

Kistik Ekinokokkozisli Hastaların Takibinde Yeni Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin Kist Sıvısı Antijeni ile Karşılaştırılması

Comparison of the New Multiepitope Recombinant Peptide Antigen with Cyst Fluid Antigen in the Follow-up of Patients with Cystic Echinococcosis

✉ Eylem Akdur Öztürk¹, ✉ Mesut Akıl¹, ✉ Ayşe Caner¹, ✉ Halil Bozkaya², ✉ Nazmiye Altıntaş¹, ✉ Ayşegül Ünver¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Akdur Öztürk E, Akıl M, Caner A, Bozkaya H, Altıntaş N, Ünver A. Comparison of the New Multiepitope Recombinant Peptide Antigen with Cyst Fluid Antigen in the Follow-up of Patients with Cystic Echinococcosis. Türkiye Parazitoloj Derg 2021;45(3):201-206.

ÖZ

Amaç: Çalışmada, kistik ekinokokkozisli (KE) hastaların takibi, enfeksiyonun prognozu ve tekrarlayan kistlerin mümkün olan en kısa sürede tespiti konularında değerlendirme imkanı sunulmaktadır. Ayrıca, yeni multiepitop rekombinant peptit (recDipol) antijeninin cerrahi veya perkütan aspirasyon enjeksiyon reaspirasyon işlemi uygulanan KE'li hastaların takibindeki performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda, 28 KE hastasına ait toplam 137 kan örneği IgG-ELISA yöntemi ile, recDipol ve kist sıvısı (KS) antijenleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Hastalar eş zamanlı olarak girişimsel radyoloji bölümünde ultrasonografi ile nüks açısından kontrol edilmiştir.

Bulgular: Takip süreleri boyunca 28 takip hastasının seropozitivite oranları aylara göre değişkenlik göstermiştir. Bu hastaların operasyon sırasında alınan kan örnekleri incelendiğinde, 4'ünün (%14,28) KS-ELISA ile, 9'unun (%32,14) recDipol-ELISA ile seronegatif olduğu tespit edilmiştir. Tüm takip süresi boyunca seronegatif hasta sayısı ise KS-ELISA ile 1 (%3,5), recDipol ELISA ile 6 (%21,4) olarak kaydedilmiştir.

Sonuç: RecDipol ELISA ile hastalardan ilk tanıda ve tüm takip boyunca alınan kan örneklerinde belirlenen seronegatif hasta sayısının, KS-ELISA ile belirlenenden fazla olması, recDipol antijeninin hasta takibinde beklenen performansı göstermediği şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen bu sonuçlar, KE hastalarının tanısında ve takibinde altın standardın görüntüleme yöntemleri olduğu ve paralelinde tanı performansı geliştirilmiş rekombinant antijenlerle daha uzun süreli hasta takibinin yapılması gerektiği şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kistik ekinokokkozis, serolojik tanı, hasta takibi, kist sıvısı, multiepitop rekombinant peptit antijeni

ABSTRACT

Objective: The follow-up of patients with cystic echinococcosis (CE) offers the opportunity of evaluating the prognosis of the infection as well as detecting relapse. This study aimed to evaluate the performance of the new multiepitope recombinant peptide (recDipol) antigen in the follow-up of CE patients treated by surgery or percutaneous aspiration injection respiration.

Methods: A total of 137 blood samples from 28 patients were evaluated by IgG-ELISA method using recDipol and hydatid fluid (HF) antigens. The patients were simultaneously checked for recurrence by ultrasonography.

Results: The seropositivity rate of the 28 patients varied considerably during the follow-up. When the first blood of the patients was evaluated, 4 (14.28%) were seronegative by HF-ELISA and 9 (32.14%) were recDipol-ELISA. During the entire follow-up, only 1 (3.5%) and 6 (21.4%) patients were seronegative by HF-ELISA and recDipol ELISA, respectively.

Conclusion: We found that recDipol did not perform as expected in the follow-up due to the higher number of seronegative patients compared to HF-ELISA in the first blood and during the entire follow-up. Our results suggest that imaging methods are gold standards in the diagnosis and that, in parallel, longer-term patient follow-up is required with recombinant antigens that have an improved diagnostic performance.

Keywords: Cystic echinococcosis, serodiagnosis, follow-up, cyst fluid, multiepitope recombinant peptide antigen

Geliş Tarihi/Received: 06.01.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 02.02.2021

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Eylem Akdur Öztürk, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
E-Posta/E-mail: akdureylem@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-4886-6175

