T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL ENFEKTE KOYUNLARDA KİSTİK HİDATİDOZUN ELISA VE IFAT İLE TEŞHİSİ

Nermin IŞIK

DOKTORA TEZİ

PARAZİTOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Feyzullah GÜÇLÜ

KONYA-2012

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL ENFEKTE KOYUNLARDA KİSTİK HİDATİDOZUN ELISA VE IFAT İLE TEŞHİSİ

Nermin IŞIK

DOKTORA TEZİ

PARAZİTOLOJİ (VET) ANABİLİMDALI

Danışman

Prof. Dr. Feyzullah GÜÇLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102042 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2012

ÖNSÖZ

Bu araştırmanın yapılmasında araştırmayı maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne, danışman hocam Prof. Dr. Feyzullah GÜÇLÜ'ye, serolojik çalışmaların her aşamasında bana destek olan hocam Prof. Dr. Ferda SEVİNÇ'e ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK'e, istatistik konusunda elinden gelen tüm yardımı yapan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Enver YAZAR'a, çalışmanın her aşamasında yanımda olan Arş. Gör. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ'ye, nekropsi ve histopatoloji konularındaki yardımlarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Orhan YAVUZ' a ve materyal teminindeki yardımlarından dolayı Bahri Dağdaş Uluslarası Tarımsal Araştırma Enstitü'sünde görev yapan Vet. Hek. Hüseyin BAŞ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ **1**

1.1. Tarihçe 2

1.2. *Echinococcus* Türlerinin Sınıflandırılması ve Morfolojileri 3

1.2.1. *E. granulosus*'un Larvası 6

1.2.2. *E. multilocularis* Larvası 7

1.3. *E. granulosus*'un Biyolojisi 8

1.4. Hidatidozun Yaygınlığı 10

1.4.1. Hidatidozun Dünyadaki Yaygınlığı 10

1.4.2. Hidatidozun Türkiye'deki Yaygınlığı 11

1.5. Patogenez ve Klinik Belirtiler 11

1.6. Hidatidozun Ekonomik Önemi 12

1.7. Teşhis 14

1.8. Tedavi 16

1.9. Korunma ve Kontrol 18

1.10. *Echinococcus* Cinsinin Moleküler Karakterizasyonu 20

1.11. Hidatidozda İmmünite 21

1.12. Kistik Ekinokokkozisin Teşhisinde Kullanılan Testler 26

1.12.1. Casoni Testi (intra dermal-ID) 26

1.12.2. Komplement Birleşme Reaksiyonu (KBR) 27

1.12.3. Indirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) 27

1.12.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 30

1.12.5. Indirekt Hemaglütinasyon Testi (IHAT**)** 34

1.12.6. Lateks Aglütinasyon Testi (LAT) 35

1.12.7. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 35

1.12.8. Western Blotting (Immunoblot) 36

1.12.9. Immundifüzyon (ID) ve Immunoelektroforez (IE) 36

2. GEREÇ VE YÖNTEM **38**
2.1. Deneysel Enfeksiyon 38
2.2. Laboratuvar Çalışmaları 38
2.1.1. Serumların Elde Edilmesi 38
2.3. ELISA testi 39
2.3.1. Plakların antijenle kaplanması 41
2.3.2. Testin uygulanışı 41
2.3.3. Sonuçların değerlendirilmesi 42
2.4. IFA Testi 42
2.4.1. Bütün protoskoleks antijeninin hazırlanması 43
2.4.2. Testin uygulanışı 43
2.5. DNA Ekstraksiyonu 44
2.5.1. PZR analizinde kullanılan ayraçlar 46
2.5.2. Elektroforez işleminde kullanılan solüsyonlar 46
3. BULGULAR **48**
4. TARTIŞMA **56**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **65**
6. ÖZET **67**
7. SUMMARY **68**
8. KAYNAKLAR **69**
9. EKLER **76**
EK-A: Etik Kurul Raporu
10. ÖZGEÇMİŞ **77**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgB	: Antijen B
Arc 5	: Antijen 5
CIEP	: Counter Immunoelectrophoresis
EITB	: Enzyme Linked Immunoelectrotransfer Blot
ELİSA	: Enzime-linked Immunosorbent Assay
HCF	: Hidatik kist sıvısı
ID	: İmmundifüzyon
IE	: İmmünelektroforez
IFA	: İndirekt Fluoresan Antikor
IgG	: İmmünglobulin G
IHA	: İndirekt Hemaglütinasyon
IL	: İnterlökin
INF	: İnterferon
MR	: Manyetik Rezonans görüntüleme
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PX	: Protoskoleks Antijen
SDS PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
USG	: Ultrasonografi

