

Akciğer hidatidozunun tanısında IHA, ELISA ve Western Blot testlerinin değerlendirilmesi

Çiler AKISU¹, Songül BAYRAM DELİBAŞ¹, Gökhan YÜNÇÜ², Ümit AKSOY¹,
Soykan ÖZKOÇ¹, Can BİÇMEN³, Serpil SEVİNÇ², Sadık YALDIZ²

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,

² İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Cerrahi Kliniği,

³ İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

ÖZET

Akciğerlerde oluşan *Echinococcus granulosus* larvalarının oluşturduğu akciğer kistik hidatidozu, ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülen önemli bir paraziter hastalıktır. Bu çalışmada, akciğer kist hidatidi olduğu cerrahi olarak doğrulanmış 31 hasta, akciğer kist hidatidi dışında diğer akciğer hastalığı tanısı almış 18 hasta ve ayrıca 10 sağlıklı insan serumu olmak üzere toplam 59 serumda IHA, ELISA ve Western Blot (WB) testleri uygulandı. Buna göre IHA, ELISA ve WB testlerinin duyarlılığı sırasıyla %96.7, %87.1 ve %100 olarak bulunurken, bu testlerin özgüllükleri %82.2, %89.2 ve %85.7 olarak saptandı. Cerrahi olarak konfirme hastalarda WB ile en değerli üç bantın 8-12 kDa, 24 kDa ve 124 kDa moleküler ağırlığında olduğu görüldü. Ayrıca, akciğer kistik hidatidozu harici akciğer hastalığı olan dört hastada da bu spesifik bantlardan en az birinin olduğu yalancı pozitiflik veren olgulara rastlandı. Akciğer kistik hidatidozunun tanısında IHA ve ELISA gibi konvansiyonel serolojik testlerin önemli olduğu, ayrıca WB testinde spesifik bazı bantların değerlendirilmesinin tanıya yardımcı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kistik hidatidozu, indirekt hemaglutinasyon testi, ELISA, Western Blot.

SUMMARY

Evaluation of IHA, ELISA and Western Blot tests in diagnosis of pulmonary cystic hidatidosis

Akisu C, Bayram Delibas S, Yuncu G, Aksoy U, Ozkoc S, Bicmen C, Sevinc S, Yaldiz S

Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey.

Pulmonary cystic hidatidosis caused by the larval stages of *Echinococcus granulosus* is a common parasitic disease in Turkey and throughout the world. In this study IHA, ELISA and Western Blot (WB) tests were performed with a panel of 59 sera from 31 surgically confirmed pulmonary cystic hidatidosis patients, 18 patients with pulmonary disease other than cystic hidatidosis and 10 healthy individual. The overall sensitivity of the IHA, ELISA and WB tests used for the serodiagnosis of pulmonary cystic hidatidosis were found as 96.7%, 87.1%, 100% and the specificities were 82.2%, 89.2% and %85.7, respectively. Using the WB test 8-12 kDa, 24 kDa and 124 kDa bands were detected as valuable for surgically confirmed patients' sera. One or more of these bands were also detected in sera of four patients with other pulmonary diseases false-positively. In conclusion conventional serologic test like IHA and ELISA is valuable in diagnosis of pulmonary cystic hidatidosis, also evaluation of some specific bands in WB would contribute to the diagnosis.

Key Words: Pulmonary cystic hidatidosis, indirect hemagglutination test, ELISA, Western Blot.

Yazışma Adresi (Address for Correspondence):

Dr. Çiler AKISU, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 35340 İnciraltı, İZMİR - TÜRKİYE
e-mail: ciler.akisu@deu.edu.tr

Echinococcus granulosus larvalarının oluşturduğu kistik hidatidoz, dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de önemli halk sağlığı problemleri olan bir hastalıktır. Hidatik kistler başta karaciğer (%65) olmak üzere, akciğer (%25), beyin, kalp, kemik, böbrek ve dalak (%10) gibi vücudun birçok organında görülebilmektedir (1). Akciğere yerleşen kistler çok daha yavaş geliştiğinden yıllarca hiçbir belirti vermeyebilir. Genel semptomlar göğüs ağrısı, öksürük, hemoptizi, uzun süren allerjik ürtiker, ödem ve dispne nöbetleri şeklinde iken, kistin belli boyutlara ulaşması veya perfore olmasıyla bronş obstrüksiyonu, atelektazi ve pnömoni gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (2).