GİRİŞ

Kistik ekinokokkozis (KE), *Echinococcus* cinsine ait sestodlardan *E. granulosus*'un larval formunun neden olduğu önemli bir halk sağlığı sorunu olarak bildirilmiştir (1-3). Kozmopolit bir dağılım gösteren KE, Antarktika kıtası hariç tüm kıta ülkelerinde görülmektedir (4). Enfeksiyon enfekte köpek, kurt gibi karnivorların dışkıyla atılan parazit yumurtalarının ara konak olan insan ve koyun, keçi, sığır, domuz gibi çiftlik hayvanları tarafından ağız yoluyla alınmasıyla meydana gelmektedir (3). Yumurtadan çıkan onkosferin bağırsak duvarını geçerek kan ya da lenf yoluyla farklı iç organlara yerleşmesi sonucunda hidatik kistler şekillenmektedir (5). Her tür organda tutulum gösterebilen hidatik kistler en çok karaciğer (%52-77), takiben akciğer (%10-40) ve nadiren diğer organ (%10) tutulumunu göstermektedir (6). KE enfeksiyonunun öncelikli tanısının klinik bulgulara ve ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme gibi görüntüleme yöntemlerine dayandığı bildirilmiştir (7). Enfeksiyonun erken döneminde klinik bulgulara dayalı tanının zor olması nedeniyle KE tanısında standart bir yaklaşım olarak görüntüleme yöntemleri ile serolojinin birlikte kullanılması önerilmektedir (8).

KE enfeksiyonu ile ilgili yaşanan sorunlardan birinin de nüks ihtimali olduğu bildirilmiştir. KE hastalarında enfeksiyonun, cerrahi müdahale sonrası %2 ile %24, perkütan aspirasyon enjeksiyon reaspirasyon (PAIR) işlemi sonrası <%15 ve albendazol (ABZ) ile tedavi sonrası %25 oranında enfeksiyonun tekrarlama ihtimalinin bulunduğu belirtilmiştir (9-11).

Hasta takibi, tekrarlayan kistlerin en kısa sürede tespiti ve enfeksiyonun prognozunu değerlendirilmesine imkan sunduğu için giderek önem kazanmaktadır (12,13). Hasta takibinde ağırlıklı olarak görüntüleme yöntemleri kullanıldığı ancak bu yöntemlerle kistlerin canlılığının ve yeni gelişen kistlerin belirlenmesinde sorunlar yaşandığı bildirilmiştir. Bu nedenle hasta takibinde görüntüleme yöntemleri ile birlikte serolojik yöntemlerin kullanılmasının nüksün belirlenmesinde önemli olduğu belirtilmiştir (14).

Serolojik yöntemlerde temel antijenik kaynak olarak çoğunlukla kist sıvısı (KS) antijeni kullanılmaktadır. KS'nin laboratuvar ortamında üretilmemesinden dolayı, standardizasyonunun oldukça zor olduğu ve farklı laboratuvarlarda farklı sensitivite ve spesifikite değeri verdiği bildirilmiştir (15,16). Ayrıca KS antijenine karşı oluşan antikorların uzun süre dolaşımda kalması bu antijenin hasta takibinde kullanımında dezavantaj oluşturmaktadır (17).

Hasta takibinde yaşanan bu sorunu gidermek amacıyla yapılan çalışmalarda, rekombinant antijenlere karşı üretilen spesifik antikor konsantrasyonlarının KS antijenine karşı üretilenlere oranla daha hızlı düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (17-19).

Bu çalışmada, KE'li hastaların takibinde yeni multiepitop rekombinant peptit (recDipol) antijeninin KS antijeni ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

1. Çalışmada Kullanılan Serum Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde cerrahi veya PAIR işlemi uygulanan ve kist evresi bilinen hastalar dahil edilmiştir. Her bir hastanın bilgilendirilmiş onamları alınmıştır. Her

hastadan operasyon anında, operasyondan sonra 3. ay, 6. ay ve çalışma süresince 6'şar aylık periyodlarla 5 mL kan örneği alınmıştır. Bütün kan örneklerinin serumları ayrıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Hastaların takip süresince eş zamanlı olarak girişimsel radyoloji bölümünde nüks açısından USG ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Antijenler

2.1. KS

KS antijeni için enfekte koyunların karaciğerinde bulunan hidatik kistler kullanılmıştır. Hidatik kist içeriği aseptik koşullarda aspire edildikten sonra protoskoleks varlığı açısından ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Kist içeriği, içerisindeki partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 3,000 rpm'de 5 dakika santrifürlenmiş ve üst sıvı (KS) -20 °C'de saklanmıştır.

2.2. RecDipol

RecDipol antijeninin eldesinde immünohistokimyasal değeri olduğu bildirilen ve rekombinant olarak üretilmesi önerilen Ag5, AgB2 ve Ag5 antijenleri kullanılmıştır (20,21). Çalışmamızda AgB1, AgB2 ve Ag5 antijenlerinin en immünodominant epitoplarını içeren gen bölgelerinin pGEX-4T3 ekspresyon vektöründe sıralı klonlaması ile tek bir antijen (recdDipol) eldesi amaçlanmıştır.

