

Eozinofilik Sığırlarda Hidatidosis Seropozitifliği

Sami ŞİMŞEK, Ergün KÖROĞLU, Armağan Erdem ÜTÜK, Kürşat ALTAY

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ

ÖZET: Bu çalışmada, eozinofilik ve eozinofilik olmayan sığırlarda hidatidosis seropozitifliğini araştırmak amacıyla 597 sığırdan kan serumu alınmış ve bunların 79'u (%13,2) absöüt eozinofil sayımına göre hipereozinofilik olarak bulunmuştur. Hipereozinofilik 79 sığırdan 62'sinin (%78,4) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile 48'inin (%60,7)'de İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ile hidatidosis yönünden seropozitif olduğu belirlenmiştir. Absöüt eozinofil sayımına göre eozinofilik olmadığı belirlenen sığırlar arasından rastgele seçilen 79 sığırın 38'i (%48,1) ELISA ile 34'ü (%43,1)'de IFAT ile seropozitiflik vermiştir. Bu sonuçlara göre eozinofilik sığırlarda hidatidosis seropozitifliğinin eozinofilik olmayan gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, eozinofilik hayvanların hidatidosis yönünden takip edilmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Eozinofilik sığır, hidatidosis, ELISA, IFAT

Seropositivity of Hydatidosis in Cattle with Eosinophilia

SUMMARY: The aim of this study was to investigate the seropositivity of hydatidosis in a group of cattle with and without eosinophilia. Of the 597 cattle, 79 (13.2%) were found to have eosinophilia with absolute eosinophilic counts. Out of 79 cattle, 62 (78.4%) and 48 (60.7%) were found to be positive for hydatidosis by ELISA and IFAT, respectively. Out of 79 cattle without eosinophilia, 38 (48.1%) were found to be seropositive by ELISA and 34 (43.1%) by IFAT. Our data indicated that seropositivity of hydatidosis in cattle with eosinophilia was higher than the group without eosinophilia and it will be useful to investigate livestock with eosinophilia for hydatidosis.

Key words: Eosinophilic cattle, hydatidosis, ELISA, IFAT

GİRİŞ

Echinococcosis, hem insan hem de evcil hayvanları etkileyen en önemli paraziter zoonozlardan birisi olup, özellikle az gelişmiş ülkelerde kırsal bölgelerdeki insan ve hayvanlarda oldukça sık rastlanmaktadır (11). *Echinococcus granulosus* 'un erişkinleri köpek, kurt, çakal ve diğer kanidelerin ince bağırsaklarında, larvası olan hidatik kist ise koyun, keçi, sığır, domuz ve diğer birçok evcil ve yabani memeli hayvanların ve insanların başta karaciğer, akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularında bulunmaktadır (1, 3). Hidatik kistin meydana getirdiği hidatidosis, insan ve hayvanlarda yaygın olarak görülen bazen de öldürücü olabilen bir hastalıktır. Birçok ülkede yaygın olarak görülen bu hastalık, Türkiye'de de gerek insan gerek hayvan sağlığı, gerekse ekonomik açıdan önemli bir sorun oluşturmaktadır. Özellikle yeni oluşmakta olan kistlerin radyografi ve ultrasonda tespit edilmesi oldukça güç olup, klinik semptomlarının ve parazitolojik bulgularının spesifik

olmaması hastalığın teşhisinde sıkıntılar yaratmaktadır. Hastalığın erken tanısı şüphesiz tedavi şansını da artırmaktadır (1, 3).

Kanda eozinofil artışının önemli nedenlerinden biri paraziter hastalıklardır. Deri hastalıkları (ekzama, kabarcıklı dermatoz), alerji, diatezik hastalıklar, retikülo-endotelyaz ve bazı ilaçlarla (kimyasal-antibiyotik, hormonal) tedavi gibi çok değişik nedenler ile kanda hipereozinofili gelişebilmektedir. Ancak bu hastalıkların ve ilaçların etkisiyle gelişen eozinofili genellikle düzenli değildir ve ortaya çıkan eozinofili eğrisinin görünümü testere dişleri şeklindedir. Bu özellikleri ile paraziter olmayan nedenlerle oluşabilen hipereozinofililer paraziter eozinofililerden ayırt edilebilmektedir (18).

Eozinofilinin muhtemel bir helmint enfeksiyonunun varlığına işaret ettiği bildirilmiş ve eozinofili görülen parazit hastalıklarının tanısının kolay olduğu ifade edilmiştir (8, 12). Eozinofil lökositler helmint enfeksiyonlarında ve alerjik olgularda sitotoksik efektör hücre olarak görev yapmaktadırlar. Parazitlerle enfekte konaklarda eozinofillerin üzerinde yüzey IgE antikorları saptanmıştır. Bu antikorların görevi parazitlerin eozinofiller tarafından öldürülmesini sağlamaktır (5).

