

Kistik Echinococcosis’de Canlılık Tayininde Kullanılan Çeşitli Boyama Yöntemlerinin İstatistiksel Analizi

Alparslan YILDIRIM, Anıl İÇA, Önder DÜZLÜ, Abdullah İNCİ

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZET: Kistik echinococcosis’de canlılık tayini, *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yanı sıra ilaç denemelerine yönelik çalışmalarda da önem arz etmektedir. Fertil kistlerde protoskolekslerin canlılık oranlarını saptamak amacıyla Neutral red, Methylene blue, Eosin, Papanicolao, Giemsa, Ziehl-Neelsen, Toluidine blue ve Trypan blue gibi çeşitli vital ve avital boyalar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, son yıllarda canlılık tayininde daha sık kullanılan Trypan blue, Eosin ve Methylene blue boyama yöntemleri ile 10 farklı fertil kistte canlılık tayini yapılmıştır. Her bir kist için sözü geçen her bir boyama yöntemi ile 2000 protoskoleks canlılık yönünden incelenmiştir. Elde edilen veriler One-way Anova varyans analizi testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İncelemesi yapılan kistlerde; Trypan blue boyama yönteminde ortalama canlı protoskoleks sayısı $1430 \pm 172,9$ (1150–1709), Methylene blue boyama yönteminde $1376,4 \pm 101,1$ (1169–1521) ve Eosin boyama yönteminde ise $1342 \pm 147,9$ (1119–1608) olarak saptanmıştır. En yüksek canlılık oranı %71,5 ile Trypan blue boyama yönteminde saptanmış, bunu %68,8 ile Methylene blue ve %67,1 ile Eosin boyama yöntemleri takip etmiştir. Yöntemler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). Sonuç olarak hidatid kistlerin canlılık tayininde her üç boyama yönteminin de benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Echinococcosis, koyun, protoskoleks, canlılık

Statistical Analyses of Different Staining Methods for Viability Assessment in Cystic Echinococcosis

SUMMARY: The viability assessment in cystic echinococcosis is important for *in vitro* and *in vivo* studies and also drug experiments. Several vital and avital stains like neutral red, methylene blue, eosin, Papanicolao, Giemsa, Ziehl-Neelsen, toluidine blue and trypan blue have been used to assess viability of protoscolexes in fertile cysts. In this study, the viability of 10 different fertile cysts were analyzed by trypan blue, eosin and methylene blue staining techniques which have been used frequently in recent years. A total of 2000 protoscolexes per hydatid cyst were examined by all three staining techniques. The obtained results were analyzed statistically by the one-way ANOVA test. The mean numbers of viable protoscolexes in examined cysts according to trypan blue, methylene blue and eosin staining techniques were $1430 \pm 172,9$ (1150–1709), $1376,4 \pm 101,1$ (1169–1521) and $1342 \pm 147,9$ (1119–1608), respectively. The highest viability rate was determined with the trypan blue staining technique (71.5%), followed by 68.8% with methylene blue and 67.1% with eosin. No statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed among the staining techniques. As a result, it was found that all three staining methods have similar results in viability assessment of hydatid cysts.

Key Words: Echinococcosis, sheep, protoscolex, viability

GİRİŞ

Kistik echinococcosis (CE), köpek ve diğer karnivorların ince bağırsaklarında bulunan *Echinococcus granulosus*’un larvası (kist hidatid) tarafından, insan dahil bir çok memelinin çeşitli organ ve dokularında oluşturulan paraziter bir enfeksiyondur (8). CE dünyada tropikal ve ılıman iklim kuşağında bulunan ülkeler (3, 25) ile birlikte Türkiye’de de (2, 11, 24, 27) oldukça

