) 10'u KC yerleşimlidir.

Kontrol gruplarda ise sağlıklı bireylerden 1'i recDipol ile pozitifken KS ile tüm sağlıklı bireyler negatif olarak değerlendirilmiştir. AE hastalarının hepsi KS ile seropozitif iken recDipol ile negatif bulunmuştur.

Tablo 18. RecDipol ve KS antijenleri ile IgG ELISA sonucu pozitif ve negatif (+/-) hasta sayısı

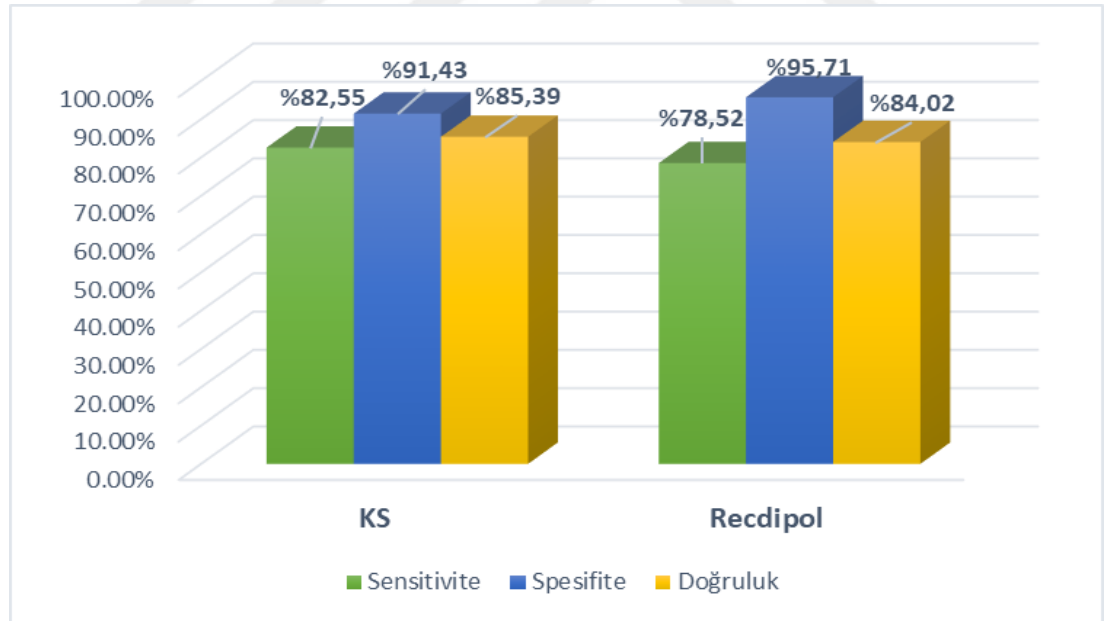
Serum (örnek sayısı)	KS (+/-)	RecDipol (+/-)
Kistik echinococcosis (149)	123/26	117/32
Kontrol grubu		
Sağlıklı bireyler (21)	0/21	1/20
Diğer parazitik enfeksiyonlar (49)		
Alveolar echinococcosis (4)	4/0	0/4
Fasciolosis (5)	0/5	0/5
Taeniasis (10)	1/9	1/9
Toxocariasis (10)	0/10	1/9
Trichinosis (6)	0/6	0/6
Hymenolepiasis (1)	0/1	0/1
Leishmaniasis (3)	1/2	0/3
Toxoplasmosis (3)	0/3	0/3
Giardiasis (2)	0/2	0/2
Mix enfeksiyon (5)	0/5	0/5

Recdipol ve KS antijenlerinin ELISA testindeki tanı değerlerinin araştırılması için her bir antijenin sensitivite, spesifite, doğruluk, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değerleri %95 Güven Aralığında (GA) hesaplanmıştır. KS antijeninin sensitivitesinin (%82,5) recDipol'den (%78,52) yüksek olduğu görülmüştür. KS ve recDipolun spesifite değerleri sırayla %91,43 ve %95,71 olarak hesaplanmıştır. RecDipol ve KS antijenlerinin ELISA testindeki tanı değerlerini araştırmak için incelenen parametreler Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. ELISA testindeki RecDipol ve KS antijenlerinin tanı değerinin parametreleri

İstatistik	KS		RecDipol	
	Sonuç	%95 GA	Sonuç	%95 GA
Sensitivite	%82,55	%75,49 - %88,27	%78,52	%71,06 - %84,82
Spesifisite	%91,43	%82,27 - %96,79	%95,71	%87,98 - %99,11
Pozitif Prediktif Değer	%95,35	%90,48 - %97,79	%97,5	%92,78 - %99,16
Negatif Prediktif Değer	%71,11	%63,28 - %77,86	%67,68	%60,54 - %74,08
Doğruluk	%85,39	%80 - %89,79	%84,02	%78,48 - %88,61
Pozitif Olabilirlik Oranı	9,63	4,46 - 20,77	18,32	6,04 - 55,6
Negatif Olabilirlik Oranı	0,19	0,13 - 0,27	0,22	0,16 - 0,3

KS ve recDipol antijenlerinin sensitivite, spesifite ve doğruluk oranlarının karşılaştırılması Grafik 2’de verilmiştir.



Grafik 2. RecDipol ve KS antijenlerinin sensitivite, spesifite ve doğruluk oranlarının karşılaştırılması

5.2.2.1. Klinik özelliklerin KS ve recDipol'un tanı değerine etkisi

Hidatik kistlerin sayısı, yerleşim yeri, büyüklüğü ve kist evresi gibi özelliklerinin KS ve recDipol antijenlerinin tanı değerleri üzerindeki etkisi ELISA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. KE hastaları tek ve birden fazla kisti bulunanlar olmak üzere gruplandırılmıştır. Birden fazla kisti bulunan hastalar ise aktif olan kistlerinin yerleşim yerine ve büyüklüğüne göre değerlendirilmiştir. Tablo 20'de gösterildiği gibi birden fazla kisti bulunan hastaların tek kiste sahip olanlara oranla daha yüksek seropozitiviteye sahip olduğu görülmüştür. Tek ve birden fazla kiste sahip olanlar sırayla KS'na karşı sensitivitesi %77,7 ve %89,8 iken recDipol'e karşı %72,2 ve %88,1 olarak kaydedilmiştir. Hem KS hem de recDipol antijenininde kist sayısı birden fazla olduğu durumda sensitivitede artış olduğu görülmüştür. Her iki antijenle de sensitivite ve kist sayısı arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür. (KS ve recDipol sırayla **P= 0.029 ve P= 0.01**).

Hidatik kistlerin organ tutulumu KC ve diğerleri olarak gruplandırılmış olup KS karşı KC ve KC dışı yerleşim gösteren hastalarda seropozitiflik açısından oransal olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. KC ve KC dışı yerleşim gösteren hastaların KS'e karşı sensitivitesi sırayla %82,2 ve %85,7 iken recDipol'e karşı sırayla %79,2 ve %71,4 olarak bulunmuştur.

Kistin boyutları ve pozitif örnek sayısı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde her iki antijende de kist büyüklüğü ile sensitivite arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (KS ve recDipol sırayla $P= 0.151$ ve $P= 0.489$). Her iki antijenin kistin boyutlarına göre sensitivite oranları Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. KS ve recDipol antijenlerinin sensitiviteilerinin kistin sayısı, yerleşim yeri ve büyüklüğüne göre dağılımı

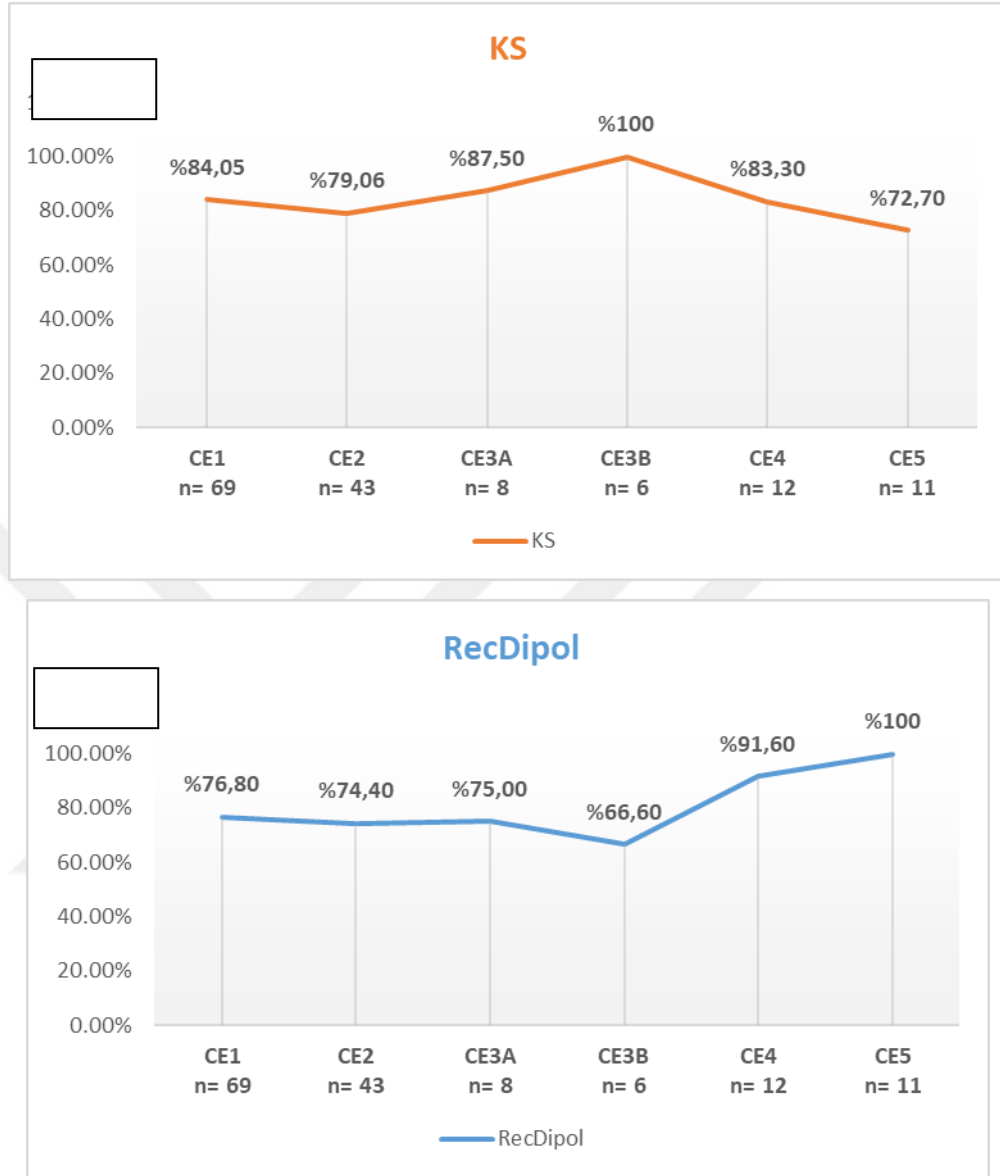
Antijen	Kist sayısı +/Total (%)			Kist yerleşimi +/Total (%)			Kist büyüklüğü +/Total (%)			
	1	>1	p	KC	Diğer	p	50mm≥	5mm< . <10mm	10mm ≤	p
KS	70/90 (%77,7)	53/59 (%89,8)	0.029	111/135 (%82,2)	12/14 (%85,7)	0.373	15/18 (%83,3)	62/74 (%83,7)	39/47 (%82,9)	0.151
RecDipol	65/90 (%72,2)	52/59 (%88,1)	0,01	107/135 (%79,2)	10/14 (%71,4)	0.250	14/18 (%77,7)	59/74 (%79,7)	36/47 (%76,5)	0.489

KS ve recDipol antijenlerinin sensitiviteilerinin farklı kist evrelerine göre dağılımı Tablo 21’de verilmiştir. Genel olarak iki antijenin kist evresine göre sensitiviteileri karşılaştırıldığında tüm aktif (CE1,CE2) ve geçiş (CE3A, CE3B) evrelerinde KS’nın, daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu görülmüştür. Akif olmayan (CE4 ve CE5) kist evrelerinde ise recDipol oldukça yüksek sensitivite göstermiştir (KS ve recDipol sırayla %78,2 ve %95,65). recDipol ile kist evreleri arasında ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur (**P= 0.041**).

Tablo 21. KS ve recDipol antijenlerinin sensitiviteilerinin farklı kist evrelerine göre dağılımı

Antijen	Kist evresi +/Total (%)						p
	CE1	CE2	CE3A	CE3B	CE4	CE5	
KS	58 /69 (%84,05)	34/43 (%79,06)	7/8 (%87,5)	6/6 (%100)	10/12 (%83,3)	8/11 (%72,7)	0.383
RecDipol	53/69 (%76,8)	32/43 (%74,4)	6/8 (%75)	4/6 (%66,6)	11/12 (%91,6)	11/11 (%100)	0.041

KS ve recDipol antijenlerinin kist evrelerine göre sensitivite oranları Grafik 3’de gösterilmiştir.



Grafik 3.KS ve recDipol antijenlerinin sensitivite oranlarının kist evrelerine göre oranları

68 hastanın operasyondan önce ilaç kullanıp kullanmadığı bilgisine ulaşılmıştır. Operasyondan önce değişik sürelerde Albendazol tedavisi aldığı bilinen 52 hastanın 46’sı (%88,4) KS ile pozitif tespit edilirken, 39’u (%75) recDipol ile pozitif bulunmuştur. Operasyondan önce herhangi bir antiparazitik tedavi uygulanmayan 16 hastanın tamamının (%100) recDipol ile 8’inin (%80) ise KS ile seropozitifliği gösterilmiştir. Medikal tedavinin KS’nın sensitivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur. (KS ve recDipol sırayla $P=0.049$ ve $P = 0.211$).

5.3. Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin KE’li hastaların takibindeki yerinin değerlendirilmesi

5.3.1 Kullanılan serum paneli ve hasta özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen takip hastaların ilk kanları operasyon sırasında alınmış olup 3. Ay, 6. Ay, 12. Ay ve takibinde 6’şar aylık periyotlarla takip kanı alınması ve paralelinde Girişimsel Radyoloji bölümünde USG ile nüks açısından değerlendirilmesi planlanmıştır. Ancak hastaların şehir dışında yaşamaları, başka bölümlerle olan randevu tarihine göre plan yapmaları gibi özel nedenler ve tez süresinin kısıtlı olması nedeniyle takip süreleri değişkenlik göstermiştir. Ayrıca şehir dışında yaşayan bazı hastalar US takibini dış merkezde yaptırmıştır. Toplam 28 hastaya ait 138 kan takip açısından ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Takip süresinin tez süresince yapılabilmesinden dolayı önerilen sürede yapılamamıştır. Bu nedenle hastalar iyileşen iyileşmeyen diye gruplandırılmamıştır. Hasta sayısı ve takip süreleri Tablo 22’de özetlenmiştir.

Tablo 22. Hasta sayısı ve takip süreleri

Takip süresi	0-6 ay	7-12 ay	13-18ay	19-24 ay	25-36 ay
Hasta sayısı	1	4	1	4	18

Nüks açısından takibi yapılan 28 hastanın 12'si (%48,85) erkek 16'sı (%57,14) kadın hastadır. Hastaların 15' inde (%53,57) tek kist görülürken 13' ünde (%46,42) birden fazla kist bulunduğu gösterilmiştir. Birden fazla kist bulunan hastaların karaciğer yerleşimine akciğer tutulumu eşlik etmiştir.

Birden fazla kisti bulunan hastalar en aktif kistlerinin yerleşimine, büyüklüğüne göre değerlendirilmiştir. Buna göre 28 hastadan 18'i (%64,2) CE1, 8'i (%28,57) CE2, 1'i (%3,57) CE3A, 1'i (%3,57) evresine sahip olduğu kaydedilmiştir.

Hidatik kistlerin organ tutulumuna göre dağılımları incelendiğinde 22 hastada (%78,57) KC yerleşimi görülürken 6 hastada (%21,42) AC ve diğer organ tutulumları görülmüştür.

Boyutları bilinen 26 hidatik kistten 2' si (%7,69) 5 cm çapında ya da daha küçük, 12' sinin (%46,15) çapı 5 ila 10 cm arasında, 12' sinin (%46,15) de 10 cm çapında ya da daha büyük olarak değerlendirilmiştir.