Geliş tarihi/Submission date: 06 Ocak/06 January 2005

Düzeltilme tarihi/Revision date: 14 Şubat/14 February 2005

Kabul tarihi/Accepted date: 28 Şubat/28 February 2005

Yazışma /Corresponding Author: Sami Şimşek

Tel: (+90) (424) 237 00 00/6454 Fax: (+90) (424) 238 81 73

E-mail: ssmsek@firat.edu.tr

Türkiye’de çiftlik hayvanlarında hidatidosise karşı oluşmuş antikorlar yapılan çeşitli serolojik çalışmalarla araştırılmış; ELISA ve IFA teknikleri uygulamalarının kolay ve maliyetlerinin düşük olması nedeniyle tercih edilmiştir (6, 15, 16). Sığır hidatidosisinin yaygınlığını belirlemeye yönelik çalışmalar genelde mezbahada kesimin takibine yönelik olup, Doğu Anadolu Bölgesindeki sekiz ilde yürütülen ve serolojik temellere dayalı bir çalışmada ortalama seroprevalansın ELISA ile %63,6, IFAT ile %54,9 olduğu bildirilmiştir (6).

Bu çalışmada eozinofil seviyesi ile sığırlarda hidatidosise karşı oluşmuş antikor düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Test Serumları: Araştırmanın materyalini, 2001 yılı içerisinde Doğu Anadolu Bölgesinde bulunan sekiz ilden toplanan sığır serumları ve perifer kan frotileri oluşturmuştur. Bu amaçla; Doğu Anadolu Bölgesindeki değişik illerden toplanan 597 adet 1 yaşın üstündeki sığır serumu ve bunlara ait perifer kan frotileri çalışmaya dahil edilmiştir. Bu serumlar değişik yaş ve ırktaki sığırlardan vakumlu tüplere alınan kanlardan ayrılmış ve kullanıncaya kadar -20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Perifer kan frotileri kulak ucundan alınan bir damla kan ile hazırlanmış, metil alkolde tespit edildikten sonra %5’lik Giemsa boyası ile boyanmıştır. Bütün frotiler mikroskopta incelenmiş ve absöüt eozinofil sayısı belirlenmiştir. Kandaki şekilli elemanların sayımı neticesinde; %5 ve altı normal eozinofili, %6 - 10 arası orta derecede eozinofili, %11 ve üstü ise hipereozinofili olarak değerlendirilmiştir (14).

Antijen Hazırlanması: İndirekt Floresan Antikor (IFA) testinde antijen olarak bütün protoskoleks antijeni kullanılmıştır. Bu amaçla sığırlardan elde edilen hidatik kistli karaciğerlerdeki fertil kistlerden bir enjektör yardımıyla kist sıvısı çekilmiş, bir mezürde çöktürüldükten sonra protoskoleksler serum fizyolojik içinde tüplere aktararak her defasında serum fizyolojik değiştirilmek suretiyle 1000 devirde 3 kez 5’er dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra tüplerin üzerindeki sıvı çekilerek atılmış ve dipte kalan protoskolekslerin üzerine %10’luk formol solüsyonu ilave edilerek 1 ml’de ortalama 5000 protoskoleks olacak şekilde sulandırılmıştır. Üzerine antijen damlatılacak olan lamalar iyice temizlendikten sonra üzerine elmas uçlu kalemle 6 adet daire çizilmiştir. Daha sonra tüpler içerisindeki protoskoleksler vorteks ile sürekli karıştırılırken aynı anda mikropipetler yardımıyla lamalar üzerindeki dairelere damlatılmış ve bunlar oda ısısında kurutulduktan sonra saklama kaplarına konularak kullanıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır (15).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testi için kısmi purifiye kist sıvısı antijeni hazırlanmıştır. Bu amaçla koyun hidatik kist sıvısından Antijen-B’den zengin fraksiyonlar elde edilmiştir. Bu aşamada Oriol ve ark’nın (9) bildirdiği prosedür takip edilmiştir. Öncelikle hidatik kist ile enfekte, fertil bir