ya yaygınlık göstermekte, büyük ekonomik kayıplara ve halk sağlığı problemlerine yol açmaktadır. Hidatid kistlerin çeşitli arakonaklardaki fertilitate oranları hastalığın epidemiyolojisinde oldukça önem arz etmekte olup arakonak türü ve yaşı, coğrafik bölge ile parazit suşu gibi çeşitli faktörlere göre değişiklik göstermektedir (7, 19). CE’nin epidemiyolojisi ve kistlere karşı ilaç denemeleri üzerine birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma bulunmaktadır (5, 21, 26, 28). Bu tip çalışmalarda canlılık oranının belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu amaçla kullanılan Neutral red, Methylene blue, Eosin, Papanicolao, Giemsa, Ziehl-Neelsen, Toluidine blue ve Trypan blue gibi çeşitli vital ve/veya avital karakterli boyama yöntemlerinin

Geliş tarihi/Submission date: 15 Aralık/15 December 2006

Düzeltilme tarihi/Revision date: 27 Mart/27 March 2007

Kabul tarihi/Accepted date: 28 Mart/28 March 2007

Yazışma /Corresponding Author: Alparslan Yıldırım

Tel: (+90) (352) 338 00 05 Fax: -

E-mail: yildirima@erciyes.edu.tr

3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi’nde (06–09 Eylül 2006, Samsun) sunulmuştur.

yanı sıra scoloidal aktivite ve alev hücrelerinin (flame cell) motilitésinin belirlenmesi gibi çeşitli teknikler de kullanılmaktadır (5, 12, 15, 20).

Bu çalışma, son zamanlarda fertil kistlerde canlılık oranını saptamak amacıyla yaygın olarak kullanılan Trypan blue, Eosin ve Methylene blue boyama yöntemleri ile fertil kistlerde saptanan canlılık oranları arasındaki istatistiksel farklılıkların araştırılması amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Kayseri merkezinde bulunan mezbahalarda, kesim sonrası kist hidatik ile enfekte saptanan üç yaş üzeri 10 koyuna ait karaciğer örnekleri, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD laboratuvarına getirilmiştir.

Enfekte organlardaki hidatik kistler karakterize (Normal, Kazeifiye, Kalsifiye) edildikten sonra kistlerin içindeki sıvı steril enjektörle çekilmiş ve steril deney tüplerine aktarılmıştır. Makas ile açılan kistlerin germinal membranları ayrı petrilere alınmıştır. Kist sıvıları ve germinal membranlar stero ve ışık mikroskobu altında protoskoleks varlığı yönünden incelenerek, kistler fertil veya steril olarak ayrılmıştır. Farklı koyun karaciğerlerinden fertil olarak belirlenen toplam 10 adet kistte Trypan blue (10, 12), Methylene blue (5, 12) ve Eosin (12, 20) boyama yöntemleri ile canlılık tayini yapılmıştır. Her fertil kist için her bir boyama yöntemi ile 2000 adet protoskoleks canlılık yönünden incelenmiştir.

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 13.0 yazılımında One-way Anova varyans analizi testi ile yapılmıştır.

BULGULAR

İncelenen 10 enfekte koyun karaciğerinde toplam 103 adet kist saptanmıştır (Şekil 1). Saptanan kistlerin karakterleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Fertil bulunan 10 adet kistte Trypan blue boyama yöntemi ile yapılan canlılık tayininde (Şekil 2) ortalama canlı protoskoleks sayısı $1430 \pm 172,9$ (%71,5), Methylene blue boyama yöntemi ile (Şekil 3) $1376,4 \pm 101,1$ (%68,8) ve Eosin boyama yöntemi ile (Şekil 4) $1342 \pm 147,9$ (%67,1) olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Kistik echinococcosis'de canlılık tayininde kullanılan Trypan blue, Methylene blue ve Eosin boyama yöntemleri arasındaki farklılık Tablo 2'de görüldüğü gibi istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