RecDipol elde edilmesinde uygulanan tüm teknikler, Prof. Dr. Mar SilesLucas yönetiminde, IRNASA Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. RecDipol'ün elde etme prosedürü, Sánchez-Ovejero ve ark. (22) tarafından yayınlanan makalede ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Yayınlanan çalışmadan farklı olarak çözünebilir proteinin saflaştırma aşamasında elektroelüzyon yerine Glutathione-Sepharose® 4B (GE healthcare, 17-0756-01) kullanılmıştır. Saflaştırılmış proteinin (recDipol) konsantrasyonu Bradford yöntemi ile değerlendirilmiştir.

3. ELISA Yöntemi

ELISA protokolünde, checkerboard titrasyon yöntemi ile farklı antikor, serum ve antijen konsantrasyonları kullanılarak optimal koşullar belirlenmiştir. ELISA plakaları (NUNC, A649246), phosphate buffered saline (PBS) ile seyreltilmiş antijenler (KS: 10 µL/mL, recDipol: 0,4 µg/mL) ile kaplanmış ve 4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bloklama aşaması 15 dakika süreyle %5 kazein-PBS kullanılarak yapılmıştır. Bloklama solüsyonu ile 1:100 oranda serum seyreltme işlemi yapıldıktan sonra her bir serum çift çukur olacak şekilde plaklara aktarılmıştır. Plakalar, oda sıcaklığında plaka çalkalayıcı üzerinde 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve ardından 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Konjuge aşamasında bloklama solüsyonu ile 2:11.000 oranında sulandırılan keçiden üretilen alkalin fosfat (AP112A, Merck) her bir çukura 100 µL olacak şekilde aktarılmıştır. Plaklar 30 dakika boyunca oda ısısında plaka çalkalayıcı üzerinde bekletildikten sonra 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 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 aktarılmıştır. ELISA plakaları renk değişimi gözlenene kadar oda ısısında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Kromojenik değişiklikler, ELISA plaka okuyucusunda (Bio-Tec/µQUANT, MQX200) 405 nm'de değerlendirilmiştir.

ELISA testinin sonuçları yorumlanırken her bir hastaya ait optik dansite (OD) değerinin kullanıldığı "serolojik indeks (SI)" formülünden faydalanılmıştır. (NK-S)/(NK-PK) x100 formülü kullanılarak SI hesaplanmıştır (NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif

kontrol, S: Serum). NK olarak on sağlıklı bireye ait serumların (OD değeri 0,1-0,2 arasında olan) eşit oranda birleştirilmesiyle, PK olarak da on tane KE hastasına ait serumların (OD değeri 0,4-0,5 arasında olan) eşit oranda birleştirilmesiyle elde edilen havuz kullanılmıştır. Böylece OD değerindeki test şartlarına bağlı değişmelerden etkilenmeden her plak kendi özelinde değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

ELISA testi değerlendirilirken eşik değer olarak SI olarak 50 değeri kabul edilmiştir. Bu SI eşik değeri Hernández-González ve ark. (19) tarafından ROC analizi kullanılarak hesapladıkları değer ile uyumludur. OD değerleri SI (50) ve üstü olan serumlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. SI değeri 50 ve üstü olan KE hastaları "gerçek pozitif", SI değeri 50'nin altında değerlendirilen KE hastaları "yalancı negatif" olarak değerlendirilmiştir. RecDipol-ELISA ve KS-ELISA yöntemleri ile her bir hasta grubu arasındaki seropozitifliği karşılaştırmak için ki-kare testi ve performansını hesaplamak için t-testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Etik Kurul Onayı

Çalışmamızda kullanılan materyallerin toplanması ve kullanılması Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 16-9.1/13 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 28 takip hastasının 12'si (%48,85) erkek, 16'sı (%57,14) kadın hastadan oluşmaktadır. Hastalardan 15'inde (%53,57) tek kist yerleşimi görülürken 13'ünde (%46,42) çoklu kist bulunduğu görülmüştür. Birden fazla kist yerleşimi bulunan hastalarda karaciğer ve akciğer tutulumu birlikte görülmüştür. Ayrıca çoklu kisti bulunan hastalar aktif kistlerinin özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Buna göre 28 takip hastasından 18'inin (%64,2) CE1, 8'inin (%28,57) CE2, 1'inin (%3,57) CE3A, 1'inin (%3,57) de CE3B evresine sahip olduğu kaydedilmiştir. Hidatik kistlerin organ yerleşimine göre dağılımları incelendiğinde 22 (%78,57) hastada KC yerleşimi görülürken 6 (%21,42) hastada AC veya diğer organ tutulumları gözlenmiştir.

Tablo 1. Takip süresi ve hasta sayısı

Takip süresi	6-11 ay	12-23 ay	24-36 ay	Toplam
Hasta sayısı (%)	1 (4)	7 (25)	20 (71)	28

28 takip hastasından 2'sinin cerrahi ya da PAIR işlemi öncesinde ve sonrasında ABZ tedavisi uygulanıp uygulanmadığı bilgisine ulaşılamamıştır. Operasyondan önce 10 hastaya (%38,46) ABZ tedavisi uygulanmadığı, 16'sının (%61,53) ise değişen sürelerde ABZ kullandığı kaydedilmiştir. Operasyondan sonra ise 4 hastaya (%15,38) ABZ tedavisi uygulanmadığı, kalan 22 hastanın (%84,6) ise değişen sürelerde ABZ tedavi aldığı kaydedilmiştir.