koyun karaciğeri laboratuvara getirilmiş ve kist sıvısı çekilerek bir mezürde toplanmış ve protoskoleks ve diğer partiküllerin çökmesi için bir süre beklenmiştir. Müteakiben supernatant alınıp bir gece +4 °C’de 0.005 M acetate tamponuna (pH=5.0) karşı diyaliz edilmiştir. Daha sonra kist sıvısı alınarak 15.000 g’de +4°C’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı atılıp pelet, 10 ml 0.2 M fosfat tamponunda (pH=8.0) 15 dakika süreyle sıcak su banyosunda kaynatılmış ve +4 °C’de 1 saat süreyle 20.000 g’de yeniden santrifüj edilmiştir. Dipte kalan pelet atılıp Antijen-B’den zengin supernatant porsiyonlara ayrılarak kullanıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Kontrol Serumları: Mezbahadaki kesim sonrası muayenede karaciğeri veya akciğerinde çok fazla kist hidatik bulunan, bağırsaklarında sestod ve nematod saptanmayan bir sığırdan alınan serum örneği IFAT ile yapılan ön çalışmada yüksek dilüsyonlarda pozitif bulunduktan sonra pozitif kontrol serumu olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol serumu olarak da herhangi bir paraziter enfeksiyonun saptanmadığı 5 aylık bir dandan alınan serumun IFAT ön çalışması yapılarak düşük dilüsyonlarda negatif olduğu saptanmış ve çalışma süresince negatif kontrol serumu olarak kullanılmıştır.

IFA Testinin Uygulanışı: Test, Özcel (10) ve Şenlik (15)’in bildirdiği şekilde yapılmıştır. Serumlar 1/128 oranında sulandırılmış, her hayvan için biri kontrol olmak üzere çift çukur kullanılmıştır. Konjugat (Anti-bovine IgG, FITC, Sigma Immunochemicals Cat. No: F-7887), 1/40 oranında sulandırılmış, yıkamalar PBS ile yapılmıştır. Muayeneden önce lamalar Evans mavisinin 1/5000’lik solüsyonunda 5 dakika bekletilmiş, bunu takiben yıkama işlemi tekrarlanıp kurutulmuş lamalar üzerine 1/9 PBS/gliserin karışımından damlatılarak lamel ile kapatılıp muayeneye hazır hale getirilmiştir. Muayene için Olympus CX31 marka floresan ataçmanlı mikroskop kullanılmıştır. Mikroskopik muayenede protoskolekslerin tamamında yada çevresinde sarı-yeşil floresan görülen olgular pozitif, protoskolekslerin sarı-yeşil floresan vermediği yada kırmızı olarak görüldüğü olgular negatif olarak değerlendirilmiştir.

ELISA’nın Uygulanışı: Bu test, Şimşek ve Köroğlu (16)’nın bildirdiği şekilde yapılmıştır. ELISA plağının (Linbro EIA mikrotitration plate 96 flat bottom Lot No: 805202) her bir kuyucuğuna protein konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde Karbonat/Bikarbonat tamponu ile sulandırılan eriyik antijen-den 100 µl konularak bir gece +4°C’de bekletilmiştir. Bloklama işlemi için 1X PBS ile sulandırılmış %5’lik yağsız süt tozu kullanılmıştır. Serumlar 1/50, konjugat (anti-bovine IgG peroxidase conjugate, Sigma Immunochemicals Cat. No:A7414) ise 1/1000 oranında sulandırılmıştır. Yıkama işlemleri için %0.1 Tween-20 içeren PBS, sulandırmalar için ise %0.02 Tween-20 içeren PBS kullanılmıştır. Substrat ve 15 dakika sonra durdurma solüsyonu eklenen pleyt, ELISA okuyucusunda (Medispec ESR 200 ELISA Reader) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Plağın ilk üç kuyucuğuna negatif