TARTIŞMA

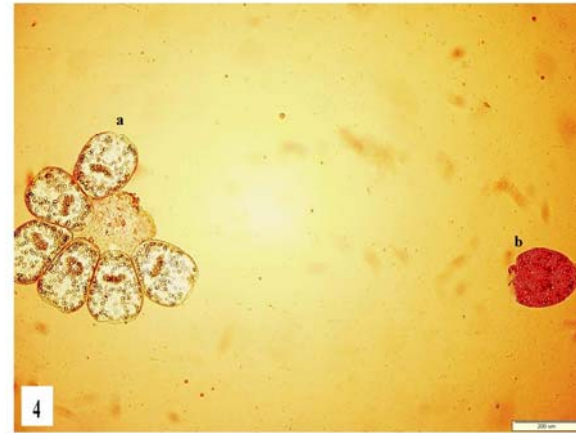
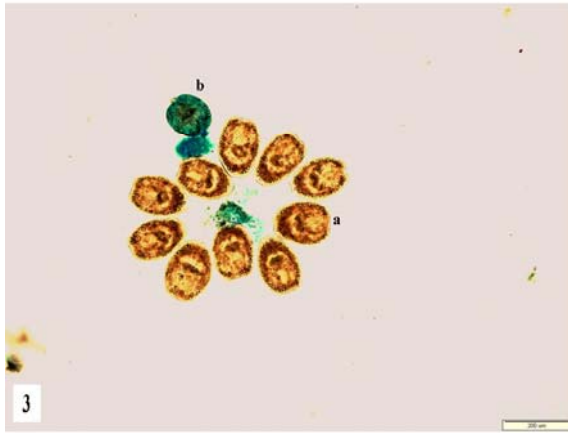
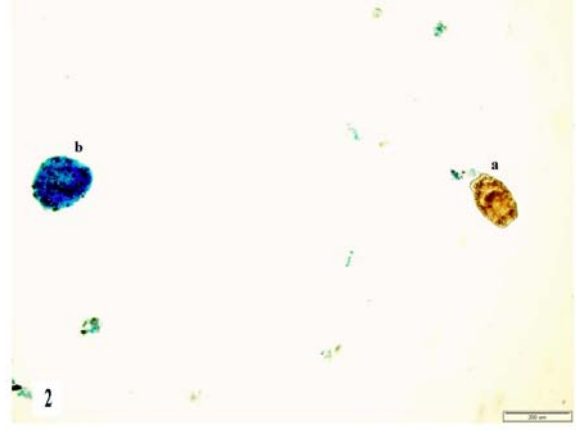
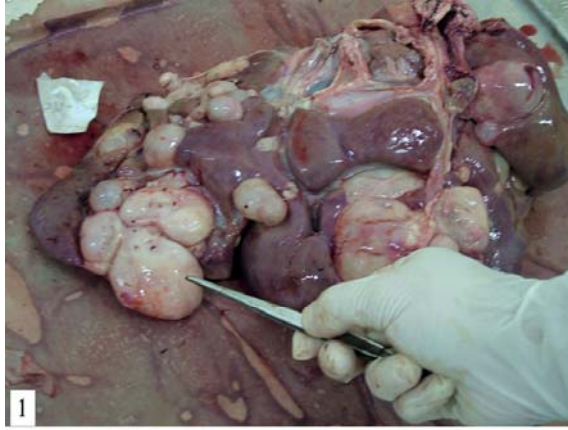
Kistik echinococcosis'in insan, koyun, keçi ve sığır gibi arakonaklardaki prevalansı, enfekte köpekler tarafından çıkarılan *E. granulosus*'un yumurtaları ile çevresel kontaminasyonla ilişkilidir (8, 19). Çeşitli herbivorlarda hidatik kistlerin prevalansı ve fertilesi ile ilgili veriler, coğrafik bölgeye göre köpeklerdeki enfeksiyon açısından potansiyel kaynak teşkil eden hayvan türleri hakkında güvenilir göstergeler sağlamaktadır. Koyunlarda, dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan ça-