RecDipol Antijenin Hasta Takibindeki Performansı

Çalışmamızda 28 takip hastasına ait toplam 137 serum örneği IgG-ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu hastalar nüks açısından eş zamanlı olarak USG ile kontrol edilmiştir. Çalışmanın tez süresince yapılmasından dolayı önerilen sürede hasta takibi yapılamamış ve hastalar iyileşen iyileşmeyen diye gruplandırılmamıştır. Hasta sayısı ile takip süreleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

28 takip hastasının tüm takip sürecince seropozitivite durumları oldukça değişkenlik göstermiş ve aylara göre seropozitivite oranı Tablo 2'de özetlenmiştir.

28 takip hastasının 4'ünün (%14,28) operasyon sırasında alınan ilk kan örnekleri HF-ELISA ile seronegatif olarak değerlendirilirken, bu hastalardan 3'ünün 3. ayda seropozitifite döndüğü görülmüştür. Bu açıdan recDipol-ELISA sonuçları değerlendirildiğinde 9 hastanın ilk kan örnekleri seronegatifken, bu hastalardan 3'ü takip eden aylarda seropozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tüm takip boyunca seronegatif olarak değerlendirilen hasta sayısı recDipol-ELISA ile 6, KS-ELISA ile 1 olarak kaydedilmiş ve bu hastaların klinik özellikleri Tablo 3'te detaylı olarak verilmiştir. Çoklu kist yerleşimi görülen hastalar aktif kistlerinin özelliklerine göre değerlendirilmiştir.

Tüm takip süresince seronegatif olarak değerlendirilen hastalar dışında 5 (%17,85) hasta KS-ELISA ile 6 (%21,42) hasta ise recDipol-ELISA ile takip sonunda seronegatif olarak kaydedilmiştir. Bu hastalardan ikisi her iki antijenle de takip sonunda seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda hastaların seropozitivite durumu Tablo 4'te özetlenmiştir.

Takip sonunda seropozitif olarak değerlendirilen hasta sayısı KS-ELISA ile 22 (%78,57) iken recDipol-ELISA ile 16 (%57,17) olarak değerlendirilmiştir. 15 hasta takip sonunda her iki antijenle de seropozitif olarak değerlendirilirken bu hastaların hepsinin aktif kistleri KC yerleşimli olup 10'unda ise çoklu kist yerleşimi görülmüştür.

Takip boyunca seropozitif olarak değerlendirilen hastaların (biri hariç) SI değerleri takip süresince ya yakın değerlerde seyretmiş

Tablo 2. Yirmi sekiz takip hastasının aylara göre seropozitivite oranı

Test	Hasta sayısı (%)									
	KS-ELISA					RecDipol ELISA				
SI aralığı	200<	100-200	50-100	<50 (n)	Toplam (p)	200<	100-200	50-100	<50 (n)	Toplam (p)
0. gün (n=28) (%)	5 (17,8)	12 (42,8)	7 (25)	4 (14)	24 (85,7)	8 (28,5)	3 (10,7)	8 (28,5)	9 (32)	19 (67,8)
3.-5. ay (n=20) (%)	6 (30)	8 (40)	6 (30)	0 (0)	20 (100)	4 (20)	3 (15)	7 (35)	6 (30)	14 (70)
6.-11. ay (n=24) (%)	4 (16,6)	13 (54)	4 (16,6)	3 (12,5)	21 (87,5)	5 (20,8)	5 (20,8)	5 (20,8)	9 (37,5)	15 (62,5)
12.-17. ay (n=20) (%)	1 (5)	11 (55)	4 (20)	4 (20)	16 (80)	5 (25)	7 (35)	2 (10)	6 (30)	14 (70)
18.-23. ay (n=14)	0 (0)	5 (35,7)	5 (35,7)	4 (28,5)	10 (71)	2 (14)	3 (21)	1 (7)	8 (57)	6 (42,8)
24.-29. ay (n=17)	0 (0)	9 (52,9)	3 (17,6)	5 (29)	12 (70,5)	4 (23,5)	1 (5,8)	2 (11,7)	10 (58,8)	7 (41)
30.-36. ay (n=14)	2 (14)	6 (42,8)	4 (28,5)	2 (14)	12 (85,7)	2 (14)	2 (14)	5 (35,7)	5 (35,7)	10 (71,4)

SI: Serolojik indeks, N: Seronegatif, P: Seropozitif, RecDipol: Multiepitop rekombinant peptid

Tablo 3. Tüm takip boyunca KS ve recDipol-ELISA ile seronegatif olarak değerlendirilen 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	Devam
	1	KC	B	CE1	Yok	1 ay
	1	KC	-	CE2	6 ay	Yok
	2	KC	B	CE2	Yok	6 ay