Akciğer hidatik kistlerinin tanısı radyoloji ve serolojinin birlikte kullanımı ile konulmaktadır. Serolojik testlerin tanısallaştırılmasıyla kullanılması yanında hastalığın postoperatif seyri ile ilgili çok önemli bilgiler verdiği bilinmektedir. Serolojik testlerden indirekt hemaglutinasyon (IHA), "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" ve indirekt floresan antikor (IFA) gibi testler en çok kullanılan testler arasında yer almaktadır. Son yıllarda moleküler tekniklerden, "Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)" ve Western Blot (WB) analizi gibi yöntemler de hastalığın tanısında özellikle konfirmasyon testi olarak kullanılmaktadır (2,3).

Çalışmamızda, akciğer kistik hidatidoz tanısında IHA, ELISA ve WB yöntemlerinin değerlendirilmesi ve WB yöntemi ile akciğer hidatik kistleri için spesifik olabilecek olası antijenik bantların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Hastalar

İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği'ne başvuran akciğer kist hidatidiği olduğu cerrahi olarak doğrulanmış 31 hasta serumuna, diğer akciğer hastalığı (yedi pnömoni, beş kronik obstrüktif akciğer hastalığı, dört akciğer tümörü, iki akciğer basit kisti) tanısı almış 18 hasta serumuna ve ayrıca 10 sağlıklı serum olmak üzere toplam 59 serumla IHA, ELISA ve WB testleri uygulandı. Serum örnekleri test edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

IHA Yöntemi

Kist hidatikli koyunlardan elde edilen karaciğer kist sıvıları antijen olarak kullanıldı. Tannik asitle duyarlılaştırılan koyun eritrositleri antijen ile karşılaştırılarak antijenli eritrosit süspansiyonu elde edildi. Serum sulandırılmaları U tabanlı mikropiplaklarda yapıldı. Antijenli eritrosit süspansiyonu eklenmiş serum dilüsyonlarında, iki saatlik inkübasyon sonrası düğme iliği şeklinde görüntü varsa sonuç negatif, kenarı tırtıklı düzensiz bir aglutinasyonun veya düzenli bir aglutinasyonun olması pozitif olarak değerlendirildi. Aglutinasyonun görüldüğü son kuyucuğa ait serum sulandırımı kaydedildi, 1/160 ve üstü pozitif olarak değerlendirildi. Sadece tannik asitli eritrosit süspansiyonu eklenmiş "serum kontrol" çukurlarında ise düğme iliği şeklinde görüntü olması beklenildi.

ELISA Yöntemi

Tüm hasta serumları, hazır kit ELISA (Vircell SL, Ref. G1006, Hydatidosis IgG ELISA) üretici firma prosedürlerine göre çalışıldı. Test 405 nm'de okundu. "Cut-off" optik dansitesi, kontrol serumlarına göre çıkarıldıktan sonra, antikor indeksi (AI) hesaplandı. (AI= Örnek OD/"cut-off" OD x 10). AI 11'in üzerinde olan serumlar pozitif, 9'un altında olan serumlar ise negatif olarak değerlendirildi. AI 9-11 arasında olan serumlar tekrar değerlendirilmeye alındı.

SDS-PAGE ve WB Yöntemi

Koyun steril kistlerinden elde edilen kist sıvıları toplandıktan sonra SDS-PAGE yöntemi ile elektroforeze (150 V/1 saat) tabi tutularak, jelde protein fraksiyonları ayrıştırıldı. Daha sonra jeldeki protein bantları elektroforez (300 mA/1 saat) ile nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra, membranlar ince şeritler halinde kesildi ve hasta serumlarıyla inkübe edildi. Şeritler alkalen fosfatase konjuge (Sigma A3187) ve BCIP/NBT (Sigma B-5655) substrat ile muamele edildikten sonra oluşan spesifik antijen-antikor bağlanmaları tespit edildi. Bu bantlar, hafif moleküler ağırlıktaki marker (Prestained SDS-PAGE standart low range, Bio Rad 161-0305) ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında Win Curve Fit bilgisayar programı kullanıldı. Saptanan bantların istatistiksel analizinde Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi, bantların tanısal değerlendirilmesinde ise ROC eğrisi analizi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmada yer alan akciğer hidatidoz şüpheli hastalara uygulanan IHA, ELISA ve WB test sonuçlarının değerlendirilmesi için hastaların cerrahi sonuçları altın standart olarak ele alındı. Buna göre her testin elde edilen duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri tablo olarak gösterildi (Tablo 1).