lışmalara göre hidatik kistlerin fertilité oranlarının özellikle yaş, yerleşim yeri ve suş farklılıklarına bağlı olarak değışkenlik gösterdiği dikkati çekmektedir. Koyunlarda fertil kist oranları çeşitli çalışmalara göre Yunanistan'da %51 (14), Ürdün'de %38,1-76,3 (1, 17), İran'da %88 (16), Irak'ta %64 (22) ve Libya'da %35-40 (19) olarak bildirilmiştir. Dueger ve Gilman (9), koyunlarda ortalama fertil kist oranını %41,1 olarak bildirmişler ve bu oranın 6 yaş üzeri koyunlarda %47,7'ye çıktığını kaydetmişlerdir. Parazitın yaşam döngüsünde esas olarak 3 yaş üzeri koyunların önem arz ettiğini belirten araştırmacılar (9), kontrolde bu noktaya dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Türkiye'de koyunlarda CE prevalansı ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın hidatik kistlerin fertilité ve canlılık oranları üzerine çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Güralp ve Doğru (13), en yüksek fertilité oranını %98,4 ile 5 yaşındaki koyunlarda, en düşük ise %10 ile 2 yaşındaki koyunlarda belirlediklerini, bu oranın 3 yaşındakilerde %40,9, 4 yaşındakilerde %95,6, 6 yaş ve üzeri koyunlarda ise %97,1 olduğunu kaydetmişlerdir. Şenlik (23), en yüksek fertilité oranını %65,1 ile 4 yaşlı koyunlarda, en düşük ise %52,1 ile 2 yaşlı koyunlarda saptamış, tüm yaş gruplarında ortalama fertilité oranını %31,2 olarak bildirmiştir. Yıldız ve Gürcan (27), kist hidatikle enfekte koyunlarda fertilité oranını karaciğer ve akciğerdeki kistler için sırasıyla %81,5 ve %76,5 olarak kaydetmişlerdir. Bu çalışmada ise 3 yaş üzeri koyunlarda saptanan hidatik kistlerin %30,1'i fertil bulunmuştur. Bu fertilité oranının bazı araştırmacıların (1, 9, 19, 23) bulguları ile benzerlik gösterdiği, diğer bazılardan (16, 17, 27) ise düşük olduğu görülmüştür.

Hidatik kistlerde fertilitenin doğru bir şekilde belirlenmesi, son konakta enfeksiyon oluşturabilme yeteneğindeki canlı protoskoleks sayısına bağlıdır (9, 22). Çeşitli vital ve avital histokimyasal boyalar, hücre kültürlerinde canlılık muayenelerinde kullanılmalarının (10) yanı sıra bir çok protozoon ve helmintlerin belirli formlarının canlılıklarını saptamak amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır (4-6, 12). Trypan blue, Methylene blue ve Eosin boyama yöntemleri de kistik echinococcosis'in canlılık tayininde sıklıkla kullanılan avital boyama yöntemlerindedir (5, 12, 20).

Walker ve ark., (26) koyunlarda saptadıkları kistlerde Trypan blue boyama yöntemi ile canlılık oranını %85 olarak saptamışlardır. Benzer şekilde Himonas ve ark., (14) koyunlarda saptadıkları fertil kistlerin canlılık oranını %81,3 olarak bildirmişlerdir. Dueger ve Gilman (9), fertil kist oranını en yüksek 6 yaş üzeri koyunlarda saptamalarına karşın, tüm yaş gruplarında ortalama %73,2 olarak buldukları canlılık oranının 6 yaş üzeri koyunlarda %68,3'e düştüğünü, en yüksek oranın %89,9 ile 3 yaş grubunda olduğunu belirtmişlerdir. Yıldız ve Gürcan (27), koyunlarda saptadıkları hidatik kistlerden akciğerdekilerin ortalama 5.800, karaciğerdekilerin ise 12.400 canlı protoskoleks ihtiva ettiğini kaydetmişler, eosin boyama



Şekiller 1. Kist hidatik ile enfekte koyun karaciğeri; **2.** Trypan blue boyama yöntemi ile saptanan canlı (a) ve ölü (b) protoskoleksler; **3.** Methylene blue boyama yöntemi ile saptanan canlı (a) ve ölü (b) protoskoleksler; **4.** Eosin boyama yöntemi ile saptanan canlı (a) ve ölü (b) protoskoleksler