kontrol serumu konulmuş, sonuçlar absorban değerleri olarak alınmış, negatif kontrollerin absorban değerlerinin aritmetik ortalaması +2 standart sapma (X+2SD) değerinin (eşik değer=cut-off) üstü pozitif olarak kabul edilmiştir. Standart sapma SPSS 10.1 istatistik programı ile hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz: Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 10.1 istatistik programında Khi-kare (χ^2) analizi kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan sığır kan frotilerinin değerlendirilmesi sonucu eozinofil sayısı eozinofilik sığırlarda en az %6, en çok %50 olarak sayılmıştır. Eozinofili olmayan sığırlarda ise absöüt eozinofil sayısının %6'nın altında olduğu belirlenmiştir. Perifer kan frotisi incelenen 597 sığırın 79'unun (%13,2) eozinofilik olduğu saptanmıştır. Bu sığırların 37'sinde (%46,8) eozinofil sayısının %6-10 arasında, 42'sinde (%53,2) ise %11 ve üstünde olduğu belirlenmiştir. Absöüt eozinofil sayısı %6-10 arasında olan 37 sığırın 29'unda (%78,3) ELISA ile, 20'sinde (%54) de IFAT ile seropozitiflik saptanmıştır. Bununla birlikte absöüt eozinofil sayısı %11 ve üstü olan 42 sığırın 33'ünde (%78,5) ELISA ile, 28'inde (%66,6) ise IFAT ile seropozitiflik saptanmıştır. Neticede eozinofilik olarak değerlendirilen toplam 79 sığırın 62'sinde (%78,4) ELISA ile, 48'inde (%60,7) ise IFAT ile seropozitiflik elde edilmiştir. Kontrol grubu olarak, eozinofil sayısı %5 ve altı olan normal eozinofilik sığırlar arasından rastgele seçilen 79 sığırın 38'inde (%48,1) ELISA ile, 34'ünde (%43,1) ise IFAT ile seropozitiflik belirlenmiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

Hidatik kist sıvısı, hidatidosisin serodiagnozu için iyi bir antijen kaynağıdır. Fertil kistlerin, elde edildiği konağın türüne bakılmaksızın steril kistlere göre; koyun kist sıvısının diğer türlerin kist sıvılarına göre ve karaciğerdeki kistlerin de diğer organlardakine göre daha antijenik olduğu bildirilmiştir (7). Bu nedenle, fertil koyun karaciğer kist sıvısının içerdiği antijenik fraksiyonların fazlalığı nedeniyle tercih edilebileceği bildirilmiştir (7). Yüksek sensitiviteli tekniklerde purifiye antijenik fraksiyonların kullanılması çapraz reaksiyonları önlemekte, purifiye veya kısmi purifiye antijenlerin serolojik çalışmalarda kullanılması önerilmektedir (4). Bu çalışmada ELISA testi için, fertil hidatik kist ile enfekte bir koyunun karaciğerinden elde edilen kist sıvısından hazırlanan kısmi purifiye kist sıvısı antijeni kullanılmıştır.

Hidatidosisin, floresan antikor tekniği ile teşhisinde antijen olarak, dondurulmuş parazitli doku kesiti, skoleks ve kistik membranın kullanıldığı çalışmalardan olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (2, 6, 10, 15). Doğanay ve ark. (2), IFA testinin koyun hidatidosisinin tanısında koyun kökenli protoskoleksler kullanıldığında %90 sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu, bu oranların insan hidatidosisinde sırasıyla %80 ve %70 olduğunu, bu nedenle insan hidatidosisinin IFAT ile tanısında koyun kökenli protoskolekslerin kullanılmasının

uygun olmadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, bu çalışmada sığır hidatidosisinin IFA testi ile tanısında antijen olarak sığır hidatik kistlerinden elde edilen protoskoleks partikül antijeni kullanılmıştır.

Tablo 1. Eozinofilik olan ve olmayan sığırlarda hidatidosis seropozitifliği

Eozinofil Sayısı (%)	Hidatidosis					
	Eozinofilik Hayvan sayısı		ELISA		IFAT	
	n	%	n	%	n	%
6-10	37	46.8	29	78.3	20	54
11≤	42	53.2	33	78.5	28	66.6
Toplam	79	100	62	78.4 ^a	48	60.7 ^c
Negatif	79	100	38	48.1 ^b	34	43.1 ^d

a, b: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.01$); c, d: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$)

Interleukin 3 (IL-3), granulosit-makrofaj stimülasyon faktörü ve IL-5, eozinofillerin proliferasyon, farklılaşma ve fonksiyonları üzerinde etkilidirler. Özellikle IL-5, eozinofillerin maturasyonunda spesifik etkilere sahiptir (13). Hidatik antijenler tarafından stimüle edilen lenfositlerden salgılanan IL-5'in hidatidosisli hayvanlarda eozinofil proliferasyonunu uyardığı ve bunun da hidatik lezyonlara infiltre olarak regresif hidatik lezyonların oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir (13).

Hidatidosisde invazyon döneminde eozinofil seviyesi yüksek iken kist oluşumu tamamlandıktan sonra normal seviyesine inmekte ve ancak kistin açıldığı durumlarda tekrar yükselmektedir (18).