Çalışma esnasında WB uygulanan 59 hastadan elde edilen antijenik bantların tümü değerlendirildiğinde 52-53 kDa ağırlığındaki antijenik bant; negatif hastalarda daha silik olmak üzere tüm hastalarda gözlemlendi. Cerrahi olarak konfirme 31 hastada bulunan 8-12 kDa, 24 kDa ve 124 kDa'luk bantlar ise sırasıyla %64, %83, %48.3 duyarlılık (sensitivite) ve %82.2, %85.7, %92.8 özgüllük (spesifisite) ile akciğer kist hidatik olgularında en sık gözlenen bantlar olarak değerlendirildi ve bu bantların ROC eğrileri hesaplandı (Şekil 1, Tablo 2). Bu üç banttan en az biri bulunan hasta serumları pozitif olarak değerlendirildi. Cerrahi olarak hidatik kist olduğu ispatlanmış 31 hastanın tümünde özel üç bantın en az biri pozitif olarak bulundu (WB; duyarlılık %100). Bu hastalardan bazılarının WB sonuçları Şekil 2'de görülmektedir.

Cerrahi olarak kist hastası olmadığı belirlenen diğer akciğer hastalıklarının bulunduğu dört hastanın IHA ve ELISA test sonuçlarından en az bi-

ri ve WB test sonuçlarına göre de bu üç özel banttan en az biri saptandı. Bu dört hastanın tanıları ve serolojik test sonuçları tablo olarak gösterilmiştir (Tablo 3).

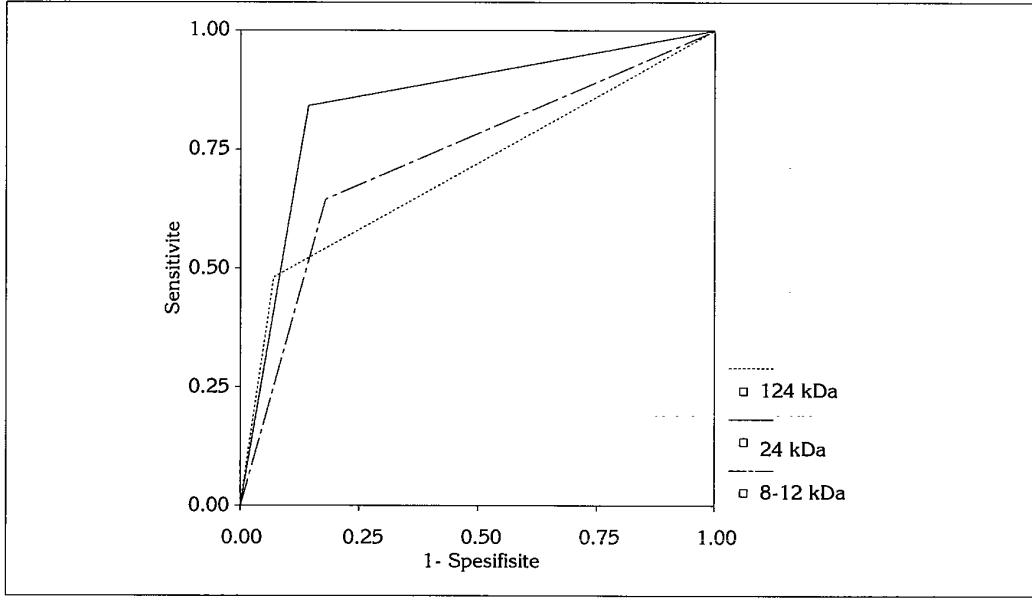
TARTIŞMA

Kistik hidatidoz tanısında radyoloji ile seroloji birlikte değerlendirilmelidir. Uygulanan tedavinin takibinde de serolojik test sonuçlarının değerli olması nedeniyle kullanılan bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin ve test sonuçlarını etkileyen faktörlerin bilinmesi son derece önemlidir. Picardo ve arkadaşları IHA ile %83.3 duyarlılık, %99 özgüllük; Koç ve arkadaşları %90.5 duyarlılık, %90 özgüllük saptamışlardır (4,5). Bunun yanında Kuru ve arkadaşları IHA testinin akciğer yerleşimli olgularda daha az duyarlı olduğunu, inaktif veya kalsifiye kistlerde yalnızca negatiflikler gösterebildiğini; bundan dolayı diğer bir serolojik yöntemle desteklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (6). Biz ise çalışmamızda akciğer hidatidozlarında, IHA testini %82.1 duyarlılık ve %96.7 özgüllükte bularak diğer çalışmalarla benzer sonuçlar gösterdiğini saptadık.