Tablo 1. Enfekte koyun karaciğerlerinde saptanan hidatik kistlerin karakterleri

(Koyun) n=10	Saptanan Kist Sayısı	Fertil kist		Steril kist		Kazeifiye kist		Kalsifiye kist	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Karaciğer	103	31	30,1	28	27,2	7	6,8	37	35,9

Tablo 2. Boyama yöntemlerine göre saptanan canlı protoskoleks sayıları ve istatistiksel analizleri

Yöntem	İncelenen Protoskoleks Sayısı/kist	Canlı Protoskoleks sayısı					F	P
		Min.	Max.	Ort.	Std.Sap.	%		
Trypan Blue	2000	1150	1709	1430	172,88	71,5		
Methylene Blue	2000	1169	1521	1376,4	101,05	68,8	0,952	0,398*
Eosin	2000	1119	1608	1342	147,87	67,1		

F: Varyans analiz, *: p>0,05

yöntemi ile canlılık oranını karaciğerdeki kistlerde %47,5 akciğerdeki kistlerde ise %38,7 olarak bildirmişlerdir. Zanini ve ark., (28) koyunlarda saptadıkları hidatid kistlerin Eosin boyama yöntemi ile yaptıkları canlılık tayininde, canlılık oranını %14,9 olarak bildirmişler, ancak bu oranın kist çapının 30 mm'den büyük olduğu durumlarda %57,7'ye ulaştığını kaydetmişlerdir. Bu çalışmada Zanini ve ark., (28)'nin bulguları dikkate alınarak kist çapı 30 mm'den büyük olan fertil kistler araştırmaya dahil edilmiştir. Fertil kistlerde canlılık oranı en yüksek %71,5 ile Trypan blue boyama yönteminde saptanmış, bunu %68,8 ile Methylene blue ve %67,1 ile Eosin boyama yöntemlerinin takip ettiği görülmüştür. Ancak yöntemler arasında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Ortaya çıkan bu canlılık oranlarının bazı araştırmacıların (9, 14, 26-28) bulguları ile paralellik gösterdiği dikkati çekmiştir.