50 mm ≥/küçük (K), 50 mm < . <100 mm/orta (O), 100 mm ≤/büyük (B), O.Ö: Operasyondan önce, O.S: Operasyondan sonra, AC: Akciğer, KC: Karaciğer, RecDipol: Multiepitop rekombinant peptit

Tablo 4. Takip süresi sonunda hastaların seropozitivite durumu

Seropozitivite durumu	KS (%)	recDipol (%)
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

KS: Kist sıvısı, RecDipol: Multiepitop rekombinant peptit

veya kademeli azaldığı görülmüştür. Takip sırasında seropozitivite oranında KS-ELISA ile 5. ve 6. kontrollerde 2. grup kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede bir düşüş saptanırken ($p < 0,05$), recDipol-ELISA ile de benzer bir durum saptanmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 1).

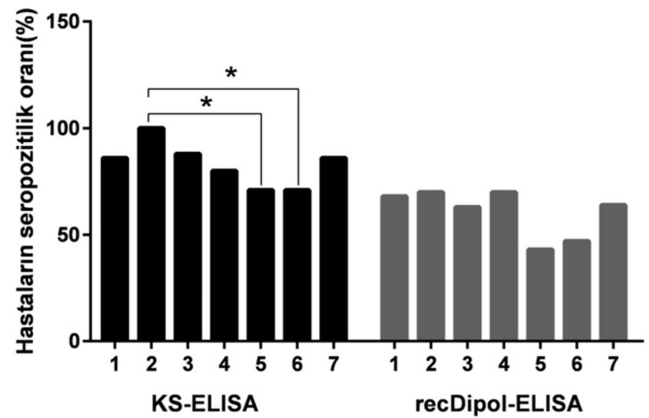
Üç yıl boyunca takibi yapılan ve PAIR işlemi sonrası 6 ay süresince ABZ tedavisi uygulanan bir hastanın son kontrol kanının SI değerinde her iki antijen kullanılarak yapılan ELISA'da artış görülmüştür. Hastanın son USG kontrolünde ise operasyon yerinde ya da başka bölgede yeni bir kist oluşumu görülmezken mevcut kistin kistin solifiye olduğu bildirilmiştir. Bu hastanın 3 yıl ELISA yöntemi ile takibi yapılan hastanın her iki antijen ile SI değerindeki değişime Grafik 2'de verilmiştir.

28 takip hastasının 16'sında (%57,17) KS-ELISA ile 15'inde (%53,57) recDipol-ELISA ile 3 ve/veya 6. aylarında SI değerlerinde artış gözlenmiştir.

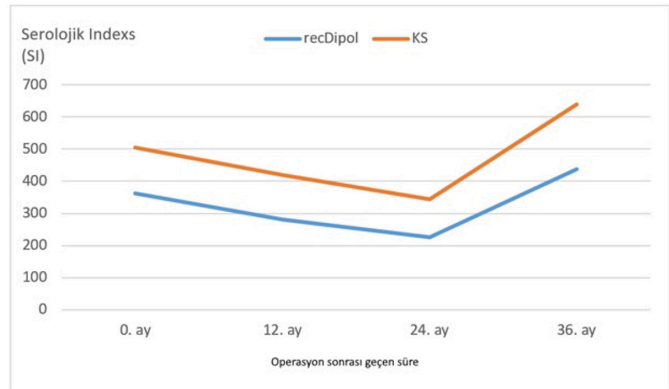
Hastaların operasyondan önce ve sonra ABZ kullanımının SI değerleri üzerine etkisi incelenmiştir. Operasyondan önce ABZ kullanmayan 10 hastadan 3'ünün operasyon sırasında alınan kan örneği KS-ELISA ile seronegatifken (2'si sonraki aylarda seropozitif), 4 hastanın da recDipol-ELISA ile seronegatif (1'inin sonraki aylarda seropozitif) olduğu görülmüştür.

Operasyondan sonrası ABZ tedavisi almayan 4 hastadan 3'ü takip sonunda her iki antijenle seropozitif olarak değerlendirilirken, kalan 1 hasta ise HF-ELISA ile seropozitif, recDipol-ELISA ile tüm takip boyunca seronegatif olarak kaydedilmiştir.