1. GİRİŞ

Bütün dünyada hem insanların hem de evcil hayvanların sağlığını tehdit eden hidatidoz (kistik ekinokokkozis) Türkiye'deki paraziter zoonozların en önemlilerinden birisi olup, özellikle kırsal bölgede yaşayan insan ve hayvanlarda oldukça sık rastlanan bir hastalıktır.

'Echinococcus' enfeksiyonlarında uygulanan kontrol programlarının başarıya ulaşması açısından hastalığın ara konak hayvanlardaki tanısı büyük önem taşımaktadır. Hidatidozun eradike edildiği ülkelerde, ithal edilen enfekte hayvanlar hastalığın yayılmasında potansiyel bir risk olduğundan dolayı bu hayvanların hastalık açısından izlenmesi mücadelede oldukça önem taşımaktadır (Şenlik 2004).

Hidatidozda hastalığa spesifik klinik semptomların olmaması nedeniyle klinik tanı koymak çok zordur. Bu nedenle tanıda spesifik antikor yanıtının belirlenmesini amaçlayan serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik testlerin tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü kullanılan antijenin cinsi ve kalitesine, kistin canlılığı ve lokalizasyonuna göre değişmektedir. Enzyme-Linked Immünosorbent Assay (ELISA), Indirekt Hemaglütinasyon (IHA), Indirekt Fluoresan Antikor (IFA), Western Blot, Immundifüzyon (ID) ve Immünelektroforez (IE) serodiagnoz amacıyla kullanılan temel testlerdir (Altıntaş ve Yazar 1999). Türkiye'de insanlarda hidatidozun serolojik yöntemlerle teşhisine yönelik sınırlı sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır. Hayvanlarda ise bu konuda yapılmış serolojik çalışma sayısı oldukça azdır (Aykol 1987, Dik ve ark 1998, Şenlik 2000, Doğanay ve ark 2003, Şimşek ve Köroğlu 2004, Şimşek ve ark 2005). Canlı hayvanlarda bu hastalığın teşhisinde serolojik testlerden faydalanmak mümkündür. Bu testlerin hayvanlardaki kullanımı genellikle hastalığın prevalansını araştırmak için yapılmıştır.

Hastalığın erken teşhisinin mümkün olması durumunda, tedavi uygulamalarından daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi nedeniyle, enfeksiyonun erken dönemlerinde hastalığı spesifik olarak tespit edecek teşhis araçlarının geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu araştırma Kistik Hidatidozun serolojik teşhisinde IFA ve ELISA testlerinin duyarlılıklarını belirlemek ve bu testlerle hastalığın erken teşhisinin mümkün olup olmadığını ortaya koymak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla 10 adet

koyun deneysel enfeksiyona tabi tutulmuş ve enfeksiyonun seyri boyunca her iki testle parazite spesifik antikorlar yönünden muayene edilmiştir.

1.1. Tarihçe

Hidatidoz hakkındaki bilgiler çok eski zamanlara dayanmaktadır. *Echinococcus granulosus*'un larval dönemi olan hidatik kistler ilk kez M.Ö. 460-377 yıllarında yaşayan Hipokrat tarafından sığır ve domuzlarda bildirilmiş, insan karaciğerinde saptanan hidatik kist 'su kesesi' olarak tanımlanmıştır. 1684'te Francesco Redi, 1685'te Hartmann, 1691'de Tyson hidatik kistin hayvansal özellikte olduğunu ilk kez bildiren gözlemcilerdir (Unat 1991).