Sonuç olarak hidatid kistlerin canlılık tayininde yaygın olarak kullanılan her üç boyama yönteminin de benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Abo-Shehada MN**, 1993. Some observations on hydatidosis in Jordan. *J Helminthol*, 67: 248-250.
2. **Akyol ÇV**, 2004. *Echinococcus* türlerinin epidemiyolojisi. Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. eds. *Echinococcosis*. İzmir: Hidatidoloji Derneği Yayın No:1. pp. 259-283.
3. **Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR**, 2006. Global socioeconomic impact of Cystic echinococcosis. *Emerging Infect Dis*, 12: 296-303.
4. **Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV**, 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl Environ Microbiol*, 58: 3488-93.
5. **Casado N, Rodríguez-Caabeiro F, Hernández S**, 1986. In vitro survival of *Echinococcus granulosus* protoscolices in several media, at 4 °C and 37 °C. *Z Parasitenkd*, 72: 273-278.
6. **Céu Sousa MC, Gonçalves CA, Bairos VA, Póiares-da-Silva J**, 2001. Adherence of *Giardia lamblia* Trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8: 258-265.
7. **Dalimi A, Motamedi GH, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, Ghaffari Far F**, 2002. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol*, 105: 161-167.
8. **Dar FK, Al-Karmi T**, 1997. Public health aspects of cystic echinococcosis in the Arab countries. *Acta Trop*, 67: 125-132.
9. **Dueger EL, Gilman RH**, 2001. Prevalence, intensity, and fertility of ovine cystic echinococcosis in the central Peruvian Andres. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95: 379-383.
10. **Freshney R**, 1987. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York, p.117.
11. **Gıcık Y, Arslan MÖ, Kara M, Köse M**, 2004. Kars ilinde kesilen sığır ve koyunlarda Kistik ekinokokkozis'in Yaygınlığı. *Türkiye Parazit Derg*, 28: 136-139.
12. **Gori S, Campatelli A, Luchi S, Paladini A, Savalli E, Scasso A**, 1993. Cytology in the percutaneous treatment of hydatid cysts. A report of four cases. *Acta Cytol*, 37: 423-426.
13. **Güralp N, Doğru C**, 1971. Ankara mezbahasında kesilen değişik yaşlardaki koyun ve sığırların organlarında görülen ekinokok kistlerinin fertilité durumları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 18: 195-205.
14. **Himonas C, Antoniadou-Sotiriadou K, Papadopoulos E**, 1994. Hydatidosis of food animals in Greece: prevalence of cysts containing viable protoscolices. *J Helminthol*, 68: 311-313.
15. **Hokelek M, Erzurumlu K, Uyar Y, Birinci A**, 1999. The effect of praziquantal as a scolical agent on the protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Turk Hij Den Bio Derg*, 56: 129-134.
16. **Hosseini SH**, 1997. Relationship between the prevalence of hydatid cysts and age of sheep, cattle and goat and the rate of fertility and viability of hydatid cysts. *Tehran J Fac Vet Med*, 52: 99-105.
17. **Kamhawi S, Hijjawi N, Abu-Gazaleh A, Abbas M**, 1995. Prevalence of hydatid cysts in livestock from five regions of Jordan. *Ann Trop Med Parasitol*, 89: 621-629.
18. **Kassai T**, 1999. *Veterinary Helminthology*. Butterworth-Heinemann, Linarce House, Jordon Hill, Oxford, pp. 45-48.
19. **Khan AH, El-Buni AA, Ali MY**, 2001. Fertility of the cysts of *Echinococcus granulosus* in domestic herbivores from Benghazi, Libya, and the reactivity of antigens produced from them. *Ann Trop Med Parasitol*, 95: 337-342.
20. **Njoroge E, Mbithi P, Wachira T, Gathuma J, Gathura P, Maitho TE, Magambo J, Zeyhle E**, 2005. Comparative Study of Albendazole and Oxfendazole in the Treatment of Cystic Echinococcosis in Sheep and Goats. *Intern J Appl Res Vet Med*, 3: 97-101.
21. **Perez-Serrano J, Casado N, Denegri G, Rodriguez-Caabeiro F**, 1994. The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus* in vitro. *Int J Parasitol*, 24: 219-224.
22. **Saeed I, Kapel C, Saida LA, Willingham L, Nansen P**, 2000. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Arbil province, northern Iraq, 1990-1998. *J Helminthol*, 74: 83-88.
23. **Şenlik B**, 2000. Bursa yöresi koyunlarında hidatidoz'un yaygınlığı ve yaş, ırk, cinsiyet ile ilişkisi. *Türkiye Parazit Derg*, 24: 304-308.
24. **Umur Ş**, 2003. Prevalence and economic importance of Cystic echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey. *J Vet Med*, 50: 247-252.
25. **Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW**, 1987. *Veterinary Parasitology*. Longman Scientific and Technical, England.
26. **Walker M, Rossignol JF, Torgerson P, Hempbill A**, 2004. In vitro effects of nitazoxanide on *Echinococcus granulosus* protoscolices and metacestodes. *J Antimicrob Chemother*, 54: 609-616.
27. **Yıldız K, Gurcan S**, 2003. Prevalence of hydatidosis and fertility of hydatid cysts in sheep in Kırkkale, Turkey. *Acta Vet Hung*, 51: 181-187.
28. **Zanini F, Gonzalo R, Perez H, Aparici I, Soto X, Guerrero J, Cerrone G, Elissondo C**, 2006. Epidemiological surveillance of ovine hydatidosis in Tierra del Fuego, Patagonia Argentina, 1997-1999. *Vet Parasitol*, 138: 377-381.