Takibi yapılan 28 hastadan 2'sinin operasyondan önce ve sonra Albendazol tedavisi görüp görmediği bilgisine ulaşılammıştır. Operasyondan önce 10 hastanın (%38,46) herhangi bir antiparazitik tedavi almadığı, 16'sının (%61,53) ise değişik sürelerde Albendazol kullandığı kaydedilmiştir. Operasyondan sonra ise 4 hastanın (%15,38) Andazol tedavisi almadığı, kalan 22 hastanın (%84,6) ise değişik sürelerde tedavi aldığı görülmüştür.

5.3.2. ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi

28 takip hastasının operasyon anında alınan kanlarının IgG ELISA sonuçları değerlendirildiğinde KS anijeni ile 4 (%14,28) hastanın seronegatif olduğu, bunlardan 3'ünün ise 3. ayda seropozitif döndüğü görülmüştür. Çoklu AC yerleşimi olan bir hasta ise tüm takip boyunca KS ile seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Bu açıdan recDipol değerlendirildiğinde 9 hastanın operasyon anında alınan kanlarının seronegatif olduğu bunlardan 3' sinin takip eden aylarda seropozitif döndüğü kaydedilmiştir.

RecDipole ile tüm takip boyunca negatif olan 6 hastanın 3'ünde AC yerleşimi görülürken diğer 3'ünde KC yerleşimi görülmüştür.

Tüm takip boyunca KS ve recDipole karşı seronegatif olan hastaların klinik özellikleri Tablo 23'de özetlenmiştir. Çoklu kiste sahip hastalar aktif olan kistlerinin büyüklüğüne ve yerleşim yerine göre değerlendirilmiştir.

Tablo 23. Tüm takip boyunca KS ve recDipole karşı seronegatif olan hastaların klinik özellikleri

Seronegatif hasta sayısı	Kist sayısı	Kist yerleşimi	Kist büyüklüğü	Kist Evresi	O. Ö. ilaç kullanımı	O.S. ilaç kullanımı
KS(1)	2	AC	O	CE1	yok	2 ay
recDipol (6)	1	AC	O	CE1	yok	1 ay
	1	AC	B	CE2	10 gün	1 yıl
	2	AC	O	CE1	1 hafta	hala
	1	KC	B	CE1	yok	1 ay
	1	KC	-	CE2	6 ay	yok
	2	KC	B	CE2	yok	6 ay

50 mm $\geq$ / Küçük (K)

50 mm< . <100 mm/ Orta (O)

100 mm $\leq$ / Büyük (B)

O.Ö Operasyondan önce

O.S. : Operasyondan sonra

ELISA sonuçlarına göre operasyondan önce ve sonra ilaç kullanmanın hastaların SI değerleri üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Operasyondan önce ilaç kullanmayan 10 hastadan 3'ünün ilk kanı KS antijeni ile seronegatifken (2'si takip eden aylarda seropozitif), 4 'ünün de recDipol ile seronegatif (1' inin takip eden aylarda seropozitif) olduğu görülmüştür.

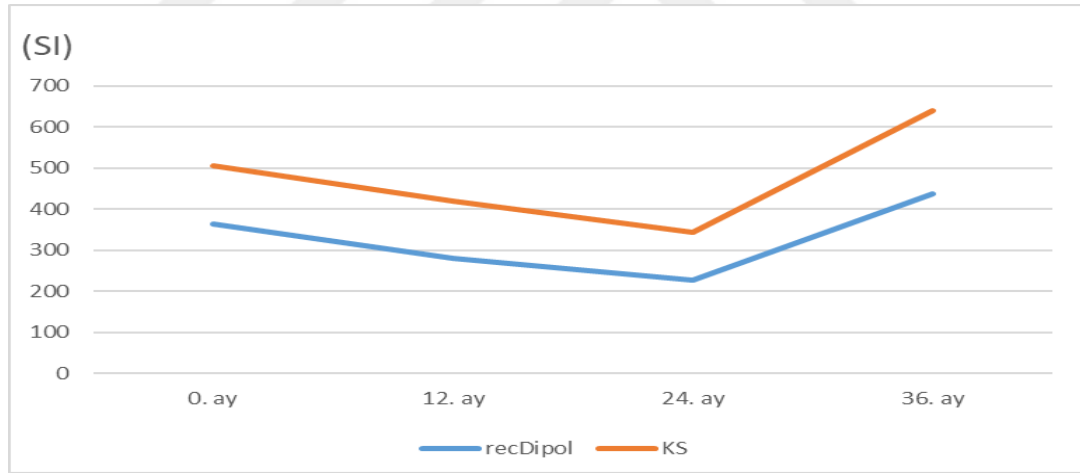
Operasyondan sonra ilaç kullanmayan 4 hasta bulunmaktadır. Bu hastalardan 1' i KC enzimlerinde yaşadığı sorundan dolayı operasyondan önce de Albendazol tedavisi alamamıştır. Bu hasta tüm takip boyunca hem KS hem recDipol ile seropozitif olup SI değerinin kademeli olarak azaldığı gösterilmiştir.

Operasyondan sonra ilaç kullanmayan diğer 3 hastadan 2'si iki antijen ile de takip boyunca seropozitifken SI değerlerinde de azalma görülmemiştir. Kalan 1 hasta ise KS ile SI değeri artarak seropozitiflik gösterirken, recDipol ile tüm takip boyunca seronegatifdir.

Operasyondan sonra değişen sürelerde medikal tedavi uygulanan ve takibi yapılan 22 hastanın seropozitiflik durumu değişkenlik göstermiştir. Bu hasta grubunda 1’i tüm takip boyunca KS antijenine karşı seronegatifken, 4’ i takip sonunda seronegatif, 17’ i de seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Medikal tedavi alan hastalardan 5’i recDipol ile tüm takip boyunca seronegatifken, 5’ sı takip sonunda seronegatif, 12’ ü de seropozitif olarak tespit edilmiştir.

Takip boyunca seropozitif olan hastaların (biri hariç) SI değerleri takip boyunca ya yakın değerlerde seyretmiş ya da kademeli azalmıştır.

3 yıl takibi yapılan ve operayondan sonra 6 ay Albendazol tedavisi uygulanan bir hastanın son kontrol kanının her iki antijen ile SI değerinde artış görölmüştür. Hasta USG kontrolünü dış merkezde yaptırdığını ve son bir yıldır USG kontrolüne gitmediğini beyan etmiştir. Bu hastanın 3 yıl kan takibi yapılmış olup her iki antijen ile SI değeri şekil Grafik 4’de verilmiştir.



Grafik 4. Takip sonunda Serolojik Indeks (SI) değeri yükselen hastanın aylara göre SI değerinin dağılımı

28 takip hastasından 16’sının (%57,17) KS ile 15’ inin de (%53,57) recDipol ile 3 ve/veya 6. aylarda SI değerlerinde artış görölmüştür.

Tüm takip boyunca seronegatif olan hastalar dışında 5 (%17,85) hasta KS ile 6 (%21,42) hasta ise recDipol ile takip sonunda seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Bu hastalardan ikisi her iki antijen ile takip sonunda seronegatifdir.

Takip sonunda seropozitif olan hasta sayısı KS’nda 22 (%78,57) iken recDipol ile 16 (%57,17) olarak kaydedilmiştir. 15 hasta her iki antijenle de takip sonunda seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu hastaların hepsinin aktif kist yerleşimi KC olup 10’ unda çoklu kist bulunmaktadır. Takip süresi sonunda hastaların seropozitivite durumu tablo 24’de özetlenmiştir.

Tablo 24. Takip süresi sonunda hastaların seropozitivite durumu

Seropozitivite durumu	KS (sayı/%)	recDipol (sayı/%)
Tüm takip boyunca seronegatif hasta sayısı	1 (%3,57)	6 (%21,42)
Takip sonunda seronegatif olan hasta sayısı	5 (%17,85)	6 (%21,42)
Takip sonunda seropozitif olan hasta sayısı	22 (%78,57)	16 (%57,14)
Toplam	28	28

Ayrıca takip süresince kontrol kanı alınan 25 hastanın girişimsel radyoloji bölümünde USG ile takibi yapılmıştır (2 hasta USG takibini dış merkezde yaptırdığını beyan etmiş, bir hasta ise takibi yarıda bıraktığı için bilgi alınamamıştır). 25 hastanın USG kontrollerinde operasyon yerinde ya da yeni bölgede yeni bir kist varlığı görülmezken işlem uygulanan kistler solifiye ya da kalsifiye olmuştur.

5.4. Kist Materyallerinin Moleküler Karakterizasyon Bulguları

5.4.1. İncelenen hastaların Genel Özellikleri

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Kasım 2016-Ağustos 2019 yılları arasından opere edilen veya PAIR işlemi uygulanan ve kist sıvısında protoskoleks tespit edilen 23 hasta dahil edilmiştir.

Hastaların 15'si (%65,2) kadın ve 8'si (%34,78) erkektir. Yaşa göre dağılımları incelendiğinde en küçüğü 5 ve en büyüğü 85 yaşında olup en sık %34,78 oranıyla 0-17 yaş grubu arasında olduğu gösterilmiştir. Hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 25'de verilmiştir.

Hastaların yaşadıkları şehir İzmir (9 hasta), Manisa (7 hasta), Aydın (2 hasta), Balıkesir (2 hasta), Uşak (1 hasta), Kütahya (1 hasta) ve Ağrı (1 hasta) olarak kaydedilmiştir.

Tablo 25. Hastaların yaş gruplarına ve cinsiyete dağılımı

Cinsiyet			
Yaş	Kadın	Erkek	Toplam
0-17	4	4	8
18-29	4	1	5
28-39	2	-	2
38-49	1	3	4
48-59	3	-	3
58-69	-	-	-
>69	1	-	1
Toplam	15	8	23

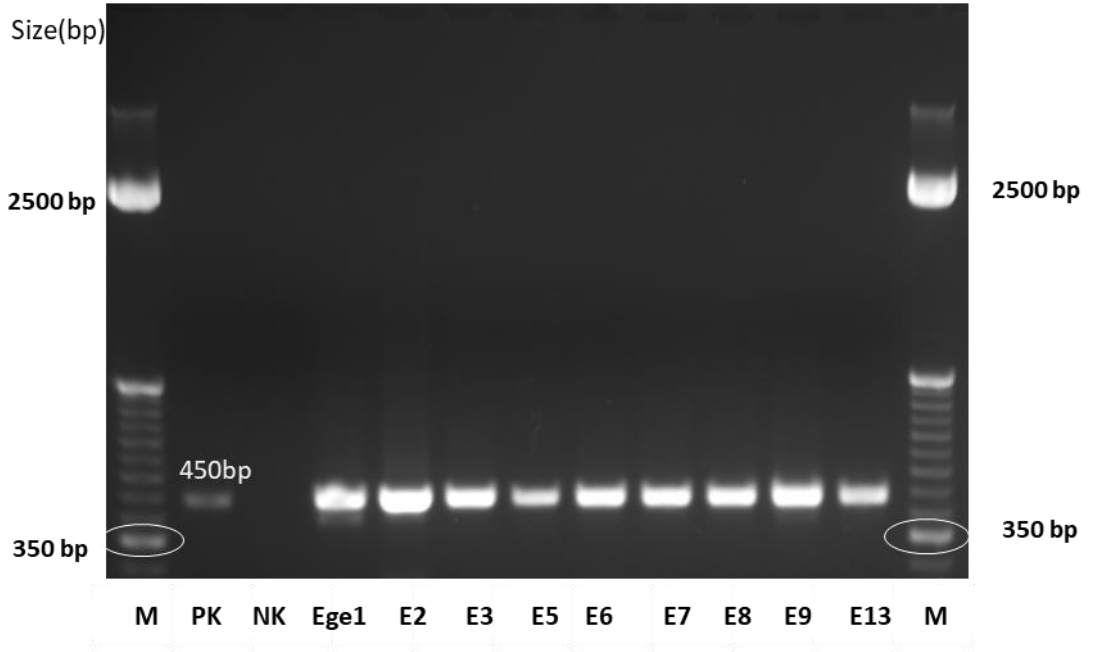
23 hastanın 14'ünde (%60,8) tek kist, 9'unda (%39,19) birden fazla kist bulunduğu gösterilmiştir. Birden fazla kisti bulunan hastalar aktif kistlerinin büyüklüklerine ve yerleşim yerine göre değerlendirilmiştir. Hidatik kistlerin organ tutulumuna göre dağılımları sırayla 21'i (%91,3) KC, 2'i (%8,69) diğ er organ tutulumu (AC+pararektal bölge) olarak kaydedilmiştir.

Hidatik kistlerin 15' i (%65,2) CE1, 6' sı (%26) CE2, 1' i (%4,34) CE3A ve 1' i (%4,34) CE4 kist evresi olduğu gösterilmiştir.

Boyutları bilinen 18 hidatik kistten 2' si (%11,1) 5 cm çapında ya da daha küçük, 7' si (%38,8) 5 ila 10 cm çapında, 9'u (%50) da 10 cm çapında ya da daha büyük olarak değerlendirilmiştir.

5.4.2. PCR bulguları

Çalışmaya dahil edilen toplam 23 örnekten 20'sinde PCR ile hedeflenen boyutta yaklaşık 450 bp'lik bant agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 9).



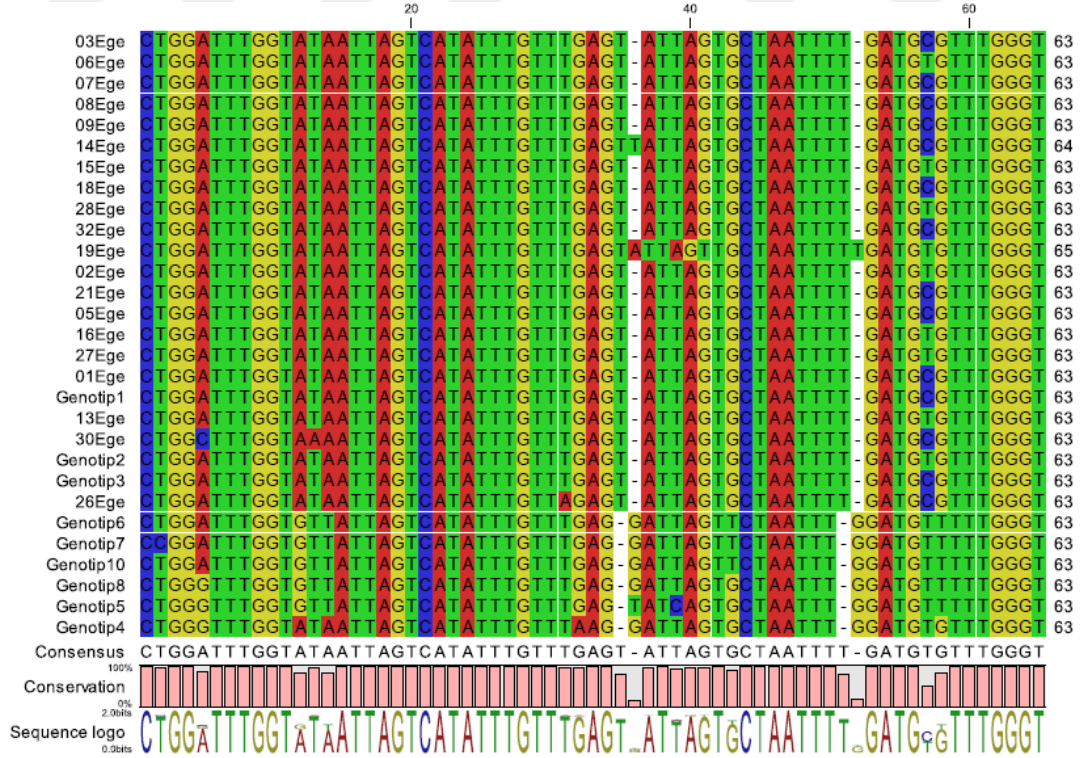
Şekil 9. Pozitif örneklerin bir kısmının jel görüntüsü (M: Marker, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

5.4.3. Dizi Analizi Sonuçları

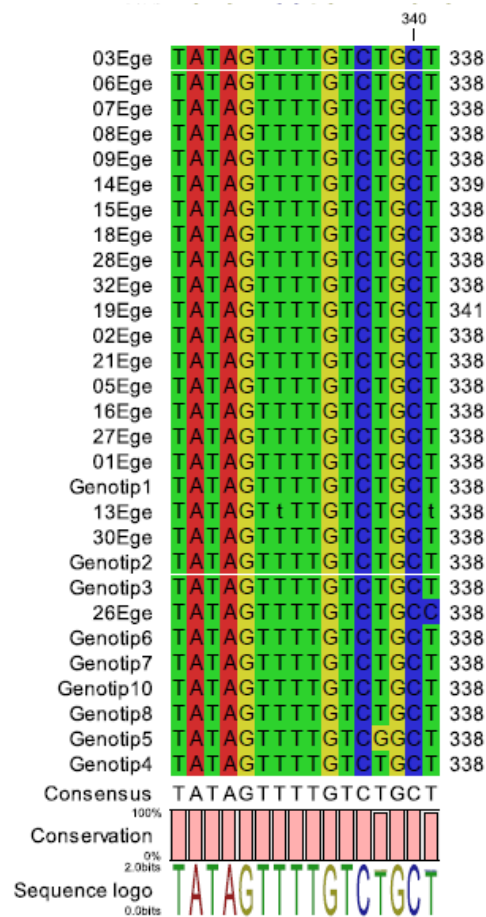
Agaroz jelde hedeflenen boyutta gen amplifikasyonunun olduğu gösterilen 20 örneğin dizi analizi yapılmıştır. Bu örneklerle ait sekans sonuçları ile referans dizilerinin sıralama sonuçları Şekil 10'da verilmiştir. Ayrıca sıralama sonuçları Pairwise Comparison yöntemi kullanılarak da değerlendirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak oluşturulan tabloya göre örneklerin % 80'inin (Ege 3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 27, 28, 30, 32) G1 genotipiyle, %5'inin (Ege2) G2 genotipiyle, %10'unun (Ege 21, 26) G3 genotipiyle en fazla uyumu gösterdiği, %5'inin (Ege1) ise G1-G3 genotipleri ile aynı oranda benzer bulunduğu gösterilmiştir (Tablo 26).