Operasyondan sonra değişen sürelerde ABZ tedavisi uygulanan 22 hastanın seropozitiflik durumu oldukça değişkenlik göstermiştir. Bu hastalardan 1'i tüm takip boyunca KS-ELISA ile seronegatifken, 4 hasta takip sonunda seronegatif ve 17 hasta da takip sonunda seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Aynı

**Grafik 1.** KS-ELISA ve recDipol-ELISA ile hasta takiplerindeki seropozitiflik oranları

KS: Kist sıvısı, RecDipol: Multiepitop rekombinant peptit

**Grafik 2.** Takip sonunda serolojik indeks (SI) değeri yükselen hastanın aylara göre SI değerinin dağılımı

KS: Kist sıvısı, RecDipol: Multiepitop rekombinant peptit

hasta grubundan 5 hasta recDipol-ELISA ile tüm takip boyunca seronegatif değerlendirilirken, 5 hasta takip sonunda seronegatif, 12 hasta ise seropozitif olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca 25 takip hastasının girişimsel radyoloji bölümünde USG ile kontrolleri yapılmıştır (2 takip hasta USG kontrollerini dış merkezde gerçekleştirdiğini beyan etmiş, bir hasta ise takibini bıraktığı için bilgi alınamamıştır). Yirmi beş hastanın radyoloji bölümünde USG kontrollerinde operasyon yerinde ya da başka bölgede yeni bir kist oluşumu görülmezken işlem uygulanan kistlerin solifiye ya da kalsifiye olduğu bildirilmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda, cerrahi veya PAIR işlemi uygulanan 28 KE hastasının ELISA yöntemi ile yeni recDipol ve KS antijenleri kullanılarak çalışma süresince takibi yapılmıştır.

Tedavi edilen KE hastaların takibinde serolojik yöntemlerin yeri üzerine çalışmalar ve tartışmalar devam etmektedir. Ben Nouir ve ark.'nın (17) tedavi edilen 40 KE hastası ile yaptığı takip çalışmasında hastaların %38'i ELISA-recP29 ile %27'si immunoblotting- recP29 yöntemiyle tüm takip boyunca seronegatif olarak değerlendirilmiştir. Seronegatiflik gösteren hastaların tanısında ve takibinde serolojik yöntemlerin kullanılmasının uygun olmadığı ve bu hastaların görüntüleme teknikleri ile takibinin yapılması gerektiği bildirilmiştir (17). Stojkovic ve ark.'nın (23) yaptığı hasta takibinde ise rekombinant antijen ile seronegatif olarak değerlendirilen iki hastanın görüntüleme tekniği ile kontrolünde nüks hastası olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda ise 1 hasta (AC yerleşimi) KS-ELISA ile 6 hasta (3 KC ve 3 AC yerleşimli) ise recDipol-ELISA ile tüm takip boyunca seronegatif olarak değerlendirilmiştir. RecDipol-ELISA ile ilk kan örneğinde ve tüm takip boyunca seronegatif hasta sayısının KS-ELISA sonuçlarına oranla fazla olması bu antijenin sınırlılığı olarak değerlendirilmiştir.

Cerrahi operasyon sonrası görüntüleme teknikleri ile takibi yapılan ve operasyon bölgesinde veya başka yerleşim yerinde yeni bir kist oluşumu göstermeyen hastaların çoğunluğunun 5 yıl ve daha uzun sürede seronegatif olduğu bildirilmiştir (23).

Nüksü bulunmayan hastalarda takip süresi sonunda seronegatif olarak değerlendirilen hasta sayısı rekombinant antijenler ile daha fazla iken ilk tanı sırasında seronegatif hasta sayısının da KS antijenlerine oranla rekombinant antijenlerde daha fazla olduğu bildirilmiştir (23). Ben Nouir ve ark.'nın (17) tedavi uygulanan 40 KE hastası ile yaptığı takip çalışmasında 25 hastanın ilk tanı kan örneğinin recP29-ELISA ile pozitif değerlendirildiği ve 5 yıllık takip sonunda değişen sürelerde tamamının seronegatif olduğu bildirilmiştir. KS -ELISA ile bu hasta grubunun sadece %10'unun takip sonunda seronegatif olarak değerlendirildiği bildirilmiştir (17).

Çalışmamızda ise tüm takip süresince seronegatif olarak değerlendirilen hastalar dışında 5 (%17,85) hasta KS-ELISA ile 6 (%21,42) hasta ise recDipol-ELISA ile takip sonunda seronegatif kaydedilmiştir (SI>50). Hasta takibinde AC kisti bulunan hastaların KC kisti bulunanlara oranla antikor konsantrasyonun da daha hızlı azalma olduğu bildirilmiştir (24). Çalışmamızda takip süresinin kısıtlı olması ve takip sonunda seronegatif olan hasta sayısının az olması nedeniyle organ yerleşimi ve antikor titresinde azalma arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, KS-ELISA ile 22 (%78,57), recDipol-ELISA ile 16 (%57,17) hasta takip sonunda seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu hastalardan 15'inin her iki antijenle takip süresi sonunda seropozitif olduğu görülmüştür. Takip süresinin kısıtlı olmasından dolayı pozitif hasta sayısının her iki antijenle fazla olduğunu düşünmekteyiz. Bu hasta grubunun aktif kistleri KC yerleşimli olup 10'unda birden fazla kist bulunmaktadır. Sonuçlarımız daha önce yapılan benzer çalışmalarda (19,25,26) belirtildiği gibi KC yerleşimli ve/veya birden fazla kisti bulunan hastalarda antikor seviyesinin yüksek olduğu bilgisini desteklemektedir. Ayrıca çoklu KC kisti bulunan bir hastanın takip sonunda her iki antijenle de SI değerinde artış

görülmüş ve nüks açısından şüpheli değerlendirilmiştir. Hastanın son USG kontrolünde ise operasyon yerinde ya da başka bölgede yeni bir kist oluşumu görülmezken işlem uygulanan kistlerin solifiye olduğu bildirilmiştir. Hasta kan sonuçları hakkında ve USG kontrollerine devam etmesi gerektiği konusunda bilgilendirilmiştir.