1694'te Hartmann tarafından ilk kez köpekte parazitin erişkin şeklinin görüldüğü kabul edilmektedir. Palas 1760'da ekinokok kesesinin parazitik özelliğini bildirmiş, 1766'da da insan ve hayvanlardaki kistlerin yapısal benzerlikleri üzerinde durarak bütün kistli şekiller için *hydatigena* adını önermiştir. Goeze 1782'de hidatik kistteki skoleksleri ve bunların çengellerini tanımlamıştır. Rudolphi 1801'de köpeklerin ince bağırsaklarında parazitlenen küçük şeritin larva evresi olan hidatik kiste *Echinococcus* adını vermiştir. Von Siebold 1853'de ise sığır ve koyunlardaki hidatik kistleri köpeklere yedirerek ilk kez deneysel olarak parazitin erişkin formlarını elde etmiş ve onları *Taenia echinococcus* olarak isimlendirmiştir (Unat 1991).

1863 yılında Almanya'da Naunyn, İzlanda'da Krabbe ve Finsen insan orjinli kistleri köpeklere yedirerek parazitin olgun formunu elde etmişler, böylece bu parazitin şerit ve kese şekillerinin bir türün iki ayrı gelişim evresine ait şekiller olduğunu ispatlamışlardır. Felix Deve (1901), çeperi yırtılan hidatik kistten çıkan protoskolekslerin dokulara yerleşmesiyle sekonder kistlerin oluştuğunu deneysel olarak göstermiştir (Unat 1991).

Hidatidozun serolojik teşhisi konusundaki ilk araştırmalar 1906'da Gedini, 1908'de Ymaz Apphatie ve Lorentz tarafından yapılmış, 1909'da Weinberg ve Parvu ile Weinberg ve Vieillard komplement fikzasyon metodunun insan ve hayvanlarda kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır (Unat 1991).

Türkiye'de köpeklerde *E. granulosus* araştırması ilk olarak İsmail Hakkı Çelebi tarafından İstanbul'da yapılmış ve 100 köpekten üçünde parazit tespit edilmiştir. Ankara'da yapılan çalışmalarda Pamukçu ve Ertürk (1961), 1933-1960 yılları arasında 169 köpeğin %1,2'sinde *E. granulosus* tespit etmişlerdir. Parazitin yaygınlığını Mimioğlu ve ark (1960) %4, Doğanay (1983) %44 olarak bildirmişlerdir.

Türkiye'de hayvanlarda hidatik kistin yaygınlık oranlarına ilişkin çalışmalar ilk olarak 1956'da Oytun tarafından Ankara, İstanbul, İzmir, Adana ve Mersin mezbahalarında yapılmış ve bu oran koyun ve sığırlarda %50 olarak saptanmıştır (Tınar 2004).

Türkiye'de hayvanlarda hidatik kistin serolojik yöntemlerle teşhisi için yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Aykol (1987) Counter Immünoelectrophoresis (CIEP) ve Çift Difüzyon, Dik ve ark (1998) Indirekt Hemaglütinasyon (IHA), Şenlik (2000) Indirekt Floresan Antikor (IFA) ve Indirekt Hemaglütinasyon (IHA) testlerini, Şimşek ve Köroğlu (2004) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Enzyme-Linked Immunoelectrotransfer Blot (EITB) testlerini koyunlarda uygulamışlardır. Sığırlarda, Şimşek ve ark (2005) ELISA ve IFA testini uygulamışlardır.

1.2. *Echinococcus* Türlerinin Sınıflandırılması ve Morfolojileri

Echinococcus cinsinde toplam 16 tür ve 13 alttür tanımlanmış fakat taksonomide sadece 4 tür geçerli tanıtılmıştır. Taksonomik olarak doğrulanan bu dört tür; *E. granulosus, E. multilocularis, E. vogeli* ve *E. oligarthus*'tur. Beşinci tür olan *E. cruzi, E. vogeli* ve *E. oligarthus* ile kıyaslanmış ve *E. cruzi*'nin *E. oligarthus* ile benzer olduğu bulunmuştur. (Thompson 1995, Şenlik ve Diker 2004). Özellikle son yapılan çalışmalarda doğrulanan diğer türler *E. shiquicus* ve *E. felidis*'dir (Xiao ve ark 2005, Hüttner ve ark 2008).