Ege 03 ,05 ,07, 08, 09, 14, 18, 32 numaralı örnekler G1 genotipinin referans suşuyla, Ege 21 numaralı örnek ise G3 genotipinin referans dizisiyle %100 uyumlu bulunmuştur. Kalan örneklerde bulunan nükleotit değişiklikleri Tablo 27'de gösterilmiştir. Örneklerin Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak yapılan filogenetik analiziyle elde edilen ağacın görünümü Şekil 11'de verilmiştir.

Şekil 10. 20 örneğe ait sekans sonuçları ile referans dizilerinin sıralama sonuçları

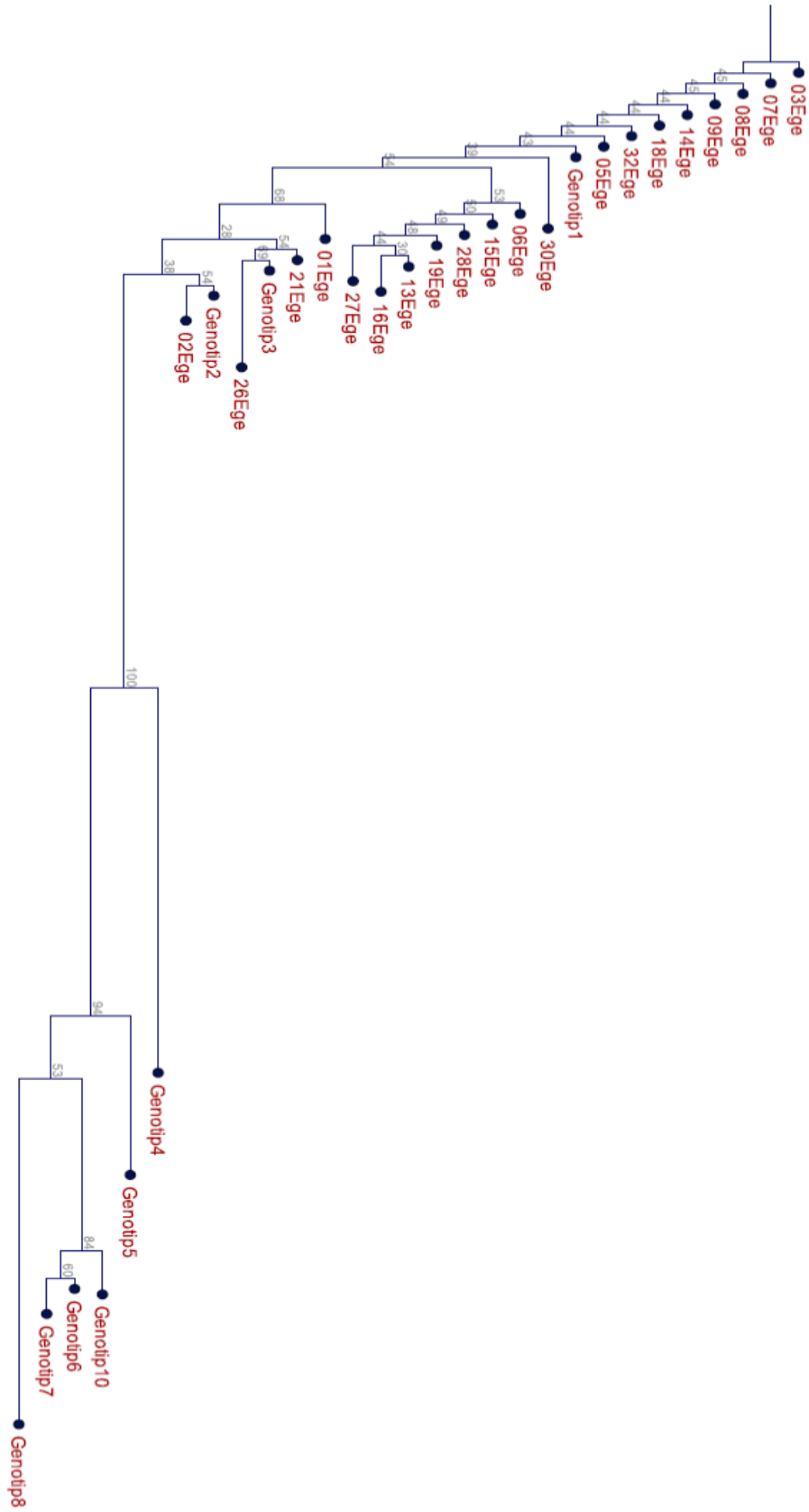






03Eyle	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
06Eyle	2	99,66	296	297	297	297	297	296	297	296	297	296	297	296	297	295	295	295	296	296	292	295	297	294	295	274	273	271	270
07Eyle	3	100,00	99,66		297	297	297	296	297	296	297	296	297	296	297	295	295	295	296	292	295	297	294	295	274	273	271	270	
08Eyle	4	100,00	99,66	100,00		297	297	296	297	296	297	296	297	296	297	295	295	295	296	292	295	297	294	295	274	273	271	270	
09Eyle	5	100,00	99,66	100,00			297	296	297	296	297	296	297	296	297	295	295	295	296	292	295	297	294	295	274	273	271	270	
14Eyle	6	100,00	99,66	100,00	100,00			296	297	296	297	296	297	296	297	295	295	295	296	292	295	297	294	295	274	273	271	270	
15Eyle	7	99,66	100,00	99,66	99,66	99,66		296	297	296	297	296	297	294	294	296	296	294	297	291	294	296	295	294	275	274	272	271	
18Eyle	8	100,00	99,66	100,00	100,00	100,00	99,66		99,66		296	297	294	295	297	295	295	294	297	291	294	296	295	294	295	274	273	271	
28Eyle	9	99,66	100,00	99,66	99,66	99,66	100,00	99,66		99,66	100,00	99,66		296	297	295	295	294	297	291	294	296	295	294	275	274	272	271	
32Eyle	10	100,00	99,66	100,00	100,00	100,00	100,00	99,66	100,00	99,66		296	293	295	297	295	295	294	297	292	295	297	294	295	274	273	271	270	
19Eyle	11	99,66	100,00	99,66	99,66	99,66	99,66	100,00	99,66		99,66		294	294	296	296	296	294	297	291	294	296	295	294	275	274	272	271	
02Eyle	12	98,65	98,99	98,65	98,65	98,65	98,65	98,99	98,65	98,99	98,65	98,99		295	293	293	293	293	294	292	291	293	295	295	275	274	273	272	
21Eyle	13	99,33	98,99	99,33	99,33	99,33	98,99	98,99	98,33	98,99	99,33	98,99	98,33		295	293	293	293	294	294	293	295	296	297	275	274	273	272	
05Eyle	14	100,00	99,66	100,00	100,00	100,00	99,66	100,00	100,00	99,66	100,00	99,66	98,65	98,65	99,33	295	295	295	296	292	295	297	294	295	274	273	271	270	
16Eyle	15	99,33	99,66	99,33	99,33	99,33	99,66	99,33	99,66	99,33	99,66	99,33	98,65	98,65	99,33	295	295	295	296	290	293	295	294	293	274	273	271	270	
27Eyle	16	99,33	99,66	99,33	99,33	99,33	99,66	99,33	99,66	99,33	99,66	99,33	98,65	98,65	99,33	99,33		295	296	290	293	295	294	293	274	273	271	270	
01Eyle	17	99,33	98,99	99,33	99,33	99,33	98,99	99,33	99,33	98,99	99,33	98,99	98,65	99,33	99,33	98,65	98,65		294	292	293	295	294	295	276	275	273	272	
13Eyle	18	99,66	100,00	99,66	99,66	99,66	100,00	99,66	100,00	99,66	100,00	98,99	98,99	98,99	99,66	99,66	99,66	98,99		291	294	296	295	294	295	276	275	273	
26Eyle	19	98,32	97,98	98,32	98,32	98,32	97,98	98,32	97,98	98,32	97,98	98,32	97,98	98,32	98,32	97,64	97,64	98,32	97,98		290	292	293	294	295	276	275	273	
30Eyle	20	99,33	98,99	99,33	99,33	99,33	98,99	98,99	98,33	98,99	99,33	98,99	97,98	98,65	99,33	98,65	98,65	98,99	97,64	97,64		295	292	293	273	272	270	268	
GenoP1	21	100,00	99,66	100,00	100,00	100,00	99,66	100,00	99,66	100,00	99,66	99,66	98,65	99,33	100,00	99,33	99,33	99,33	99,66	98,32	99,33		294	295	274	273	271	270	
GenoP2	22	98,99	98,33	98,99	98,99	98,99	98,99	98,99	98,99	98,33	98,99	98,99	98,65	98,65	98,99	98,99	98,99	98,99	98,99	98,65	98,32	98,99		296	276	275	274	273	
GenoP3	23	99,33	98,99	99,33	99,33	99,33	98,99	98,99	99,33	98,99	99,33	98,99	98,65	98,65	98,33	98,65	98,65	99,33	98,99	98,65	98,32	98,99		275	274	273	272	271	
GenoP4	24	92,26	92,59	92,26	92,26	92,26	92,59	92,26	92,59	92,26	92,59	92,26	92,59	92,26	92,26	92,26	92,26	92,26	92,59	91,58	91,92	92,26	92,59		275	274	273	272	
GenoP5	25	91,92	92,26	91,92	91,92	91,92	91,92	92,26	91,92	92,26	91,92	92,26	92,26	92,26	91,92	91,92	91,92	91,92	92,26	91,25	91,58	91,92	92,59	92,26		96,30	295	296	
GenoP6	26	91,25	91,58	91,25	91,25	91,25	91,58	91,25	91,58	91,25	91,58	91,25	91,58	91,25	91,25	91,25	91,25	91,25	90,91	90,57	90,91	91,25	91,58	91,92	91,25		99,66	296	
GenoP7	27	90,91	91,25	90,91	90,91	90,91	90,91	91,25	90,91	91,25	90,91	91,25	91,58	91,58	90,91	90,91	90,91	90,91	90,57	90,24	90,91	91,25	91,58	91,92	91,25		99,66	296	
GenoP8	28	89,56	89,90	89,56	89,56	89,56	89,90	89,56	89,90	89,56	89,90	89,56	89,90	89,90	89,56	89,56	89,56	90,24	89,90	88,99	89,23	89,56	90,24	89,90	91,92	91,58	94,95	95,62	
GenoP10	29	91,25	91,58	91,25	91,25	91,25	91,58	91,25	91,58	91,25	91,58	91,25	91,92	91,92	91,25	91,25	91,25	91,25	90,91	90,57	91,25	92,26	91,92	92,26	92,26	96,63	90,33	98,09	

Tablo 26. Pairwise Comparison yöntemi tablosu



Şekil 11. Örneklerin filogenetik analiziyle elde edilen ağacın görünümü

Tablo 27. Örneklere ait sekans dizilerinin Genbank'ta bulunan referans diziler ile sıralama sonucunda bulunan nükleotit değişiklikleri

İzolat/Genbank no.	Nükleotit pozisyonu															
	5	31	57	67	76	86	113	152	224	244	259	301	308	310	317	341
G1 genotip (U50464)	A		C	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	A	.
Ege 03,05,07,08,09,14,18,32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ege 06,13,15,19,28	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ege 16	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G	.
Ege 27	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
Ege30	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G2 genotip (M84662)	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ege 02	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G3 genotip (M84663)	.	T	.	.	T	.	.	T	.	.	.	T	.	T	.	T
Ege 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ege 26	.	A	.	.	A	.	.	A	.	.	.	A	.	A	.	C
G1/G3	.	.	.	C/T	.	.	C/C	.	.	.	T/C	.	G/G	.	.	.
Ege 01	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	T	.	A	.	.	.

5.4.4. Hastaların Demografik ve Klinik Özelliklerinin Kistin Genotipiyle İlişkilendirilmesi

Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile kistlerin genotipi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Kistin genotipi ile cinsiyet arasındaki ilişki incelendiğinde G1 genotipinin ağırlıklı olarak kadın hastalardan (11/16, %68,7) oluştuğu kaydedilmiştir. Ayrıca genotip analizi yapılabilen çocuk hastalarda (4/5, %80) baskın olarak G1 genotipi görülmüştür. Genotip analizi yapılabilen 20 hastanın demografik özellikleri Tablo 28’de verilmiştir.

Tablo 28. Demografik özelliklerin genotipik çeşitliliğe göre dağılımı

Demografik özellikler		Genotipik çeşitlilik				
		G1	G2	G3	G1/G3	Toplam
Yaş	<18	4			1	5
	≥18	12	1	2		15
Cinsiyet	Kadın	11	1	1	1	14
	Erkek	5		1		6
İller	İzmir	4	1	2		7
	Manisa	7				7
	Aydın	2				2
	Balıkesir	2				2
	Uşak				1	1
	Kütahya	1				1

Kist sayısı ile genotip arasındaki ilişki değerlendirildiğinde hem tekli hem de çoklu yerleşim gösteren kistlerin sıklıkla G1 genotipinde olduğu görülmüştür. Birden fazla kisti bulunan hastalar aktif olan kist evrelerine göre sınıflandırılmış ve kist evresi ile genetik çeşitlilik arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Tüm genotipik gruplarda hidatik kistlerin ağırlıklı olarak CE1 evresinde olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca tüm genotip çeşitlerinde baskın olarak karaciğer yerleşimi görülmüştür. Kist büyüklüğü bilinen 11 hasta kist çapı ve genotipik çeşitlilik arasındaki ilişki açısından incelenmiştir. Birden fazla kisti bulunan hastalar, aktif olan kistlerinin büyüklüğüne göre değerlendirilmiştir. G1 genotipinde olan hastaların 7’ sinin kist büyüklüğü bilinmektedir. Bu hastalardan 3’ ünün kist çapı 5 ile 10 cm arasında iken 3’ ünün de 10 cm ya da daha büyük çapta olduğu kaydedilmiştir.

Kist sayısı, kistin evresi, büyüklüğü ve yerleşiminin genotipik özelliğe göre dağılımı Tablo 29’da verilmiştir.

Tablo 29. Kist özelliklerinin genotipik çeşitliliğe göre dağılımı

Kist özellikleri		Genotipik çeşitlilik				
		G1	G2	G3	G1/G3	Toplam
Kist sayısı	1	9	1	2		12
	>1	7			1	8
Kist evresi	CE1	12			1	13
	CE2	2	1	2		5
	CE3A	1				1
	CE4	1				1
Kist Yerleşimi	KC	16	1	1	1	19
	Diğer			1		1
Kist çapı	50 mm $\geq$	1				2
	50 mm < . <100 mm	3		2		5
	100 mm $\leq$	3	1			4

Çalışmamızda ağırlıklı olarak G1 (%80) genotipi tespit edilmiş olup farklı genotiplere ait yeterli sayıda hasta olmadığı için kistin genotipi ile kistin sayısı, büyüklüğü, yerleşim yeri ve evresi arasında ilişki istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

5.4.5. İmmun yanıtın kistin genotipiyle ilişkilendirilmesi

20 hastanın genotipik çeşitliliği ile *E. granulosus*’a karşı oluşturduğu antikor yanıtlarının arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. G1 genotipine sahip hastaların %87,5 (14/16)’i kist sıvısına karşı seropozitif iken aynı hastaların %75 (12/16)’inin recDipol ile seropozitif olduğu gösterilmiştir. Diğer hastalarda her iki antijene karşı seropozitivite açısından farklılık bulunmamaktadır. ELISA sonuçlarına göre immün yanıt ile kistin genotipi arasındaki ilişki yeterli sayıda farklı genotipe ait örnek bulunmadığı için istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. ELISA sonuçlarının kistlerin genotipine göre dağılımı Tablo 30’dadır.