Hasta takibi üzerine yapılan bir çalışmada, recP29-ELISA ile başlangıçta seropozitif olarak değerlendirilen 25 hastadan %80'ninin işlem sonrası ilk 6 ayda IgG seviyelerinde artış görüldüğü bildirilmiştir (17). Bizim çalışmamızda ise 28 takip hastasının 16'sında (%57,17) KS- ELISA ile 15'inde de (%53,57) recDipol-ELISA ile 3. ve/veya 6. aylarda SI değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durumun KS antijeninin operasyon sırasında dolaşıma katılması ve immün sistemi tetiklemesinden kaynaklı olduğu bildirilmiştir (27). Çalışmamızda hastaların takip periyotları arasındaki seropozitivite oranları karşılaştırılmıştır. KS-ELISA ile 5. ve 6. kontrollerde görülen seropozitivite oranında 2. kontrole oranla azalma görülmüş olup bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Bu durum operasyon sırasında dolaşıma katılan KS antijenlerine karşı oluşan spesifik yanıtın operasyonu takip eden ilk aylarda arttığı, sonraki aylarda azalmaya başladığı açıklaması ile paralellik göstermektedir (27). Benzer durum recDipol-ELISA ile saptanmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda ABZ kullanımı ve immün yanıt üzerine etkisi de değerlendirilmiştir. Ben Nouir ve ark. (17) cerrahi tedavi uygulanan 34 takip hastasından 12'sinin takip sonunda seronegatif olarak kaydedilmiştir. Aynı çalışmada cerrahi ve ABZ tedavisi birlikte uygulanan 6 hastanın tamamının takip sonunda seropozitif olduğu, bu farklılığın istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir (17).

Bizim sonuçlarımızda ise operasyon sonrası ABZ kullanmayan 4 takip hastasının (bir hasta recDipol-ELISA ile tüm takip boyunca seronegatif değerlendirilimesi dışında) hepsi takip sonunda her iki antijen ile de seropozitif olarak değerlendirilmiştir. Operasyondan sonra ABZ kullanan hastaların seropozitiflik durumu oldukça değişkenlik göstermiş olup sonuçlar bölümünde detaylandırılmıştır. Sonuçlarımıza göre ilaç kullanımı ile hasta takibi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır

KE hastalarının serolojik takibinde uygun tanı aracı arayışı devam etmektedir. Çalışmamızda ELISA yöntemi ile *E. granulosus* spesifik IgG tespiti yapılmış olup IgE, IgM, IgG2 ve IgG4'ün kullanımının hasta takibinde faydalı olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca spesifik sitokinlerin ve sitokin seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesinin hasta takibinde önemli bir potansiyele sahip olabileceği belirtilmiştir (16).

SONUÇ

Özetle, takip süresinin ve hasta sayısının kısıtlı olmasından dolayı recDipol'ün hasta takibindeki performansı hakkında tam bir değerlendirme yapılamamıştır. Ancak ilk KE tanısı konulduğunda hastalardan alınan kan örneğinde ve tüm takip boyunca seronegatif hasta sayısının KS-ELISA'dan fazla olması nedeniyle beklenen performansı göstermediği şeklinde yorumlanmıştır. Bu nedenle, daha fazla hasta ile uzun süreli serolojik ve radyolojik takibin KE hastalarının tanısında ve takibinde yararlı olacağı düşünülmektedir.

BİLGİLENDİRME

Bu çalışma "Kistik Ekinokokkozis'li Hastaların Tanı ve Takibinde Yeni Multiepitop Rekombinant Peptit Antijeninin Kist Sıvısı Antijeni ile Karşılaştırılması, İmmün Yanıtın Kistin Evreleri ve Parazitin Genotipiyle İlişkilendirilmesi" başlıklı tezi hasta takibi bölümünün yeniden yazımıdır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın rekombinant antijen elde edilmesi bölümünde laboratuvar imkanlarını kullandığımız Sayın Prof. Dr. Mar Siles Lucas ve ekibine, hasta takibi bölümünde ilk tanı materyallerinin sağlanmasında desteklerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Ömer Vedat Ünalp, Doç. Dr. Zafer Dökümcü ve Doç. Dr. Emre Divarçı'ya sonsuz teşekkürlerimizi iletiyoruz.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışmamızda kullanılan materyallerin toplanması ve kullanılması Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 16-9.1/13 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.