Hidatik kistlerin yavaş geliştiği, içlerinde protoskoleks ve çimlenme kapsüllerini meydana getirmeye başlamalarının beş ayı bulduğu bildirilmiştir (3). Yine başka kaynaklarda kist formasyonunun domuzlarda 10-12 ay, koyunlarda 10 ay ile 4 yıl arasında sürdüğü ve kistin yılda 1-5 cm arasında değişen oranlarda büyüdüğü belirtilmiştir (17). Bu nedenle özellikle çiftlik hayvanlarında bu kist formasyonu süresince eozinofil seviyesinin yüksek olabileceği dikkati çekmektedir.

Bu çalışmada absöüt eozinofil sayımına göre ELISA testiyle 79 eozinofilik sığırın %78,4'ü seropozitif bulunurken, eozinofilik olmayan 79 sığırdaki bu oran %48,1 olmuştur. Bunun yanı sıra eozinofilik gruptaki seropozitiflik IFAT ile %60,7 iken eozinofilik olmayan grupta %43,1 olmuştur. Çalışmada uygulanan her iki test ile de eozinofiliye paralel olarak seropozitifliğin arttığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, çiftlik hayvanlarında periyodik olarak yapılacak kan muayeneleri neticesinde eozinofilik olarak belirlenen hayvanların hidatidosis bakımından gözlem altında bulundurulması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Barış İ, Şahin A, Bilir N, Kalyoncu AF, Emri AS, Akhan O, Barış B, Çopur AS, Selçuk ZT**, 1989. Hidatik Kist Hastalığı ve Türkiye'deki Konumu. Türkiye Akciğer Hastalıkları Vakfı Yayını No:1, Ankara.
2. **Doğanay A, Burgu A, Tanyüksel M, Sarımehtemioğlu O, Gönenç B, Kozan E, Yıldırım A**, 2001. İnsan ve koyunlarda hidatidozun indirekt floresan antikor tekniği ile teşhisi. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü, Proje No: 2000-08-10-023. Son rapor, Ankara.
3. **Güralp N**, 1981. Helmintoloji. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları. 368. İkinci baskı.
4. **Kaur M, Mahajan RC, Malla N**, 1999. Diagnostic accuracy of rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of human hydatidosis. *Indian J Med Res*, 110: 18-21.
5. **Kojima S, Yokogawa M, Tada T**, 1972. Raised levels of serum IgE in human helminthiasis. *Am J Trop Med Hyg*, 21 (6): 913-918.
6. **Köroğlu E, Dumanlı N, Şimşek S, Aktaş M, Şaki CE, Altay K**, 2004. Doğu Anadolu Bölgesindeki bazı illerde sığırlarda hidatidosisin ELISA ve IFAT ile araştırılması. Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Projesi (FÜBAP-704), Son rapor, Elazığ.
7. **Lightowers MW, Gottstein B**, 1995. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. Thompson RCA, Lymbery AJ. eds. *Echinococcosis and Hydatid Diseases*. Oxon: CAB International. p. 355-410.
8. **Markel EK, John DT, Krotoski WA**, 1999. Immunodiagnostic techniques. In: *Markel and Woge's Medical Parasitology* (8th ed.). WB Saunders Company. Philadelphia. pp 473-480.
9. **Oriol R, Williams JF, Perez-Esandi MV, Oriol C**, 1971. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg*, 20: 569-574.
10. **Özcel MA**, 1978. İmmunofloresans ve Parazitolojide Uygulanması. Ege Üniv. Matbaası, Bornova, 13-151, İzmir.
11. **Rickard MD, Lightowers MW**, 1986. Immunodiagnosis of Hydatid Disease. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson RCA (Ed). George Allen and Unwin. 217-249. London,
12. **Rothenberg ME**, 1998. Eosinophilia. *N Eng J Med*, 388: 1593-1600.
13. **Sakamoto T, Cabrera PA**, 2003. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. *Acta Tropica*, 85: 271-279.
14. **Swenson MJ, Reece WO**, 1993. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Cornell University Pres, 11th Edition, Ithaca and London.
15. **Şenlik B**, 1998. Bursa yöresi koyunlarında İndirekt Floresan Antikor (IFA) ve İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) testleriyle hidatidozun seroprevalansı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Uludağ Üniv. Sağlık Bil. Enst. Parazitoloji A.B.D. Bursa.
16. **Şimşek S, Köroğlu E**, 2004. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for immunodiagnosis of hydatid diseases in sheep. *Acta Tropica*, 92 (1): 17-24.
17. **Thompson RCA**, 1986. Biology and Systematics of Echinococcus. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson RCA (ed). Allen&Unwin, pp. 5-43, London.
18. **Üner A, Turgay N**, 1995. Parazit hastalıklarında eozinofili. *T Parazitol Derg*, 19 (3): 420-432.