Tablo 30. ELISA sonuçlarının genotipik çeşitliliğe göre dağılımı

ELISA	Genotipik çeşitlilik				
	G1	G2	G3	G1/G3	Toplam
KS ELISA (+)	14	1	2	1	18
KS ELISA (-)	2	-	-	-	2
RecDipol ELISA(+)	12	1	2	1	16
RecDipol ELISA(-)	4	-	-	-	4

6.Tartışma

Erken dönem tanısı zor olan asemptomatik KE enfeksiyonunun geç dönem tanısı, USG, BT gibi görüntüleme sistemleri ile konulabilmektedir (Savardashtaki vd., 2007). Ancak görüntüleme teknikleri ile çoğu zaman erken dönem kistlerin tespiti ve kistin aktif olup olmadığının ayrımı yapılamamaktadır (Nouir vd., 2008). Görüntüleme yöntemlerinin kullanımının yetersiz ya da uygun olmadığı durumlarda ve klinik bulguları onaylamada immunolojik testlerin kullanımının düşünülmesi gerektiği bildirilmiştir (Wang vd., 2013).

Serolojik testlerin standardizasyonunda sorunlar yaşanmakta olup farklı laboratuvarlarda farklı sensitivite/spesifite değerleri görülmektedir (Çelik vd., 2009; Manzano-román vd., 2015). KS-ELISA'nın sensitivitesinin kistlerin yerleşim yerine, büyüklüğüne, sayısına ve kist evresine göre değişmekle birlikte %50 ila 98 arasında değiştiği bildirilmiştir (Hernández-González vd., 2012). Ayrıca kist sıvısına karşı oluşan antikorlar, dolaşımda uzun süre kalıcılığı nedeniyle hasta takibi açısından da dezavantaj oluşturmaktadır (Manzano-román vd., 2015). KE hastalarının tedavilerinin değerlendirilmesi ve yeni gelişen ya da nükseden kistin mümkün olduğunca erken tespitinde ise hasta takibi önemli yer tutmaktadır (Zhang vd., 2012)

Kist sıvısı kullanımı ile ilgili problemlerin üstesinden gelinmesi amacıyla son yıllarda antijenlerin saflaştırılması, klonlaması ve karakterizasyonu ilgili gelişmelerden yararlanılarak rekombinant antijenler üretilmeye başlanmıştır (Wang vd., 2013). Daha yüksek konsantrasyonda antijen kullanımı imkanı sağladığından rekombinant antijen kullanımına dayalı testler, daha yüksek sensitivite ve spesifite göstermektedir (Lin vd., 2008). Bu kapsamda en çok çalışılan antijenlerin AgB ve Ag5 olduğu bildirilmiştir (Hernandez-Gonzalez vd., 2007).

Ag5' in heterojen yapısından dolayı düşük tanı performansı gösterdiği bildirilmiştir. Rekombinant formunun antijen kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada ELISA-IgG ile %65 sensitivite gösterilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2015). Manzona ve arkadaşlarının yaptığı derleme sonucuna göre Ag5'in sensitivitesinin %50 ile %87,5 arasında değiştiği kaydedilmiştir (Manzano-román vd., 2015). Pagnozzi ve arkadaşlarının Ag5'in tanı değerini araştırmak amacıyla yaptığı çalışmada ise birden fazla kisti bulunanların ve/veya aktif veya geçiş evresine sahip hastaların ve ilaç tedavisi alanların diğer hastalara oranla Ag5 ile daha fazla sayıda pozitif bulunduğu gösterilmiştir (Pagnozzi vd., 2016).

Tamarozzi ve arkadaşlarının (Tamarozzi vd., 2013) yaptığı çalışmada rec AgB8/1 antijenin KE hastalarında sensitivitesinin %97,1 spesifitesinin de %62,7 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin aksine Faramarzi ve arkadaşları (Faramarzi vd., 2019) aynı antijenle daha düşük sensitivite (%75,75) ve daha yüksek spesifite (%96,38) değerleri elde ettikleri görülmüştür. Han ve arkadaşları AgB'nin alt gruplarının (AgB1-5) rekombinant formları üzerine yaptığı kapsamlı çalışmada en umut verici sonucu rec AgB2 ile elde ederken recAgB4 ve recAgB5 ile düşük sensitivite ve spesifite elde ettiklerini bildirmişler (Han vd., 2019).

Son zamanlarda yapılan immunoproteomik çalışmalarında CE1 ve CE2 kist evrelerinin farklı immundominant antijen salgıladıkları gösterilmiştir (Antijen B and Antijen 5). Ag5 erken dönem kist evresinde baskın ve antikorlar tarafından tanınırken AgB'nin ise ağırlıklı olarak CE2 ve CE3 kist evresinde olan hastalarda baskın olduğu gösterilmiş ve bu farklılığın kist evresine özgü tanıda klinik uygulamada faydalı olacağı bildirilmiştir (Manzano Román vd., 2015).

Üretilen rekombinant proteinlerinle KE tanısında ve takibinde umut veren gelişmeler olsa da özellikle farklı kist evrelerinin tanısında sorunlar yaşandığı ve KE tanı ve takibinde yeterli olmadığı bildirilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2017). KE'in serolojik tanısında yukarıda belirttiğimiz nedenlerden dolayı yaşanan sensitivite ve spesifite sorunun çözümü amacıyla tanı antijeni olarak tek molekül yerine birden fazla tanımlanmış immunodominant antijen kullanımına ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Sarkari ve Rezaei, 2017).

Çalışmamızda bu amaçla KS antijenlerinden AgB1, AgB2 ve Ag5'in immunodominant epitoplarının sıralı klonlaması ile elde edilen multiepitop rekombinant peptit antijeni (recDipol) elde edilmiştir. RecDipol' un tanı performansı KS ile karşılaştırılarak IgG-ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Serum paneli olarak cerrahi ya da PAIR işlemi uygulanmış ve kist evresi bilinen 149 KE hastası ile 70 kontrol grubu kullanılmıştır.

149 KE hastasının 78'i (%52,34) kadın ve 71'i (%47,65) erkek hastalardan oluşmaktadır. KE'in cinsiyete göre dağılımı ile ilgili çeşitli sonuçlar bulunmaktadır. 2001-2005 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'ndan elde edilen verilere göre doğrulanmış 14789 KE olgusunun çalışmamızla paralel olarak %54,08'i kadın, %45,92'i erkek hastalardan oluşmaktadır (Yazar vd., 2008). Mor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 67 KE hastasının % 79.1'inin kadın hasta olduğu kaydedilmiştir. Bu durumun kadının hayvan bakımından, yemekten, temizlikten sorumlu olduğu ve bu süreçte parazit yumurtasına maruz kalma ihtimalinin artmasından kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Mor vd., 2018).

Çalışmamıza dahil edilen hastaların en küçüğü 5, en büyüğü 85 yaşında olup en sık hastalık görülen yaş grubu %24,8 ile çocuk hastaların bulunduğu yaş aralığı olarak tespit edilmiştir. KE her yaş grubunda görülebilmektedir. Zang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 183 hastanın %27,32'sinin 41-50 yaş aralığında olduğu kaydedilmiştir (Zhang vd., 2015). Çalışmalarda çoğunlukla bizim sonuçlarımızın aksine yaş ile birlikte KE ihtimalinin artış gösterdiği bildirilmektedir (Akalin vd., 2014; Aksu vd., 2013; Tiaoying vd., 2005). Çalışmamızda 0-18 yaş grubu hastaların çoğunlukta olmasının materyal sağlama ve hasta takibi konusunda iş birliği yaptığımız Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalına diğer merkezlerden de hasta gelmesinden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

149 KE hastası kist sayısı, yerleşimi ve büyüklüğü açısından da değerlendirilmiştir. Doghan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir çok araştırmada da belirtildiği gibi hastaların çoğunluğunun (%72,2) tek kiste sahip olduğu belirtilmiştir (Doghan vd., 2017; Lahmar vd., 2009; Torgerson vd., 2003). Çalışmamızda benzer şekilde hastaların % 61,6'sının tek kisti bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarla paralel olarak (Beyhan vd., 2020; Doghan vd., 2017; Tuxun vd., 2014) hasta grubumuzun büyük çoğunluğunda (%90,6) da KC yerleşimi görülmektedir. Birden fazla kist bulunan hastaların karaciğer yerleşimine de akciğer, dalak, böbrek, pararektal bölge ve beyin tutulumu eşlik etmiştir.

Çalışmamızda üretilen recDipol ile KS antijenlerinin genel tanı performansları KE hastalarının operasyon sırasında alınan kanları kullanılarak ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. RecDipol antijenin genel sensitivitesi %78,52 iken KS'nın %82,55 olarak hesaplanmıştır.

Fathi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2B2t ve EPC1 antijenlerine ait dizileri içeren rekombinant füzyon protein üretilmiştir. Çalışmanın sonucunda bizim sonuçlarımızla paralel olarak rekombinant antijeninin sensitivitesinin (%88,46) KS antijenin sensitivitesinden (% 96,15) düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durumun birden fazla antijeneik alt gruplar bulunduran antijen elde edilirken proteinlerin üç boyutlu yapılarının bozulmasından kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Fathi vd., 2018).

Gonzales ve arkadaşlarının rekombinant AgB2t ve Ag2B2t antijenleri ile yaptığı çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde KS antijenin sensitivitesinin (%85,5) AgB2t ve Ag2B2t rekombinant antijenlerin sensitivitelelerinden (iki antijenin de %51,8) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Hernández-González vd., 2018). Diğer taraftan Li ve arkadaşlarının yaptığı umut verici çalışmada rekombinant EpC1-GST füzyon proteinin sensitivitesi % 92,2 iken spesifitesi %95,6 olarak bildirilmiştir(J. Li vd., 2004)

Seronegativite (yanlış negatif hastalar) serolojik tanıda yaşanan önemli sorunlardan biridir. Yapılan çalışmalarda KE hastalarının %20-30'unun seronegatif olabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2012). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde KE hastalarının %17,44'ü KS ile %21,47'si recDipol antijeni ile seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Seronegativitenin nedenleri arasında antikor üretiminin olmayışı ya da zayıf olması (Carmena vd., 2006), antijen salınımının az olduğu CE1, CE4 ve CE5 evreleri ile küçük kistlere sahip olunması, KC dışı yerleşim, operasyondan önce ilaç kullanımı olduğu belirtilmiştir (Manzano Román vd., 2015). Ayrıca IgG alt gruplarının kullanılmasının sensitiviteyi artırabileceği bildirilmiştir. Kronik KE enfeksiyonun IgG1 yanıtın IgG4 yönünde değiştiği ve başarılı tedavi sonrası da IgG4 seviyesinde azalma görüldüğünden tanıda faydalı olabileceği belirtilmiştir (Siracusano vd., 2012).

Klinik değişkenlerin serolojik testlerin tanı değeri üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir (T. Li vd., 2010). Çalışmamızda KS ve recDipol antijenlerinin kist özelliklerine göre performansları değerlendirilmiştir. İmmunolojik yanıt ile ilişkisi en çok incelenen değişkenin kist evresi olduğu belirtilmiştir (Nouir vd., 2008). AgB'nin aktif kist (CE2) evrelerinde konakçı immün yanıtına maruz kalırken Ag5'in hidatik kistler hasar gördükten sonra (CE3B) spesifik antikor yanıtı tetiklediği bildirilmiştir (Mariconti vd., 2014). Ahn ve arkadaşları ise Ag5'in AgB'nin aksine tüm kist evrelerinde bulunduğunu ve CE1, CE4 ve CE5 evrelerinde antikor yanıtın oluşmasında önemli role sahip olduğunu göstermişlerdir (Ahn vd., 2015).

Haditik kistten salınan antijenik bileşenlerin kist evresine göre değişiklik göstermesinin farklı kist evrelerindeki hastaların hem KS hem de rekombinant antijenlere karşı spesifik antikor yanıtını büyük oranda etkileyeceği bildirilmiştir. Bu bağlamda, farklı rekombinant antijenlerin tek bir antijende birleştirilerek kullanılmasının sensitiviteyi artırılabilceği belirtilmiştir (Jiang vd., 2012).

Çalışmamızda tüm aktif (CE1 ve CE2) ve geçiş (CE3A ve CE3B) kist evrelerinde KS'nin sensitivitesi recDipol'den daha yüksek bulunmuştur (KS ve recDipol sırayla %83,33 ve %77,7). Pasif (CE4 ve CE5) kist evrelerinde ise recDipol oldukça yüksek sensitivite göstermiştir (KS ve recDipol sırayla %78,2 ve %95,65). RecDipol'un sensitivitesinin kist evresiyle ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. RecDipol'un pasif kist evrelerinde daha yüksek sensitiviteye sahip olmasını içeriğinde Ag5'e ait immunodominant bulunmasından kaynaklı olduğu düşündürmektedir. Cerrahi ve PAIR işlemlerinin kontraendike olduğu pasif kist evrelerinde herhangi bir tedavi gerektirmeden 'İzle ve Bekle' prosedürünün uygulabileceği bildirilmiştir (Brunetti vd., 2010). RecDipol'un görüntüleme yöntemleri ile birlikte aktif olmayan kistlerin tanısında kullanılıp hekimlerin cerrahi işlemlere gerek kalmadan 'İzle ve Bekle' yöntemi uygulanma kararı almalarına yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

Han ve arkadaşlarının (Han vd., 2019) yaptığı çalışmada da KE hastalarından pasif kisti olanlarda sensitivitenin rec Ag5 ile %82,85 iken rec AgB1, B2, B3 ve B4 ile sırasıyla %77,14, %85,71, %80 ve %62,85 olarak bildirilmiştir. Rec AgB2 hariç Ag5'in pasif kist evrelerinde AgB'den daha iyi performans gösterdiği sonucu çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Serolojik testlerin tanı değerini etkileyen bir diğer faktörün ise ilaç kullanımı olduğu bildirilmiştir. ABZ tedavisi kistin germinal membranının geçirgenliğini artırarak KS bileşenlerinin dolaşıma karışmasına neden olmaktadır. Bu durumun spesifik antikor yanıtı tetikleyerek seropozitiviteyi artırabileceği bildirilmiştir (Riganò vd., 2002).

İlaç tedavisinin benzer şekilde rekombinant antijenle elde edilen pozitif sonuçları da artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Hernández-González vd., 2018; Lissandrin vd., 2016; Tamarozzi vd., 2013). Bizim çalışmamızda 68 hastanın operasyondan önce ilaç kullanıp kullanmadığı bilgisine ulaşılmıştır. Operasyondan önce değişik sürelerde ilaç tedavisi alan 52 hastanın %88,4'ü KS ile seropozitifken %75'i recDipol ile pozitif bulunmuştur. Operasyondan önce herhangi bir antiparaztik tedavi almayan 16 hastanın tamamı recDipol ile pozitifken %80'i de KS ile seropozitif bulunmuştur. İlaç kullanan hastalarda KS' nin sensitivitesi recDipol'e oranla yüksek iken kullanmayanlarda daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum medikal tedavinin kist membranının geçirgenliğini artırarak KS'nin sensitivitesini artırdığı şeklinde yorumlanmış olup istatistiksel olarak değerlendirildiğinde de anlamlı bulunmuştur.

KE karşı oluşan immun yanıtın kistin yerleşim yerine, sayısına göre değişebileceği ve KC yerleşimli kistlerin daha fazla immun yanıtı tetiklediği bildirilmiştir (Hernandez-Gonzalez vd., 2007). KC yerleşimli KE hastalarda tanı sensitivitesinin %85-98, AC yerleşimli kisti bulunanlarda ise %50-60 arasında değiştiği belirtilmiştir (Barnes vd., 2012). Bu bilgilerin aksine bizim çalışmamızda KS antijeni ile KC yerleşimi gösteren hastalarda sensitivite %82,2 iken AC ve diğer yerleşim gösteren hastalarda %85,7 olarak bulunmuştur. RecDipol antijeni ile ölçülen immun yanıtın kist yerleşimi ile arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık bulunamamıştır.