Karaciğer ve akciğer kistik hidatidozisinin tanısında ve tedavisinin izlenmesinde duyarlılığının son derece iyi olduğu belirtilen ELISA testi sık olarak kullanılmaktadır (7). Zarzosa ve arkadaşları cerrahi olarak pulmoner kist hidatik olduğu ispatlanmış 79 hasta ile yaptıkları çalışmada, en duyarlı test olarak spesifik IgG ELISA'yı (%83.5) bulmuşlardır (8). Yine Tüter ve arkadaşları akciğer yerleşimli olgularda IgG ELISA ile %70 duyarlılık, %100 özgüllük saptamışlardır (9). Akciğer hidatidozlarının ve diğer akciğer hastalarının serumları ile yaptığımız bu çalışmanın ELISA sonuçları diğer çalışmalara benzer olarak yüksek oranlarda saptandı.

Tablo 1. Akciğer hidatidozu tanısında IHA, ELISA ve WB testlerinin değerlendirilmesi.

	IHA (n= 59)	ELISA (n= 59)	WB (n= 59)
Duyarlılık (%)	96.7 (30/31)	87.1 (27/31)	100 (31/31)
Özgüllük (%)	82.1 (23/28)	89.2 (25/28)	85.7 (24/28)
Pozitif prediktif değer (%)	85.7 (30/35)	90 (27/30)	88.5 (31/35)
Negatif prediktif değer (%)	95.8 (23/24)	86.2 (25/29)	100 (24/24)



Şekil 1. Akciğer kist hidatikli hastalarda en sık gözlenen üç bantın (8-12 kDa, 24 kDa ve 124 kDa) ROC eğrisi analizi.

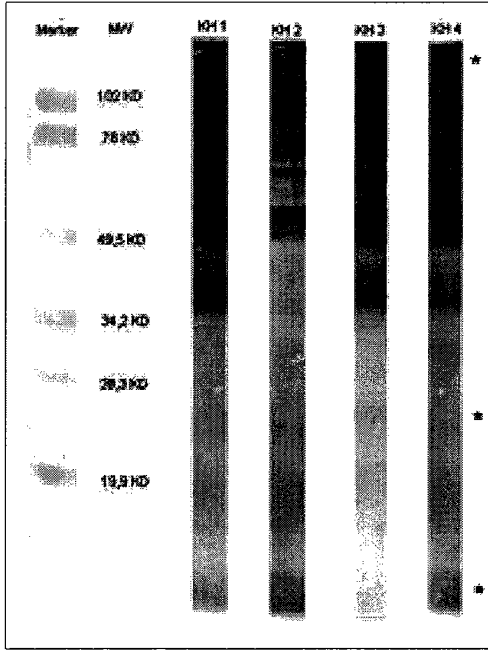
Tablo 2. Akciğer kist hidatikli hastalarda en sık gözlenen üç bant (8-12 kDa, 24 kDa ve 124 kDa) ve bantların sensitivite, spesifisite ve ROC eğrisi analizinde kapladığı alan.

Moleküler ağırlık (kDa)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)	ROC eğrisi analizinde kapladığı alan (%)
8-12	64	82	73
24	83	85	84
124	48	92	70

WB yöntemi çoğu parazit hastalıklarında olduğu gibi hidatidozun tanısının konulmasında da diğer rutin olarak kullanılan serolojik testlere yardımcı önemli bir konfirmatif tanı yöntemidir. Kist sıvısının antijen B (8-12, 16, 23 kDa) ve antijen 5 (20, 38, 40 kDa)'in subünitleri gerek karaciğer, gerekse akciğer kist hidatik olgularında en sık yorumlanan antijenik bantlar arasında yer almaktadır. Maddison ve arkadaşları 8 kDa molekül ağırlıklı antijen B subünitinin kist hidatik için %91 duyarlılıkta olduğunu belirtirken, Leggatt ve arkadaşları diğer antijen B subünitleri arasında yer alan 12 kDa'luk bölgeyi %90.9 oranında spesifik bulmuşlardır (10,11). Biz de çalışmamızda, 8-12 kDa ağırlığındaki antijenik bantları %64 duyarlılık ve %82 özgüllükte bulduk. Antijen B'nin 23-24 kDa

ağırlığındaki subünitine karşı oluşan antikor yanıtını ise %83 duyarlı, %85.7 özgül olarak saptadık. Çalışmamızda değerli üç banttan biri olan 124 kDa bantı ile ilgili olarak çok fazla araştırmaya rastlanmadı. Ramadan ve arkadaşlarının 127 kDa ağırlığında olarak bildirdiği bantın aynı antijenik yapı ile ilgili olması muhtemeldir (12).