Hasta Onayı: Her bir hastanın bilgilendirilmiş onamları alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunda olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* * Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: H.B., Konsept: E.A.Ö., N.A., A.Ü., Dizayn: E.A.Ö., A.C., N.A., A.Ü., Veri Toplanma veya İşleme: E.A.Ö., M.A., H.B., Analiz veya Yorumlama: E.A.Ö., A.C., H.B., N.A., A.Ü., Literatür Arama: E.A.Ö., Yazan: E.A.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışmada, öğretim üyesi yerleştirme programı (ÖYP) kapsamında doktora tez araştırması için verilen 10.000 liralık burs kullanıldı.

KAYNAKLAR

- Altintas N. Past to present: echinococcosis in Turkey. *Acta Trop* 2003; 85: 105-12.
- Atkinson JA, Gray DJ, Clements AC, Barnes TS, McManus DP, Yang YR. Environmental changes impacting *Echinococcus* transmission: research to support predictive surveillance and control. *Glob Chang Biol* 2013; 19: 677-88.
- da Silva AM. Human echinococcosis: a neglected disease. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: 583297.
- Manciulli T, Mariconti M, Vola A, Lissandrini R, Brunetti E. Cystic Echinococcosis in the Mediterranean. *Curr Trop Med Reports* 2017; 4: 235-44.
- Engström ELS, Salih GN, Wiese L. Seronegative, complicated hydatid cyst of the lung: A case report. *Respir Med Case Rep* 2017; 21: 96-98.
- Akcam AT, Ulku A, Koltas IS, Izol V, Bicer OS, Kilicbagir E, et al. Clinical characterization of unusual cystic echinococcosis in southern part of Turkey. *Ann Saudi Med* 2014; 34: 508-16.
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 2010; 114: 1-16.
- Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 2009: 474368.
- Kabaalioglu A, Ceken K, Alimoglu E, Apaydin A. Percutaneous imaging-guided treatment of hydatid liver cysts: do long-term results make it a first choice? *Eur J Radiol* 2006; 59: 65-73.
- Smego Jr RA, Bhatti S, Khaliq AA, Beg MA. Percutaneous aspiration-injection-reaspiration drainage plus albendazole or mebendazole for hepatic cystic echinococcosis: a meta-analysis *Clin Infect Dis* 2006; 59: 65-73.
- Stojkovic M, Zwahlen M, Teggi A, Vutova K, Cretu CM, Virdone R, et al. Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e524.
- Boubaker G, Gottstein B, Hemphill A, Babba H, Spiliotis M. 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* 2014; 9: e98357.
- Brunetti E, Junghans T. Update on cystic hydatid disease. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 497-502.
- Ben Nour N, Nuñez S, Gianinazzi C, Gorcii M, Müller N, Nouri A, et al. Assessment of *Echinococcus granulosus* somatic protoscolex antigens for serological follow-up of young patients surgically treated for cystic echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1631-40.
- Nour NB, Nuñez S, Frei E, Gorcii M, Müller N, Gianinazzi C, et al. Post-surgical follow-up (by ELISA and immunoblotting) of cured versus non-cured cystic echinococcosis in young patients. *Parasitology* 2008; 135(Pt 1): 105-14.
- Siles-Lucas M, Casulli A, Conraths FJ, Müller N. Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. *Adv Parasitol* 2017; 96: 159-257.
- Ben Nour N, Gianinazzi C, Gorcii M, Müller N, Nouri A, Babba H, et al. 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103: 355-64.
- Li J, Zhang WB, McManus DP. Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Biol Proced Online* 2004; 6: 67-77.
- Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 147-53.
- Carmena D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop* 2006; 98: 74-86.
- Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, et al. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 309-15.
- Sánchez-Ovejero C, Akdur E, Manzano-Román R, Hernández-González A, González-Sánchez M, Becerro-Recio D, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of GST-tagged recombinant antigens 2B2t, Ag5t and DIPOL in ELISA for the diagnosis and follow up of patients with cystic echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14: e0008892.
- Stojkovic M, Adt HM, Rosenberger K, Boubaker G, Hernandez-Gonzalez A, Junghans T, et al. Follow-up of surgically treated patients with cystic echinococcosis: can novel recombinant antigens compete with imaging? Analysis of a patient cohort. *Trop Med Int Health* 2017; 22: 614-21.
- Gönlügür U, Gönlügür TE, Akkurt İ. Kist Hidatik Tanısında Serolojik Testlerin Değeri. *Akciğer Arşivi* 2004; 158-61.
- Pagnozzi D, Addis MF, Biosa G, Roggio AM, Tedde V, Mariconti M, et al. Diagnostic Accuracy of Antigen 5-Based ELISAs for Human Cystic Echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004585.
- Santivañez SJ, Arias P, Portocarrero M, Rodriguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, et al. Serological diagnosis of lung cystic hydatid disease using the synthetic p176 peptide. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19: 944-7.
- Zarzosa MP, Orduña Domingo A, Gutiérrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, 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.