Çalışmamızda hem KS hem de recDipol ile birden fazla kisti bulunan hastaların tek kisti bulunanlara oranla seropozitifliğinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu farklılık yapılan çalışmalarla (Lissandrin vd., 2016; Pagnozzi vd., 2016; Santivañez vd., 2012) uyumlu olup istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur .

Serolojik testlerde ana antijen kaynağı olarak kullanılan KS antijeni laboratuvar ortamında üretilmemektedir. Farklı enfekte hayvanlardan elde edilmesinden dolayı standardize edilmesi mümkün değildir. KS, konak ve parazite ait protein, karbonhidrat, lipid gibi bileşenleri de içerdiğinden kistten kiste içeriği dolayısıyla antijenitesi değişmektedir. KS kullanımı ile ilgili yaşanan sorunlardan biri de yanlış pozitif sonuçların elde edilmesidir (Siles-Lucas vd., 2017).

ELISA IgG yöntemi ile KS antijeni kullanılarak yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylerde çeşitli oranlarda (İran donörlerinde %53,8, Hint donörlerinde %87,5 ve İtalyan donörlerinde %100) yanlış pozitif sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Mohammadzadeh vd., 2012; Tamarozzi vd., 2013; Zhang vd., 2012).

KS en immunojik bileşenleri AgB ve Ag5 olarak belirtilmiştir. AgB'nin alt gruplarının (AgB1-5) her birinin *E.multilocularis* arasında %90 benzerlik bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca düşük oranda da olsa *Taenia* cinsi ile benzer antijenlere sahip olduğu ve bu benzerliklerin çapraz reaksiyonların nedeni olduğu bildirilmiştir (Manzano Román vd., 2015) .

Han ve arkadaşlarının AgB'nin alt gruplarının (AgB1-5) tanı performansını araştırmak üzere yaptığı çalışmada AgB2'nin en umut verici sonuca elde edilirken rec AgB 4ve AgB5'in hem sağlıklı bireylerle hem de AE hastaları ile yüksek oranda çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Han vd., 2019). Daha önce AgB1 ve B2 üzerine yapılan çalışmalarda Ag B1 'nin spesifitesinin %80-91,2, AgB2' nin de %98-99,5 arasında değiştiği bildirilmiştir (Rott vd., 2000; Virginio vd., 2003).

Ag5'in *Taenia solium* ve *Echinococcus multilocularis* ile sırasıyla %96,7 ve %85,5 oranında benzerlik gösterdiği dolayısıyla aynı epitoplara sahip olabilecekleri bildirilmiştir. Pagnozzi ve arkadaşları Ag5'in şimdiye kadar yayınlanan düşük tanı performansının (Carmena vd., 2006; Lorenzo vd., 2005; Siles-Lucas vd., 1998) antijenin yüksek heterojenitesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu ekip kromatografik yöntemlerle oldukça zenginleştirilmiş iki farklı Ag5 (Ag5-A ve Ag5-B) antijen elde etmiş ve 327 KE hastası ve 253 kontrol grubu ile bu antijenlerin tanı performansları değerlendirilmiştir. Ag5A ve B'nin (sensitivitesi sırayla %88,3 ve %95,3; spesifite sırayla %94,1 ve %92,5) tanı performansının iyi belirlenen bir serum paneli ile oldukça umut verici olduğunu bildirmişlerdir (Pagnozzi vd., 2016).

Çalışmamızda spesifiteyi de artırmak amacıyla yukardaki bilgilere dayanarak AgB1, AgB2 ve Ag5'e ait immunodominant epitopları içeren rekombinant antijeni elde edilmiştir. Rekombinant antijenlerin spesifitesinin KS'na göre daha yüksek olduğu bildirilmiş olup (Hernández-González vd., 2018; Kalantari vd., 2010) çalışmamızda bu bilgiyle paralel sonuçlar elde edilmiştir. KS ve recDipol antijenlerinin spesifitesi sırayla %91,43 ve %95,71 olarak bulunmuştur. AE hastalarının %50'sinden fazlasının KS ile çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Hernández-González vd., 2012). Siles-Lucas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 42 AE hastası çapraz reaksiyon açısından değerlendirilmiş ve hastaların %52,4'ünün KS, %9,5'inin recAgB2t, %16,7'sinin recAg2B2t ile çapraz reaksiyon verdiği gösterilmiştir (Hernández-González vd., 2018).

Çalışmamıza dahil edilen 4 AE hastasının hepsi bu sonuçlarla uyumlu olarak KS antijeni ile seropozitif tespit edilirken recDipol ile negatif bulunmuştur. Çalışmamızın sonucu yukarıdaki çalışmaları desteklese de yeterli sayıda AE serumuna ulaşamamamız çalışmamızın kısıtlı yönlerinden biri olarak değerlendirilmiştir.

Diğer paraziter enfeksiyonlara sahip hastalardan 2' si (Taeniasis ve Leishmaniasis) KS ile 2' si de (Taeniasis ve Toxocariasis) recDipol ile çapraz reaksiyon vermiştir. Ayrıca sağlıklı bireylerin hepsi KS antijeni ile negatifken, recDipol ile biri seropozitif olarak değerlendirilmiştir.

KE enfeksiyonu ile ilgili yaşanan sorunlardan biri de nüks ihtimalidir. Kistin yerleşimine, evresine ve tedavi türüne bağlı olarak değişmekle birlikte yapılan çalışmalarda cerrahi işlem sonrası %2 ile 24'ü arasında (Buttenschoen ve Buttenschoen, 2003; Nour vd., 2008), PAIR sonrası < %15 (Giorgio vd., 2001; Kabaalioğlu vd., 2006; Smego vd., 2003) ve ABZ tedavisinden 2 yıl sonra ortalama %25 oranında (Stojkovic vd., 2009) nüks ihtimali bulunduğu gösterilmiştir. Enfeksiyonun erken tanısı etkili medikal tedavi imkanı sunmaktadır. Bu nedenle tedavinin başarısını değerlendirilmesi ve yeni gelişen veya tekrarlayan kistlerin mümkün olan en kısa sürede tespit edilmesi için hasta takibi gerekmektedir (Nour vd., 2009).

KE hasta takibinde yaygın olarak görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle yeni büyüyen kistlerin ve kistin canlılığının tespitinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu amaçla uygun serolojik testlerin tamamlayıcı tanı yöntemi olarak hasta takibinde kullanılması önerilmektedir (Nour vd., 2008). Serolojik testlerin KS antijenine karşı üretilen antikorların dolaşımda uzun süre kalmasından dolayı hasta takibinde kullanımı sınırlıdır. Bu sorunu gidermek amacıyla tedavi edilen hastaların takibinde rekombinant veya saflaştırılmış antijeni kullanımı araştırılmıştır. KE enfeksiyonunun başarılı bir cerrahi tedavisi sonrası hasta takibinde rekombinant AgB1, AgB2t, AgP29'a karşı oluşan spesifik antikor titresinde düşüş olduğu bildirilmiştir (Hernández-González vd., 2008; Li vd., 2004; Nour vd., 2009).

Cerrahi operasyon sonrası görüntüleme yöntemleriye kistin çıkarıldığı bölgede ya da başka yerde yeni bir kist varlığı göstermeyen hastaların büyük çoğunluğunun 5 yıl ve daha fazla sürede seronegatif olduğu bildirilmiştir (Stojkovic vd., 2017). Nour ve arkadaşlarının 54 KE hastasında yaptığı takip çalışmasında 10 hastanın tüm takip boyunca hem ELISA hem de İB yöntemiyle seronegatif olduğunu bildirmişlerdir. Seronegativitenin hem tanı da hem de hasta takibinde önemli bir sorun olduğu ve bu hastaların serolojik yöntemlerden çok görüntüleme yöntemi ile takibinin yapılması gerektiği belirtilmiştir (Nour vd., 2008).

Stojkovic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise rekombinant antijene karşı seronegatif olan iki hastanın görüntüleme yöntemi ile nüks hastası olduğu gösterilmiştir. Görüntüleme yöntemlerinin sensitivitesinin ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Stojkovic vd., 2017).

Nüks olmayan hastalarda takip sonunda seronegatif olan hasta sayısı rekombinant antijenlerle daha fazlayken ilk tanı sırasında negatif hasta sayısının da rekombinant antijenlerde KS antijenlerine oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Stojkovic vd., 2017). Çalışmamızda bu veriye benzer sonuçlar elde edilmiş olup aşağıda detaylandırılmıştır. Çalışmamızda da tüm takip boyunca 1 hasta (AC yerleşimi) KS antijeni ile 6 hasta (3 KC ve 3 AC yerleşimli) ise recDipol ile seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu hastalarda girişimsel radyoloji bölümünde USG kontrolleri ile yeni kist varlığı gözlenmemiştir.

Nouir ve arkadaşlarının tedavi edilen 40 KE hastası ile yaptığı çalışmada 25 hastanın başlangıçta recP29-ELISA ile pozitif tespit edildiği ve 5 yıl değişen sürelerde tamamının seronegatif olduğu bildirilmiştir. KS antijeni ile bu hastaların sadece %10 'u takip süresi sonunda serogatif olarak bildirilmiştir (Nouir vd., 2009).

Çalışmamızda ise tüm takip boyunca seronegatif olan hastalar dışında 5 (%17,85) hasta (2 AC, 2 KC ve 1 pararektal bölge yerleşimli) KS ile 6 (%21,42) hasta (3 KC, 2AC ve 1'i pararektal bölge yerleşimli) ise recDipol ile takip sonunda negatif bulunmuştur (SI> 50). Bu hastalardan ikisi (KC ve pararektal bölge yerleşimli) her iki antijen ile takip sonunda seronegatifdir. Hasta takibinde AC yerleşimli kistlerin KC yerleşimli kistlere oranla antikor titresinde daha hızlı düşüş olduğu bildirilmiştir (Gönlügür vd., 2004). Takip süresinin kısıtlı ve negatifleşen hasta sayısının az olmasından dolayı çalışmamızda organ yerleşimi ve negatifleşme arasındaki ilişki üzerine değerlendirme yapılamamıştır.

RecDipol antijeni ile ilk kanda ve tüm takip boyunca seronegatif olan hasta sayısının KS antijenine oranla fazla olması bu antijenin sınırlılığı olarak değerlendirilmiştir. Siles-Lucas ve arkadaşları cerrahi yöntemle tedavi edilen 35 hasta ile 11 yıl süren hasta takibi yaptıklarını bildirmişlerdir. KS antijeni ile IgG seviyesinin 7 yıl boyunca hastaların % 100'ünde seropozitif olarak değerlendirilirken recAgB2t karşı IgG seviyesinin bir yılın sonunda azalmaya başladığı tedavi edilen hastaların hepsinin 3 ile 7 yıl arasında da seronegatif olduğu bildirilmiştir (Hernández-González vd., 2008).

Çalışmamızda takip sonunda seropozitif olan hasta sayısı KS ile 22 (%78,57) iken recDipol'e karşı 16 (%57,17) olarak kaydedilmiştir. 15 hasta her iki antijenle de takip sonunda seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Takip süresinin tez süresince yapılabilmesinin verdiği zaman kısıtlamasından dolayı takip sonunda seropozitif hasta sayısının fazla olduğunu düşünmekteyiz. Bu hastaların hepsinin aktif kist yerleşimi KC'de olup 10' unda çoklu kist bulunmaktadır. Sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalarda (Hernandez-Gonzalez vd., 2007; Pagnozzi vd., 2016; Santivañez vd., 2012) belirtildiği gibi KC yerleşimli ve/veya çoklu kisti bulunan hastalarda antikor titresinin yüksek olduğu bilgisini desteklemektedir.

Ayrıca takip boyunca seropozitif olan ve KC yerleşimli çoklu kisti bulunan bir hastanın her iki antijene karşı SI değerinde takip sonunda artma görülmüş ve nüks açısından şüpheli bulunmuştur. Hasta USG kontrollerini dış merkezde yaptırdığını ve son bir yıldır kontrol edilmediğini beyan etmiştir. Hasta kan sonuçları açısından ve USG kontrollerine devam etmesi gerektiği konusunda bilgilendirilmiştir.

Yapılan çalışmada, recP29-ELISA ile başlangıçta pozitif olan 25 hastanın %80'ninde operasyondan sonraki ilk 6 ayda Ig seviyelerinde artış görülmüştür (Nour vd., 2009). Bizim çalışmamızda da 28 takip hastasının 16'sında (%57,17) KS'na karşı, 15'inde de (%53,57) recDipol'e karşı 3 ve/veya 6. aylarda SI değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durumun operasyon sırasında KS antijeninin dolaşıma katılması ve immun sistemi uyarmasından kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Zarzosa vd., 1999).

Nouir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sadece cerrahi tedavi uygulanan 34 hastadan 12'si takip sonunda seronegatif olurken cerrahi ve ilaç tedavisi birlikte uygulanan 6 hastadan hiç birinin takip sonunda negatif olmadığı ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir (Nouir vd., 2008).

Çalışmamızda ise operasyon sonrası ilaç kullanmayan 4 hastanın (bir hasta recDipol ile tüm takip boyunca seronegatif olması dışında) hepsi takip sonunda iki antijen ile seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Operasyondan sonra ilaç kullanan hastaların seropozitiflik durumu değişkenlik göstermiş olup sonuçlar bölümünde (5.3.2'de) detaylandırılmıştır. Sonuçlarımıza göre ilaç kullanımı ve hasta takibi üzerine etkisi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış olup istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Tenguria ve arkadaşları tarafından ortalama 6 yıl boyunca takibi yapılan KE' li hastaların operasyondan veya ilaç kullanımından önce ve sonra alınan kanları ile antikor seviyeleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar benzer çalışmalarla paralel olarak IgE, IgG1 ve IgG4'ün hasta takibinde aktif KE'nin belirlenmesinde önemli olduğunu göstermiştir (Grimm vd., 1998; Khabiri vd., 2006; Tenguria ve Naik, 2014).

Ayrıca KS ile muamele edilen polimorf hücrelerinden IL-4 salınımının azaldığı, cerrahi tedaviden sonra IFN- γ seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Sitokinlerin ilk tanı da sensitivitesinin düşük olduğu ancak hasta takibinde faydalı olabileceği bildirilmiştir (Biranvand vd., 2020; Petrone vd., 2017; Petrone vd., 2015).

Boabaker ve arkadaşları P29 proteininin G1 ve G6 genotipinde küçük aminoasit varyasyonlarının bulunduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada G1 genotipinden elde edilen recP29 antijenine karşı, G1 ve G6 genotipine sahip hastaların antikor yanıtları araştırılmış ve her iki genotipteki hastanın benzer yanıt verdiği tespit edilmiştir (Boubaker vd., 2014).

Çalışmamızda ayrıca genotipik çeşitlilik ve immun yanıt arasındaki ilişkinin değerlendirmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla protoskoleks örneklerinden genotiplendirme analizi yapılan 20 hastanın (16 G1, 1 G2, 2 G3 ve 1 tane G1/3) kanları KS ve recDipol–ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. RecDipol üretilirken kullanılan primerler G1 suşunu amplifiye edecek şekilde tasarlanmıştır.

G1 genotipi dışındaki hastalar her iki antijene karşı seropozitif iken G1 genotipindeki hastaların %87,5'i KS ile %75'i recDipol ile seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda daha önce Türkiye’de yapılan çalışmalarla (Erdoğan vd., 2017; Ergin vd., 2010; Utuk vd., 2008) benzer şekilde ağırlıklı olarak (%80) G1 genotipi tespit edildiğinden ve yeterli sayıda farklı genotipe ait örnek bulunamadığından genotip çeşitlilik ve immun yanıt arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. G1 genotipindeki KS ve recDipol–ELISA seropozitifliği arasındaki oransal farkın rekombinant antijenlerin sensitivitesinin KS göre düşük olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

7. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda AgB1, AgB2 ve Ag5'e ait immunodominat epitopları içeren gen bölgelerinin sıralı klonlaması ile recDipol başarılı şekilde elde edilmiştir. RecDipol'un tanı performansı cerrahi ve PAIR işlemi uygulanan hastalarda KS antijen ile karşılaştırılmıştır. Daha önce yapılan bir çok çalışmayla paralel olarak çalışmamızda recDipol'un sensitivitesi KS antijeninden düşük, spesifitesi ise yüksek olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlarımıza göre recDipol'un aktif olamayan kistlerin tanısında oldukça yüksek (%95,65) sensitiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu antijenin görüntüleme yöntemleriyle birlikte kullanılmasının pasif kistlerin ayırımı yaparak cerrahi ya da medikal tedaviye gerek kalmadan 'İzle ve Bekle' yöntemine karar verilmesine yardımcı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Hasta takibinde recDipol'un yeri hakkında hasta sayısının ve takip süresinin kısıtlı olmasından dolayı tam bir değerlendirme yapılamamakla birlikte beklenen performansı göstermediği görülmüştür. Takip sonunda negatif olan hasta sayısı KS antijeni ile yakın oranda iken tüm takip boyunca seronegatif hasta sayısı KS antijeninden fazladır. Bu yüzden sonuçlarımız, hasta tanı ve takibinde altın standardın görüntüleme yöntemleri olduğu ve paralelinde tanı performansı geliştirilmiş birden fazla rekombinant antijen ve/veya serolojik yöntem kullanılması gerektiği şeklinde yorumlanmıştır.