Kistik hidatidozun serolojik tanısı esnasında karşılaşılan en yanıltıcı sonuçlardan birisi çapraz reaksiyonların neden olduğu yalancı pozitiflik olgularının görülmesidir. Bu reaksiyonlara neden olan hastalıklar arasında başta hidatidoz harici diğer parazit hastalıkları, ayrıca siroz, karaciğer ve akciğer maligniteleri sayılmaktadır. Yapılan çalışmalarda 36-38 kDa'luk bölgenin yüksek sensitivite oranlarına karşı özellikle sestod infeksiyonla-



Şekil 2. Akciğer kist hidatikli bazı hastaların WB profilleri (8-12 kDa, 24 kDa ve 124 kDa bantları * ile gösterilmiştir).

Tablo 3. WB ile yalnızca pozitif çıkan serumlara ait hastalar ve test sonuçları.

	IHA	ELISA	WB
Akciğer tümörü	+	+	+
KOAH	-	+	+
Pnömoni	+	+	+
Pnömoni	+	-	+

+: Test sonucu pozitif,

-: Test sonucu negatif,

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı.

rında çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir. Leggatt ve arkadaşları 38 kDa'luk bölgenin sadece helmint infeksiyonlarına karşı değil; normal kontrol serumlarıyla da çapraz reaksiyon verdiğini göstermiştir (11). Bu çalışmada, 38-40 kDa ağırlığındaki bantları %83 duyarlılıkta bulmamıza rağmen çapraz reaksiyon verebilmesi nedeniyle testin değerliliğini belirlemede kullanılmayı uygun bulduk. Çalışmamızda tanıları akciğerin di-

ğer hastalıkları olan dört hastada her üç testin en az ikisinin pozitif sonuç verdiğini gördük.

Akciğer kistik hidatidozunda serolojik testler her zaman önemini koruyacaktır. Tanı esnasında birden fazla konvansiyonel testin uygulanması, şüpheli durumlarda WB gibi daha hassas bir testin kullanılmasının tanıya destek olacağı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Schantz PM, Gottstein B. Echinococcosis (hydatidosis). In: Walls KW, Schantz PM (eds). Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Vol 1. Orlando, Fla: Academic Press Inc, 1986: 69-107.
2. Ramos G, Orduna A, Garcia-Yuste M. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. World J Surg 2001; 25: 46-57.
3. Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 248-61.
4. Picardo NG, Guisantes JA. Comparison of three immunological tests for seroepidemiological purposes in human echinococcosis. Parasite Immunol 1981; 3: 191-9.
5. Koç AN, Kılıç H, Sözüer E, Taheri DJ. Kist hidatik tanılı olgularda indirekt hemaglutinasyon yönteminin önemi ve seropozitiflik oranı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 1996; 20: 57-60.
6. Kuru C, Baysal B. Uniloküler kistik ekinokokkozisin tanısında indirekt hemaglutinasyon yönteminin değeri. Türkiye Parazitoloji Dergisi 1999; 23: 251-4.
7. Wattal C, Malla N, Khan IA, Agarwal SC. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pulmonary echinococcosis. J Clin Microbiol 1986; 24: 41-6.
8. Zarzosa MP, Orduna Domingo A, Gutierrez P, et al. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35: 255-62.
9. Tüter Y, Kuştimur S, Güzel H. Kist hidatik hastalığı tanısında IHA ve IgG-ELISA testlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 1994; 24: 274-6.
10. Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, et al. A specific diagnostic antigen of Echinococcus granulosus with an apparent molecular weight of 8 kDa. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 377-83.
11. Leggatt GR, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in Echinococcus granulosus cyst fluid by immunoblot analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 189-92.
12. Ramadan NI, el Damaty SI. A preliminary screening study on human cystic echinococcosis in Cairo slaughterhouse personnel. J Egypt Soc Parasitol 2000; 30: 329-39.