Genotipik çeşitlilik ve immun yanıt arasındaki ilişki genotip analizi yapılan 20 hasta verileri ile değerlendirilmiştir. Hastaların çoğunluğu (%80) G1 genotipinde tespit edilirken diğer genotiplerde yeterli sayıda hasta olmadığı için immun yanıtın hastaların genotipi ile arasındaki ilişki değerlendirilememiştir. Genotipik çeşitliliğin immun yanıt üzerine etkisinin ancak farklı coğrafik bölgelerden/ülkelerden daha geniş örnek sayısı ile mümkün olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca çalışmamızda medikal tedavi alan ya da ‘İzle ve Bekle’ yöntemi uygulanan hastalar bulunmadığı için recDipol’un bu hasta gruplarında tanı performansı bilinmemektedir. Yapılacak çalışmalarda KE enfeksiyonunun tanı ve takibi için oluşturulacak hasta panelinin demografik ve klinik özellikleri (yaş, cinsiyet, kist sayısı, evresi, yerleşimi vb) ile tedavi şekline (Cerrahi, PAIR, Medikal veya ‘İzle ve Bekle’) göre her grubu temsil edecek yeterli sayıda hastadan oluşması gerektiği düşünülmektedir.



8.Kaynaklar

- Açıkgöz, D., İnceboz, T., Özkara, E., Korkmaz, M., Birgen, N., ve Üzün, İ. (2009). İstanbul Adli Tıp Kurumu Morg Hıttas Dairesi'nde Yapılan Otopsilerde Kistik Ekinokokkozis Görölme Sıklığının Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (2)(June), 155–157.
- Ahn, C., Han, X., Bae, Y., Ma, X., Kim, J., Cai, H., ve Yang, H. (2015). *Alteration of immunoproteome profile of Echinococcus granulosus hydatid fluid with progression of cystic echinococcosis*. 1–10.
- Akalin, S., Kutlu, S. S., Caylak, S. D., Onal, O., Kaya, S., ve Bozkurt, A. İ. (2014). Seroprevalence of human cystic echinococcosis and risk factors in animal breeders in rural communities in Denizli, Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(9), 1188–1194.
- Akcam, A. T., Ulku, A., Koltas, I. S., Izol, V., Bicer, O. S., Kilicbagir, E., ... Iskit, S. (2014). Clinical characterization of unusual cystic echinococcosis in southern part of Turkey. *Annals of Saudi Medicine*, 34(6), 508–516.
- Aksu, M., Sevimli, F. K., Ibiloğlu, I., ve Arpacı, R. B. (2013). Cystic echinococcosis in the Mersin province (119 cases). *Türkiye parazitolojii dergisi / Türkiye Parazitoloji Derneği = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*, 37(4), 252–256.
- Altintas, N., Yazar, S., Yolasigmaz, A., Akisu, Ç., Şakru, N., ve Karaca, S. (1999). A sero-epidemiological study of cystic echinococcosis in İzmir and its surrounding area, Turkey. *Helminthologia*, 36(1), 19–23.
- Altintas, Nazmiye. (2003). Past to present: Echinococcosis in Turkey. *Acta Tropica*, 85(2), 105–112.
- Atkinson, J.-A. M., Gray, D. J., Clements, A. C. A., McManus, D. P., Atkinson, J.-A. M., Gray, ... Yang, Y. R. (2013). Environmental changes impacting Echinococcus transmission: research to support predictive surveillance and control. *Global Change Biology*, 19(3), 677–688.

- Avila, H. G., Santos, G. B., Cucher, M. A., Macchiaroli, N., Pérez, M. G., Baldi, G., ... Kamenetzky, L. (2017). Implementation of new tools in molecular epidemiology studies of *Echinococcus granulosus* sensu lato in South America. *Parasitology International*, 66(3), 250–257.
- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., Mcmanus, D. P., ve Mulvenna, J. (2011). *Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep , cattle and humans*. 74. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.021>
- Azizi, H., Kazemi, B., ve Bandehpour, M. (2015). Molecular Cloning and Expression an 8-kDa Subunit of Antigen B from G1 strain of *Echinococcus granulosus*. *Iran J Public Health*, 44(7), 962–968.
- Barnes, T. S., Deplazes, P., Gottstein, B., Jenkins, D. J., Mathis, A., Siles-Lucas, M., ... Heath, D. D. (2012). Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. İçinde *Acta Tropica* (C. 123, Sayı 1, ss. 1–7).
- Beyhan, Y. E., Cobanoglu, U., Celik, S., Yılmaz, H., ve Halidi, A. G. (2020). Molecular Characterization of Human Lung and Liver Cystic Echinococcus Isolates in Van Province, Turkey. *Acta Tropica*.
- Biranvand, E., Rafiei, A., Beiromvand, M., Amari, A., Bahraini, A., ve Motamedfar, A. (2020). Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with cystic echinococcosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 70(February).
- Boubaker, G., Gottstein, B., Hemphill, A., Babba, H., ve Spiliotis, M. (2014). *Echinococcus* P29 antigen: Molecular characterization and implication on post-surgery follow-up of CE patients infected with different species of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS ONE*, 9(5).
- Brunetti, E. (2015). Echinococcosis Hydatid Cyst. *Medscape*, 1–14.
- Brunetti, E., ve Junghanss, T. (2009). Update on cystic hydatid disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(5), 497–502.
- Brunetti, E., Kern, P., ve Vuitton, D. A. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*, 114(1), 1–16.

- Buttenschoen, K., ve Buttenschoen, D. C. (2003). *Echinococcus granulosus* infection: The challenge of surgical treatment. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 388(4), 218–230.
- Carmena, D., Benito, A., ve Eraso, E. (2006). Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Tropica*, 98(1), 74–86.
- Çelik, T., Akarsu G.A., Güngör Ç., Çolak Ç. ve Örmeci N. (2009). Evaluation of antibodies against hydatid cyst fluid antigens in the post-treatment follow-up of cystic echinococcosis patients. *Current Contents/Clinical Medicine*, 15(4), 170–176.
- Cengiz, Z. T., Yilmaz, H., Beyhan, Y. E., Kotan, M. C., Cobanoglu, U., Ekici, A., ve Odemis, N. (2015). Cystic Echinococcosis Seropositivity in the Blood Samples Sent to Parasitology Laboratory of Yuzuncu Yil University Medical Faculty between 2005 and 2013: Retrospective Assessment., 39(3), 209–211.
- Craig, P. S., Mcmanus, D. P., Lightowers, M. W., Chabalgoity, J. A., Garcia, H. H., Gavidia,... Schantz, P. M. (2007). Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infection Diseases*, 7, 385–394.
- Delibaş, S. B., Özkoç, S., Şahin S., Aksoy, Ü., ve Akisü, Ç. (2006). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı'na Kistik Ekinokokkozis Şüphesiyle Başvuran Hastaların Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(4), 279–281.
- Diaz, A., Fontana, E. C., Todeschini, A. R., Soule, S., Gonzalez, H., Casaravilla, ... Ferreira, F. (2009). The Major Surface Carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* Cyst: Mucin-Type O -Glycans Decorated by Novel Galactose-Based Structures †. *biochemistry*, 11678–11691.
- Doghan, A., Hussein, K., ve Jasim, A. (2017). Laparoscopic treatment of hepatic hydatid cyst. *Mustansiriya Medical Journal*, 16(2).

- Eckert, J, Gemmell, M., Meslin, F., ve Pawłowski, Z. (2001). *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42427/929044522X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Eckert, J., ve Deplazes, P. (2004). *Biological , Epidemiological , and Clinical Aspects of Echinococcosis , a Zoonosis of Increasing Concern*. 17(1), 107–135.
- Erdoğan, E., Özkan, B., Mutlu, F., Karaca, S., ve Şahin, I. (2017). Farklı konaklardan elde edilen echinococcus granulosus izolatlarının moleküler karakterizasyonu. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 51(1), 79–86.
- Ergin, S., Saribas, S., Yuksel, P., Zengin, K., Midilli, K., ve Adas, G. (2010). Genotypic characterisation of *Echinococcus granulosus* isolated from human in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 4(7), 551–555.
- Ertabaklar, H., Dayanir, Y., ve Ertug, S. (2012). Research to Investigate the Human Cystic Echinococcosis with Ultrasound and Serologic Methods and Educational Studies in Different Provinces in Aydın/Turkey. *Turkish Journal of Parasitology*, 36(3), 142–146.
- Etebar, F., Jalousian, F., Hosseini, S. H., Kordafshari, S., ve Najafi, A. (2013). Immunoproteomics approach for EPC1 antigenic epitope prediction of G1 and G6 strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research*, 112(9), 3129–3135.
- Faramarzi, T., Mobasheri, M., Yoosefy, A., ve Valadkhani, Z. (2019). Expression and purification of truncated recombinant B8/1 protein of *Echinococcus granulosus* for diagnosis of hydatid infection in human. *Acta Tropica*, 191(February 2018), 139–145.
- Fathi, S., Jalousian, F., Hosseini, S. H., Najafi, A., Darabi, E., ve Koohsar, F. (2018). Design and construction of a new recombinant fusion protein (2b2t+EPC1) and its assessment for serodiagnosis of cystic echinococcosis. *Apmis*, 126(5), 428–439.

- Giorgio, A., Tarantino, L., De Stefano, G., Francica, G., Mariniello, N., Farella, N., ... Esposito, F. (2001). Hydatid liver cyst: An 11-year experience of treatment with percutaneous aspiration and ethanol injection. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 20(7), 729–738.
- Gönlügür, U., Gönlügür, T. E., ve Akkurt, İ. (2004). Kist Hidatik Tanısında Serolojik Testlerin Değeri. *Akciğer Arşivi*, 6, 158–161.
- Grimm, F., Maly, F. E., Lü, J., ve Llano, R. (1998). Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(5), 613–616.
- Grubor, N. M., Jovanova-nesic, K. D., ve Shoenfeld, Y. (2017). Liver cystic echinococcosis and human host immune and autoimmune follow-up : A review. *world journal of hepatology*, 9(30), 1176–1189.
- Haag, K. L., Alves, L., Zaha, A., ve Ayala, F. J. (2004). Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: Natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene*, 333(SUPPL.), 157–167.
- Hakverdi, S., Sayar, H., Yaldiz, M., Erdoğan, Ş., Akansu, B., ve Canda, M. Ş. (2009). Çukurova Yöresinde Seyrek Yerleşimli Ekinokokkozis (134 olgu). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33(1), 77–81.
- Han, X., Kim, J. G., Wang, H., Cai, H., Ma, X., Duong, D. H., ... Kong, Y. (2019). Survey of echinococcoses in southeastern Qinghai Province, China, and serodiagnostic insights of recombinant *Echinococcus granulosus* antigen B isoforms. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–11.
- Harper, S., ve Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol.*, 681, 259–280.
- Hernandez-Gonzalez, A., Muro, A., Ramos, G., Barrera, I., Orduna, A., ve Siles-Lucas, M. (2007). Usefulness of Four Different *Echinococcus granulosus* Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Unilocular Hydatid Disease (UHD) and Postsurgical Follow-Up of Patients Treated for UHD. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(1), 147–153.

- Hernández-González, A., Sánchez-Ovejero, C., Manzano-Román, R., González Sánchez, M., Delgado, J. M., Pardo-García, T., ... Siles-Lucas, M. (2018). Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid, in IgG-ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9), 1–21.
- Hernández-González, A., Santivanez, S., Garcia, H. H., Rodriguez, S., Ramos, G., Ordun, A., ve Siles-lucas, M. (2012). Improved Serodiagnosis of Cystic Echinococcosis Using the New Recombinant 2B2t Antigen. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7).
- Hidalgo, C., Pía, M., Stoore, C., Pablo, J., Mariante, K., Hellman, U., ... Paredes, R. (2016). Proteomics analysis of *Echinococcus granulosus* protoscolex stage. *Veterinary Parasitology*, 218, 43–45.
- Higuita, N. i. ., Brunetti, E., ve McCloskey, C. (2016). Cystic Echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 518–523. <https://doi.org/10.1128/JCM.02420-15>
- Ito, A., Nakao, M., Lavikainen, A., ve Hoberg, E. (2017). Cystic echinococcosis : Future perspectives of molecular epidemiology. *Acta Tropica*, 165, 3–9.
- Jiang, L., Zhang, Y. G., Liu, M. X., ve Feng, Z. (2012). Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family in serodiagnosis of echinococcosis. *Experimental Parasitology*, 131(1), 85–91.
- Kabaalioğlu, A., Çeken, K., Alimoglu, E., & Apaydin, A. (2006). Percutaneous imaging-guided treatment of hydatid liver cysts: Do long-term results make it a first choice? *European Journal of Radiology*, 59(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2006.01.014>
- Kalantari, E., Bandehpour, M., Pazoki, R., Taghipoor-Lailabadi, N., Khazan, H., Mosaffa, N., ... Kazemi, B. (2010). Application of recombinant *Echinococcus granulosus* antigen B to ELISA kits for diagnosing hydatidosis. *Parasitology Research*, 106(4), 847–851.

- Kamenetzky, L., Muzulin, P. M., Gutierrez, A. M., Angel, S. O., Zaha, A., Guarnera, E. A., ve Rosenzvit, M. C. (2005). High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 131(6), 805–815.
- Khabiri, A. R., Bagheri, F., Assmar, M., ve Siavashi, M. R. (2006). Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunology*, 28(8), 357–362.
- Lahmar, S., Rebaï, W., Boufana, B. S., Craig, P. S., Ksantini, R., Daghfous, A., ... Ben Safta, Z. (2009). Cystic echinococcosis in Tunisia: Analysis of hydatid cysts that have been surgically removed from patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103(7), 593–604.
- Li, J., Zhang, W. B., ve McManus, D. P. (2004). Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Biological Procedures Online*, 6(1), 67–77.
- Li, T., Ito, A., Chen, X., Sako, Y., Qiu, J., Xiao, N., ... Craig, P. S. (2010). Specific IgG responses to recombinant antigen B and Em18 in cystic and alveolar echinococcosis in China. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(3), 470–475.
- Lin, X., Chen, Y., ve Yan, J. (2008). Recombinant multiepitope protein for diagnosis of leptospirosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(11), 1711–1714.
- Lissandrin, R., Tamarozzi, F., Piccoli, L., Tinelli, C., De Silvestri, A., Mariconti, M., ... Brunetti, E. (2016). Factors influencing the serological response in hepatic echinococcus granulosus infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(1), 166–171.
- Lorenzo, C., Last, J. A., ve González-Sapienza, G. G. (2005). The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology*, 131(5), 669–677.
- Lv, C., Hong, Y., Fu, Z., Lu, K., Cao, X., Wang, T., ... Lin, J. (2016). Evaluation of recombinant multi-epitope proteins for diagnosis of goat schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–11.

- Manciulli, T., Mariconti, M., Vola, A., Lissandrin, R., ve Brunetti, E. (2017). Cystic Echinococcosis in the Mediterranean. *Current Tropical Medicine Reports*, 4(4), 235–244.
- Manzano-román, R., Sánchez-ovejero, C., Hernández-gonzález, A., Casulli, A., ve Siles-lucas, M. (2015). Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis : A New Hope for the Future ? *BioMed Research International*, 2015.
- Mariconti, M., Bazzocchi, C., Tamarozzi, F., Meroni, V., Genco, F., Maserati, R., ve Brunetti, E. (2014). Immunoblotting with human native antigen shows stage-related sensitivity in the serodiagnosis of hepatic cystic echinococcosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(1), 75–79.
- McManus, D. P., Gray, D. J., Zhang, W., ve Yang, Y. (2012). Diagnosis , treatment , and management of echinococcosis. *Clinical Review*, 344(June), 39–44.
- McManus, D. P., Zhang, W., Li, J., ve Bartley, P. B. (2003). Echinococcosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 362, 1295–1304.
- Mohammadzadeh, T., Sako, Y., Sadjjadi, S. M., Sarkari, B., ve Ito, A. (2012). Comparison of the usefulness of hydatid cyst fluid, native antigen B and recombinant antigen B8/1 for serological diagnosis of cystic echinococcosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(6), 371–375.
- Mohammed, A. A., Allen, J. T., ve Rogan, M. T. (2018). *Echinococcus granulosus* cyst fluid enhances epithelial- - mesenchymal transition. *Parasite Immunology*, 40(May 2018), 0–8.
- Mor, N., Diken Allahverdi, T., Allahverdi, E., ve Tekdoğan, Ü. Y. (2018). Retrospective Evaluation of Patients Diagnosed with Cystic Echinococcosis at Kafkas University Faculty of Medicine's Surgical Outpatients Unit. *Turkiye parazitolojii dergisi*, 42(3), 196–201.
- Muzulin, P. M., Kamenetzky, L., Gutierrez, A. M., Guarnera, E. A., ve Rosenzvit, M. C. (2008). *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: Further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. *Experimental Parasitology*, 118(2), 156–164.

- Nouir, N. B., Gianinazzi, C., Gorcii, M., Müller, N., Nouri, A., Babba, H., ve Gottstein, B. (2009). Isolation and molecular characterization of recombinant *Echinococcus granulosus* P29 protein (recP29) and its assessment for the post-surgical serological follow-up of human cystic echinococcosis in young patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4), 355–364.
- Nouir, N. B., Nuñez, S., Frei, E., Gorcii, M., Müller, N., Gianinazzi, C., ... Gottstein, B. (2008). Post-surgical follow-up (by ELISA and immunoblotting) of cured versus non-cured cystic echinococcosis in young patients. *Parasitology*, 135(1), 105–114.
- Nouir, N. B., Nunez, S., Gianinazzi, C., Gorcii, M., Muller, N., Nouri, A., ... Gottstein, B. (2008). Assessment of *Echinococcus granulosus* Somatic Protoscolex Antigens for Serological Follow-Up of Young Patients Surgically Treated for Cystic Echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1631–1640.
- Oral Babaoğlu, A., Soyder, A., Malatyali, E., Ertuğ, S., ve Ertabaklar, H. (2018). Genotyping of *echinococcus granulosus* isolates by sequencing of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene in Aydın. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 52(2), 198–205.
- Özbilgin, A., ve Kilimcioğlu, A. A. (2007). Özceli'in Tıbbi Parazit hastalıkları. İçinde M. A. Özcel (Ed.), *Kistik Echinococcosis* (ss. 541–566). Meta.
- Özko, M., Kilimcioğlu, A. A., Girginkardeşler, N., Balcioğlu, I. C., Şakru, N., Korkmaz, M., ve Ok, Ü. Z. (2005). A discrepancy between cystic echinococcosis confirmed by ultrasound and seropositivity in Turkish children. *Acta Tropica*, 93(2), 213–216.
- Pagnozzi, D., Addis, M. F., Biossa, G., Roggio, A. M., Tedde, V., Mariconti, M., ... Uzzau, S. (2016). Diagnostic Accuracy of Antigen 5-Based ELISAs for Human Cystic Echinococcosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–14.
- Petrone, L., Vanini, V., Amicosante, M., Corpolongo, A., Gomez Morales, M. A., Ludovisi, A., ... Goletti, D. (2017). A T-cell diagnostic test for cystic echinococcosis based on Antigen B peptides. *Parasite Immunology*, 39(12), 1–

- Petrone, L., Vanini, V., Petruccioli, E., Ettorre, G. M., Busi Rizzi, E., Schininà, V., ... Goletti, D. (2015). IL-4 specific-response in whole blood associates with human Cystic Echinococcosis and cyst activity. *Journal of Infection*, 70(3),
- Riganò, R., Ioppolo, S., Ortona, E., Margutti, P., Profumo, E., Ali, M. D., ... Siracusano, A. (2002). Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clinical and Experimental Immunology*, 129(3), 485–492.
- Romig, T., Deplazes, P., Jenkins, D., Giraudoux, P., ve Massolo, A. (2017). Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. İçinde *Advances in Parasitology* (C. 95).
- Rott, M. B., Fernández, V., Farias, S., Ceni, J., Ferreira, H. B., Haag, K. L., ve Zaha, A. (2000). Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: Gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica*, 75(3), 331–340.
- Santivañez, S. J., Arias, P., Portocarrero, M., Rodriguez, S., Gonzalez, A. E., Gilman, R. H., ... Garcia, H. H. (2012). Serological diagnosis of lung cystic hydatid disease using the synthetic p176 peptide. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(6), 944–947.
- Sarkari, B., ve Rezaei, Z. (2015). Immunodiagnosis of human hydatid disease: Where do we stand? *World journal of methodology*, 5(4), 185–195.
- Savardashtaki, A., Sarkari, B., Arianfar, F., ve Mostafavi-, Z. (2007). Immunodiagnostic Value of *Echinococcus granulosus* Recombinant B8 / 1 Subunit of. *Iran.J.Immunol.*, 14(2), 111–122.
- Şenlik, B., ve Diker, A. İ. (2004). *Echinococcosis*. N. Altıntaş, R. Tınar, ve A. Çoker (Ed.), *Echinococ'ların Taksonomi ve Morfolojisi* (ss. 13–30). Ege Üniveristesi.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F. J., ve Müller, N. (2017). Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. *Advances in Parasitology*, 96, 159–257.

- Siles-Lucas, M., Gottstein, B., ve Felleisen, R. S. J. (1998). Identification of a differentially expressed *Echinococcus multilocularis* protein Em6 potentially related to antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunology*, 20(10), 473–481.
- Silva, A. M. (2010). Human Echinococcosis: A Neglected Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010, 1–9.
- Simsek, S., Kaplan, M., ve Ozercan, I. H. (2011). A comprehensive molecular survey of *Echinococcus granulosus* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues in human isolates in Turkey. *Parasitology Research*, 109(2), 411–416.
- Siracusano, A., Delunardo, F., Teggi, A., ve Ortona, E. (2012). Host-Parasite Relationship in Cystic Echinococcosis: An Evolving Story. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 7–9.
- Siracusano, A., Teggi, A., ve Ortona, E. (2009). Human Cystic Echinococcosis: Old Problems and New Perspectives. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 1–7.
- Smego, R. A., Bhatti, S., Khaliq, A. A., ve Beg, M. A. (2003). Percutaneous Aspiration-Injection-Reaspiration Drainage Plus Albendazole or Mebendazole for Hepatic Cystic Echinococcosis: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 37(8), 1073–1083.
- Šnábel, V., Altintas, N., D’Amelio, S., Nakao, M., Romig, T., Yolasigmaz, A., ... Dubinský, P. (2009). Cystic echinococcosis in Turkey: Genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitology Research*, 105, 145–154.
- Stojkovic, M., Adt, H. M., Rosenberger, K., Boubaker, G., Hernandez-Gonzalez, A., Junghanss, T., ... Siles-Lucas, M. (2017). Follow-up of surgically treated patients with cystic echinococcosis: can novel recombinant antigens compete with imaging? Analysis of a patient cohort. *Tropical Medicine and International Health*, 22(5), 614–621.

- Stojkovic, M., Zwahlen, M., Teggi, A., Vutova, K., Cretu, C. M., Virdone, R., ... Junghanss, T. (2009). Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(9).
- Tamarozzi, F., Sako, Y., Ito, A., Piccoli, L., Grisolia, A., Itoh, S., ... Brunetti, E. (2013). Recombinant AgB8/1 ELISA test vs. commercially available IgG ELISA test in the diagnosis of cystic echinococcosis. *Parasite Immunology*, 35(12), 433–440.
- Tamarozzi, F., Akhan, O., Cretu, C. M., Vutova, K., Akinci, D., Chipeva, R., ... Casulli, A. (2018). Prevalence of abdominal cystic echinococcosis in rural Bulgaria, Romania, and Turkey: a cross-sectional, ultrasound-based, population study from the HERACLES project. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(7), 769–778.
- Tenguria, R. K., ve Naik, M. I. (2014). Original papers Evaluation of human cystic echinococcosis before and after. *Annals of parasitology*, 60(4), 297–303.
- Tiaoying, L., Jiamin, Q., Wen, Y., Craig, P. S., Xingwang, C., Ning, X., ... Schantz, P. M. (2005). Echinococcosis in Tibetan populations, western Sichuan Province, China. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1866–1873.
- Tirado, V. V., Bernus, A. L., ve Alegría, Á. R. (2018). Medical treatment of cystic echinococcosis : systematic review and meta-analysis. *BMC Infection Diseases*.
- Torgerson, P. R., Karaeva, R. R., Corkeri, N., Abdyjaparov, T. A., Kuttubaev, O. T., ve Shaikenov, B. S. (2003). Human cystic echinococcosis in Kyrgystan: An epidemiological study. *Acta Tropica*, 85(1), 51–61.
- Tuxun, T., Zhang, J. H., Zhao, J. M., Tai, Q. W., Abudurexti, M., M. ve Wen, H. (2014). World review of laparoscopic treatment of liver cystic echinococcosis- 914 patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 24, 43–50.
- Utuk, A. E., Simsek, S., Koroglu, E., ve McManus, D. P. (2008). Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. *Acta Tropica*, 107, 192–194.

- Virginio, V. G., Hernández, A., Rott, M. B., Monteiro, K. M., Zandonai, A. F., Nieto, A., ... Ferreira, H. B. (2003). A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 132(2), 309–315.
- Wang, J. Y., Gao, C. H., Steverding, D., Wang, X., Shi, F., ve Yang, Y. T. (2013). Differential diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis using an immunochromatographic test based on the detection of specific antibodies. *Parasitology Research*, 112(10), 3627–3633.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., & Zoller, M. (1992). *The polymerase chain reaction* (S. A. & Books (ed.)).
- Yazar, S., Ozkan, A. T., Hokelek, M., Polat, E., Yılmaz, H., Özbilge, H., ... Çetinkaya, Z. (2008). Türkiye ' de 2001-2005 Yılları Arasında Kistik Ekinokokkozis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32(February), 208–220.
- Zarzosa, M. P., Orduña Domingo, A., Gutiérrez, P., Alonso, P., Cuervo, M., Prado, ... Torres, A. R. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(4), 255–262.
- Zhang, T., Zhao, W., Yang, D., Piao, D., Huang, S., Mi, Y., ... Liu, A. (2015). Human cystic echinococcosis in Heilongjiang Province, China: A retrospective study. *BMC Gastroenterology*, 15(1), 1–5.
- Zhang, W., Wen, H., Li, J., Lin, R., ve McManus, D. P. (2012). Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: An update. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.

9. Teşekkür

Doktora eğitimim süresince pozitif enerjisi ile beni cesaretlendiren, tez döneminde bana güvenerek sorumluluk almama, sorunları çözmeme imkan sağlayarak gelişmeye katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül ÜNVER' e

Doktora eğitimim süresince her türlü destek ve tecrübelerini esirgemeyen, gelişime katkı sağlayan, tüm çalışmalarımda araştırma laboratuvarını kullanma imkanı sunan ve tez çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirmek için Prof. Dr. Mar Siles –Lucas laboratuvarına gitmeme vesile olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nazmiye ALTINTAŞ ' a

Doktora eğitimin ve tez süresince desteklerini esirgemeneyen Çukuroava Üniversitesi Tıbbi Parazitoloji AD başkanı sevgili hocam Prof. Dr. Soner Koltaş'a.

Tez döneminde rekombinant antijen üretme aşamasında bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sunan, bu süreçte bilgi ve tecrübelerini paylaşarak tezime önemli katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Maria Mar Siles LUCAS, Post. Doc. Raul Manzano ROMAN ve Dr. Carlos Sanchez OVEJERO' a

Tez süresince materyal sağlama ve hasta takibi konusunda her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. Halil BOZKAYA, Doç. Dr. Ömer Vedat ÜNAL, Doç. Dr. Zafer DÖKÜMCÜ ve Doç. Dr. Emre DİVARCI' ya

Tezime başlarken Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında moleküler yöntemlerin uygulama konusunda gözlemleme imkanı sunan Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ' a ve ekibine

Tez çalışmalarımın moleküler karakterizasyon bölümünün hem laboratuvar hem de yorumlama kısmında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Cumhuriyet GÜNDÜZ ve Araş. Gör. Mesude ANGIN ile tez çalışmalarından elde ettiğimiz sonuçların istatistiksel analizinde ve yorumlamasında destek olan sevgili hocam Doç. Dr. Ayşe CANER' e

Tüm doktora eğitimim süresince her türlü desteğini esirgemeyen tüm hocalarıma, bölüm başkanımız Prof. Dr. Mucide AK'a, başta Fatma BİLGİÇ ve Mesut AKIL olmak üzere tüm asistan arkadaşlarım ile tüm Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı ailesine

Koşulsuz desteklerini her zaman hissettiğim ve bana tez süresince motivasyon kaynağı olan canım dostlarım Uzm. Biyolog Ceyda ÇİFCİ YANAR ve Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem SAZAK TURGUT' a

Hayatımı kolaylaştırarak tezimle ilgilenmeme fırsat yaratan ve manevi desteğini her zaman hissettiğim çocuklarımin teyzesi Fevziye BAŞCI' ya

Hayatımın her döneminde bana koşulsuz güvenen ve her zaman arkamda olan varlıklarıyla güç bulduğum canım annem Hatice AKDUR, babam Mehmet AKDUR ve abim Eren AKDUR' a

Tüm doktora eğitimim boyunca zorlukların üstesinden gelmemde sabrıyla, fedakarlığıyla asıl minnet ve teşekkürü hakeden güç kaynağım eşim Nadir ÖZTÜRK' e

Hayatıma girdikleri andan itibaren daha planlı ve disiplinli çalışmam konusunda beni motive ederek tezime en büyük katkıyı sağlayan canım kızım Bilge ÖZTÜRK ve oğlum Ata ÖZTÜRK 'e

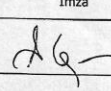
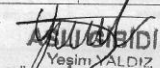
Sonsuz teşekkür ederim.

İzmir, 25.06.2020

Eylem Akdur ÖZTÜRK

10.Ekler

EK1: Etik kurul onay belgesi

 EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR Tel: 0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34 e-mail: aetik@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr				
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kistik Ekinokokkozisli Hastaların Tanı ve Takibinde Yeni Multipeptop Rekombinant Peptid Antijeninin Kist Sıvısı Antijeni ile Karşılaştırılması, İmmün Yanıtın Kistin Evreleri ve Parazitin Genotipiyle İlişkilendirilmesi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ayşegül ÜNVER		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Parazitoloji		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ	ÖYP		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐ Gözlemsel İlaç Çalışması ☐ Tıbbi Cihaz klinik Araştırması ☐ In Vitro Tıbbi Tanı Cihazları ile Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐ İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒ Diğer ise belirtiniz		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	27.10.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGO)	27.10.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DAHA ÖNCE BENZER ÇALIŞMALARA KATILMIŞ OLUP ALINAN KAN ÖRNEĞİNİN YENİDEN KULLANILMASI GEREKEN HASTALAR İÇİN HAZIRLANMIŞ BGO FORMU	27.10.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DAHA ÖNCE BENZER ÇALIŞMALARA KATILMIŞ OLUP ALINAN KAN ÖRNEĞİNİN YENİDEN KULLANILMASI GEREKEN HELMENT ENFEKSİYONU TANISI ALAN KONTROL GRUBU HASTALAR İÇİN BGO FORMU	27.10.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DAHA ÖNCE BENZER ÇALIŞMALARA KATILMIŞ OLUP ALINAN KAN ÖRNEĞİNİN YENİDEN KULLANILMASI GEREKEN KİST HİDATİK NEGATİF KONTROL GRUBU HASTALAR İÇİN HAZIRLANMIŞ BGO FORMU	26.08.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	DİĞER	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 16-9.1/13	Tarih: 31.10.2016		
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen çok merkezli klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda başvuru formunda adı geçen merkezlerde araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU				
ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği			
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY			
Unvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	☐ E ☒ H
				Katılım (**) ☒ E ☐ H
				İmza 
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu: 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05
				Sayfa: 1/2
 Yasemin KALDIR EÜTF Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Sekreteri				



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 16-9.1/13				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dali	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UĞURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Serbest	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

ASLI GIBİDİR
Yeşim YALDIZ
EÜTF Klinik Araştırmaları
Etik Kurulu Sekreteri

Ek2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

• BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 17)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Kist Hidatik hastalığının tanısında ve ameliyat sonrası izleminde yeniden nüks olup olmadığının belirlenmesinde yeni yöntemleri geliştirmek, hem sizin ameliyat sonrası izleminizde hem de aynı hastalığı bulunan kişilerin izleminde geliştirilen bu yöntemi kullanmak amacındayız.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için Kist Hidatik hastası olmanız ve bu hastalık nedeniyle ameliyat yada PAİR geçirmiş olmanız gerekir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Operasyon sırasında (1.gün) , 3.ay, 6. ay ve çalışma süresince sonraki 6 sar aylık takipler sırasında sizden damardan 5 ml düz kan alınacaktır. Ayrıca aynı dönemde Ultrasonografiyle tetkik yapılacaktır.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak kan almak ve ultrason tetkiki için sizi çağırdığımızda zamanında gelmeniz sizin sorumluluklarınızdır. Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 200'dür.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 2 yıldır

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada sizin için beklenen yararlar: Operasyon sonrası izleminizde hastalığın yeniden oluşma olasılığına karşı erken tanı konulması olacak bunun yanında bu çalışmadan çıkarılan sonuçlar aynı hastalıktan yakınan insanların yararına kullanılacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

- Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİ- NEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler yoktur.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya bir yan etkiye maruz kalmanız vb. nedenlerle doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDE- DİR VE NE YAPILACAKTIR?

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırmacı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar araştırmacı tarafından karşılanacaktır

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0 532 6886112 no.lu telefondan Dr Ayşegül Ünver'e başvurabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

- Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR ?

Çalışmayı destekleyen kurum Ege Üniversitesi'dir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilecektir.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz

Sizden alınan kan örnekleri bu hastalıkla ilgili aynı amacı taşıyan diğer çalışmalarda da kullanılacaktır.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum. Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI VE SO-YADI		
ADRESİ		
TEL. VE FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI VE SO-YADI		
ADRESİ		
TEL. VE FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI VE SO-YADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI VE SO-YADI		
GÖREVİ		
TARİH		

EK3. Olgu Rapor Formu**OLGU RAPOR FORMU**

Hastanın Kod Numarası:		Tarih:	
Adı Soyadı:		Yaşadığı yer:	
Yaşı:		Telefonu:	
Cinsiyeti:		Adresi:	

Ultrason Sonucu:	Negatif	CL	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5

Kitle sayısı:		Lokalizasyon:		Boyut:	
----------------------	--	----------------------	--	---------------	--

Serolojik Sonuçlar:	ELİSA	
Moleküler Sonuçlar	RT-PCR	

11.Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı: Eylem Akdur ÖZTÜRK

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 10.10.1988

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Evli

Telefon: +90 505 511 6628

E-posta: akdureylem@gmail.com

EĞİTİM:

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2007- 2012)

Görev Yeri: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı.Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) (2013-)

Doktora: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı-Görevlendirilme (2013-)

YURT DIŞI ARAŞTIRMA DENEYİMİ

Tez araştırması; INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA (IRNASA-CSIC), Salamanca/ İSPANYA (01.02.2016- 01.08. 2016)

Misafir araştırmacı; Short Term Scientific Mission (STSM) bursu ile Istituto Superiore di Sanit (ISS), European Union Reference Laboratory for Parasites (EURLP), Roma / İTALYA (15.10.2018-26. 10.2018)

BİLİMSEL AKTİVİTELER:

- 7.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2014, Ordu-TÜRKİYE
- Aşı Bilimi Kongresi ve Çalıştay, 28-30 Nisan 2015, İzmir-TÜRKİYE
- THE XXVI-th World Congress on Echinococcosis, , 2015,Bükreş, ROMANYA
- 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, 5-9 Ekim 2015, Erzurum-TÜRKİYE .
- International Symposium on Parasitic Zoonoses, 18-19 Kasım 2016, Antalya-TÜRKİYE
- 8.National and 1. International Congress of Hydatidology. 13-15 April 2017, Çorum-TÜRKİYE
- 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi Uluslararası Katılımlı 25 - 29 Eylül 2017 Eskişehir-TÜRKİYE
- EURO-FBP: What next? Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and Foodborne Parasites Conference, 13-14 February 2019, Oeiras-PORTEKİZ
- 9th National and 2th International Congress of Hydatidology, 15-17 November 2018, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti..

ÜYE OLUNAN TOPLULUKLAR:

- Türkiye Hidatidoloji Derneği (2014 -)
- Türkiye Parazitoloji Derneği (2014-)
- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (2016-)
- COST Action Euro-FBP (FA1408) (2016-2019)
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2019 -)

YAYINLAR

- 1- Eylem Akdur Öztürk, Ayşegül Ünver. **Travel-Related Parasitic Infections in Travellers to Southeast Asia and Western Pacific Countries** Türkiye Parazitoloj Derg 2017; 239-45 DOI: 10.5152/tpd.2017.5307

2- Serhat Uysal, **Eylem Akdur Öztürk**, Varol Tunalı, Ayşe Uysal, Ayşegül Ünver, Güray Saydam, Meltem I Taşbakan , Hüsnü Pullukçu , Nevin Turgay , Bilgin Arda. **Intestinal Parasitic Infections in Leukemic Patients with Diarrhea** JMID/ 2017; 7 (2): 63-66 Journal of Microbiology and Infectious Diseases doi: 10.5799/ahinjs.02.2017.02.0256

3- Uysal S, Tunalı V, **Akdur Öztürk E**, Ardeniz Ö, Işıkgöz Taşbakan M, Pullukçu H, Özensoy Töz S, Turgay N, Arda B. **Incidence of Parasitic Diarrhea in Patients with Common Variable Immune Deficiency**, 2016 Jun;40(2):67-71. doi: 10.5152/tpd.2016.4687.

4- Tunalı V, Akdur Öztürk E, Ünver A, Turgay N. **The Prevalance of Blastocystosis among Patients with Gastrointestinal and Dermatologic Complaints and Effects of Blastocystis Spp. Density on Symptomatology**. Türkiye Parazitoloji Derg 2018; 42(4): 254-7. DOI: 10.5152/tpd.2018.5702

POSTER ve SUNUMLAR:

1.**Akdur E**, Karakavuk M, Bilgiç F, Şener A, Ünver A, Altıntaş N. **İzmir ilinde sokak köpeklerinin durumu ve kist hidatik hastalığının kontrolünde köpek popülasyonu azaltmaya yönelik yapılması gerekenler**. 7.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2014, Ordu-TÜRKİYE.

2- Oztatlıcı M, Altıntaş N, **Akdur Ozturk E**, Karakus M, Ünver A, Zorbozan O, Turgay N, Toz S **Molecular Characterization of Cystic Echinococcosis Isolated from Human Samples in Aegean Region, Turkey** Xxvıth World Congress On Echinococcosis 1-3 October 2015 , Bucharest- ROMANIA

3- **Akdur Öztürk E** . **Asya kıtasına seyahat edenlere bulaşabilecek parazitler hastalıkları**. 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, 5-9 Ekim 2015, Erzurum-TÜRKİYE .

4- Uysal S, **Akdur E**, Tunalı V, Uysal A, Ünver A, Saydam G, vd. **Intestinal Parasitic Infections In Leukemic Patients With Diarrhea. Abstract no: 0208. 6th Eurasia Congress of Infectious Diseases. 2014:229**

5- Karakuş M, **Akdur E**, Ünver A, Turgay N, Töz S **Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Gönderilen Kist Sıvı Örneklerinde PCR ile Tür Tayini . 7.Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2014, Ordu. -TÜRKİYE .**

6- Tunalı V, Zorbozan O, **Akdur Öztürk E** , Aykur M, Öztürk N, Ünver A, Turgay N **Gastrointestinal Sistem ve Dermatolojik Yakınmaları Olan Hastalarda Blastocystosis 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, 5-9 Ekim 2015, Erzurum-TÜRKİYE .**

7. **Eylem Akdur Öztürk**, Carlos Sanchez Ovejero , Raul Manzano Roman, Mar Siles Lucas, Nazmiye Altıntaş , Ayşegül Ünver. **A New Recombinant Diagnostic Polypeptide (Recdipol) for the Serodiagnosis of Cystic Echinococcosis.** International Symposium on Parasitic Zoonoses, 18-19 Kasım 2016, Antalya-TURKEY.

8. Serhat Uysal, Varol Tunalı, **Eylem Akdur**, Ömür Ardeniz, Meltem Işıkgöz Taşbakan, Hüsnü Pullukçu, Seray Özensoy Töz, Nevin Turgay, Bilgin Arda. **Parasitic Diarrhea in Patients With Common Variable Immune Deficiency.** PP:140. 6th EACID Congress of Inf Dis 24-27 Sept 2014 Belgrad/SERBIA.

9. Ahmet OZKEKLIKÇI, Eylem AKDUR OZTURK, Mesut AKIL, Aysegul UNVER, Nazmiye ALTINTAS. **Evaluation of Patients With Suspicious Cystic Echinococcosis Attending to Dr.Ersin Arslan Training And Research Hospital in Gaziantep.** 8.National and 1. International Congress of Hydatidology. 13-15 April 2017, Çorum-TURKEY

10. **Eylem Akdur OZTURK**, Ayşegül UNVER, Nazmiye ALTINTAS. **Recombinant Antigens in Serological Diagnosis of Cystic Echinococcosis and Multicloning.** 8.National and 1. International Congress of Hydatidology. 13-15 April 2017, Çorum-TURKEY

11. Mesut AKIL, **Eylem AKDUR ÖZTÜRK**, Ayça AYDIN, Berfin KÜÇÜKLER, Erdinç GÖKDEMİR, Gülten GÜL, Ayşegül ÜNVER, Nazmiye ALTINTAŞ **Cyst Hydatid Disease: Informing Some Primary School Students in Foça, Izmir** 8.National and 1. International Congress of Hydatidology. 13-15 April 2017, Çorum-TURKEY
- 12- Eylem Akdur Öztürk, **Vektör Kaynaklı Paraziter Enfeksiyonların Biyolojik Kontrolünde Endosimbiyozun Yeri** **20. Ulusal Parazitoloji Kongresi** Uluslararası Katılımlı 25 - 29 Eylül 2017 Eskişehir
- 13- Aygul SADIGOVA, **Eylem AKDUR OZTURK**, Ahmet OZKEKLIKCI, Mesut AKIL, Selda KARAMIL, Nuray ALTINTAS, Aysegul UNVER, Nazmiye ALTINTAŞ **Evaluation of Western Blot method with cystic echinococcosis patients who were negative by IHA and ELISA. XXVII WORLD CONGRESS OF ECHINOCOCCOSIS** 4th – 7th October, 2017 Algiers, Algeria
- 14- Mesut AKIL, Ahmet OZKEKLIKCI, **Eylem AKDUR OZTURK**, Aygul SADIGOVA, Selda KARAMIL, Nuray ALTINTAS, Aysegul UNVER, Nazmiye ALTINTAS. **Evaluation of Three Serological Tests Using Native Crude Antigen in Diagnosis of Hepatic Cystic Echinococcosis Patients. XXVII WORLD CONGRESS OF ECHINOCOCCOSIS** 4th – 7th October, 2017 Algiers, Algeria
- 15- Carlos Sánchez-Ovejero*, **Eylem Akdur Öztürk**, Raúl Manzano-Román, Adriano Casulli, Mara Mariconti, Francesca Tamarozzi, Enrico Brunetti, Mar Siles Lucas **Evaluación Del Múltipéptido Recombinante Dipol En El Serodiagnóstico De La Hidatidosis**, X CONGRESO NACIONAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA TROPICAL Y INTERNACIONAL, 23 AL 25 OCTUBRE BIZKAIA ARETOA, SPAIN
- 16- Carlos Sánchez-Ovejero*, **Eylem Akdur Öztürk**, Raúl Manzano-Román, Mar Siles Lucas. **Development of New tools for the serodiagnosis of human cystic echinococcosis : the recombinant antigen DiPol. XX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología XV Meeting del European Veterinary Parasitology College** , 19-21 July 2017, Tenerife – Spain

17-Fatma BİLGİÇ, Eylem AKDUR ÖZTÜRK, Aygöl SADIQOVA , Metin KORKMAZ *İzmir İli Yerel Marketlerden Toplanan Taze Sebzelerdeki Parazitler Kontaminasyon, 20. ULUSAL PARAZİTOLOJİ KONGRESİ Uluslararası Katılımlı 25 - 29 Eylül 2017 Eskişehir

18- Fatma BİLGİÇ, Caner ŞİRİN, Eylem AKDUR ÖZTÜRK¹, Bakiye GÖKER BAĞCA , İlker AYDIN, Cumhur GÜNDÜZ, Metin KORKMAZ **Ege Denizi'nde Yakalanan Berlam Balıklarında (Merluccius merluccius L.) Anisakis Larvalarının Dağılımı ve Genetik Tanımlanması** *20. ULUSAL PARAZİTOLOJİ KONGRESİ Uluslararası Katılımlı 25 - 29 Eylül 2017 Eskişehir

19. Eylem AKDUR OZTURK, Mesut AKIL, Halil BOZKAYA, Zafer DOKUMCU, Emre DIVARCI, Omer Vedat UNALP, Carlos Sanchez OVEJERO, Raul Manzano ROMAN, Adriano CASULLI ,Mar SILES LUCAS, Aysegul UNVER, Nazmiye ALTINTAS. **Evaloution of Native and Multiepitope Recombinant (Recdipol) Antigens in Diagnosis and Follow up Patients with Cystic Echinococcosis.** 9th Ntional and 2th International Congress of Hydatidology, 15-17 November 2018, Nicosia TRNC.

20. Eylem Akdur Öztürk, Alessandra Ludovisi, Fatma İrvasa Bilgiç, Okan Gülbahar, Metin Korkmaz and María Ángeles Gómez Morales
Identification of Anisakis spp. Proteins Recognized by Specific IgE from Serum of Infected People By Western Blot. EURO-FBP: What next? Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and Foodborne Parasites Conference, 13-14 February 2019, Oeiras-PORTUGAL.

21. Mar Siles-Lucas ,Carlos Sanchez-Ovejero, Raúl Manzano Román , Enrico Brunetti , Francesca Tamarozzi, Mara Mariconti, Ambra Vola , Ainel Alemán , Fernando Morcillo , Eylem Akdur, Gulay Vural , Kamenna Vutova , Carmen-Michaela Cretu , Serra Orsten , Okan Akhan , Adriano Casulli. **The Echino-Biobank: Briding the Gap in Cystic Echinococcosis Management.**EURO-FBP: What next? Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and Foodborne Parasites Conference, 13-14 February 2019, Oeiras-PORTUGAL

22. Metin Korkmaz, Temel Ülker, Aylin Babaoğlu , Fatma Bilgiç, **Eylem Akdur Öztürk**, Derya Dirim Erdoğan, Sait Şen. **Familial Trichinellosis in Turkey Caused By Home-Made Fermented Sausage. EURO-FBP: What next?** Final meeting for COST Action Euro-FBP (FA1408) and Foodborne Parasites Conference, 13-14 February 2019, Oeiras-PORTUGAL.

23. **Eylem Akdur OZTURK**, Mesude ANGIN, Mesut AKIL, Ozge SARICA YILMAZ, Nuray ALTINTAS, Halil BOZKAYA, Omer Vedat UNALP, Cumhur GUNDUZ, Nazmiye ALTINTAS, Ayşegül UNVER **Genotyping of *Echinococcus granulosus* Isolates from Clinical Samples of Patients Admitted to Ege University Hosital between 2016-2019.** XXVIII World Congress of Echinococcosis, Lima,-Peru, 29-31 October, 2019.

24. Mesut AKIL, Ozge SARICA YILMAZ, **Eylem AKDUR OZTURK**, Nuray ALTINTAS, Aysegül UNVER, Nazmiye ALTINTAS. **Distribution map of *Echinococcus granulosus* genotypes in Turkey.** XXVIII World Congress of Echinococcosis, , 29-31 October, 2019. Lima-Peru

25. Aylin BABAOĞLU, Fatma İrvasa BİLGİÇ, **Eylem AKDUR ÖZTÜRK**, Sefer Özer BABAT, Derya DİRİM ERDOĞAN, Tonay İNCEBOZ, Metin KORKMAZ. **İnsanlarda Alveolar Ekinokokkoz Serolojik Tanısında Em70/Em90 Bantlarının Kullanımı: 10 Yıllık Deneyim.** 21. Parazitoloji Kongresi 28 Eylül –3 Ekim 2019, Çeşme, İzmir.