Echinococcus türlerinin sınıflandırmadaki yeri aşağıdaki gibidir (Thompson 1995, Soulsby 1986).

Ülkealtı : Metazoa
Alem : Platyhelminthes
Sınıf : Cestoda

Alt Sınıf : Eucestoda

Takım : Cyclophyllidea

Aile : Taeniidae (Ludwig, 1886)

Cins : *Echinococcus* (Rudolphi, 1801)

Tür : *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786)

Echinococcus multilocularis (Leucart, 1863)

Echinococcus oligarthrus (Diesing, 1863)

Echinococcus vogeli (Raush ve Bernstein, 1972)

Echinococcus granulosus 2-7 mm uzunluktadır. Başta çift sıra dikenli bir rostellum bulunur. Boyun bölgesi çok kısa olup gövde 3 halkadan oluşmakla birlikte halka sayısı 2-7 arasında değişebilmektedir. Son halka gebe halkadır ve vücudun yarısı kadar veya daha uzundur (Güralp 1981, Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982).

Echinococcuss multilocularis'in olgunları, *E. granulosus*'un erişkin formlarına çok benzemekte ise de genelde 4-5 halkalı olup, son halkanın vücut uzunluğunun yarısından kısa olmasıyla ondan ayrılır (Güralp 1981).

Çizelge 1.2.1. *Echinococcus* türlerinin ayırımında önemli olan bazı morfolojik özellikler (Tiğin ve ark 1991)

Morfolojik özellik	*E. granulosus*	*E. vogeli*	*E.multilocularis*	*E. oligarthrus*
Uzunluk (mm)	2-7	1,2-4,5	1,9-2,9	3,9-5,9
Halka sayısı	3-4	2-6	3	3
Testis sayısı	32-68	14-35	15-46	50-67
Testislerin dağılımı	Genital deliğin ön ve arka tarafında	Genital deliğin ön tarafında	Genital deliğin arka kısmında	Genital deliğin ön kısmında
Genital delik yeri	Halka arka yarısında	Halka ön yarısında	Halka ön yarısında	Halka arka yarısında
Uterus şekli	Yanlara dallı	Yanlara dalsız	Dalsız	Dalsız
Ovaryum şekli	At nalı ya da böbrek şeklinde	Üzüm salkımı	At nalı	At nalı
Çengel sayısı	34-38	14-34	26-40	28-36
Yumurta sayısı	200-800	250-400		

Ekinokok yumurtalarının karnivorlarda bulunan diğer *Taenia* yumurtalarından ışık mikroskobu altında morfolojik olarak ayırt edilememesi bu yumurtaların benzer yapıya sahip tabaka ve membranlardan oluştuğunu göstermektedir. Yumurta oval, kalın kabuklu, kahverengi ve ışınsal çizgili, 28-36 mikron çapındadır. İçinde üç çift çengelli onkosfer adı verilen embriyo bulunmaktadır. Onkosferi fiziksel etkilerden koruyan embriyofor oldukça kalın, geçirgen olmayan ve keratin benzeri bir proteinden oluşan koruyucu tabakadır. Ekinokok yumurtalarının taşıdığı onkosfer *Taenia* yumurtaları onkosferlerinden daha dayanıklı olup, bunların dış çevredeki yaşam süresi, sıcaklık, nisbi nem, güneş ışığı,

toprak yapısı, rüzgar durumu ve bitki örtüsü gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu yumurtalar keratinize embriyofor tabakasından dolayı çevresel sıcaklıklara oldukça dirençlidir. Toprakta kuraklığa ve dona bir yıl direnç göstermekte, formole ise iki hafta dayanmaktadır. Yumurtaların 60 ºC üzerinde ve 70 ºC altındaki ısılarda hemen öldüğü bildirilmiştir (Güralp 1981, Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982, Tiğin ve ark 1991, Thompson 1995).

1.2.1. *E. granulosus*'un larvası

E. granulosus kistleri uniloküler tip kistler olup, küre biçiminde, içi saydam ve steril bir sıvı ile dolu olan, ince çeperli bir kese biçimindedir (Güralp 1981). *Echinococcus* kistlerinin duvarı, içte bir germinal tabaka, onun dışında dayanıklı, elastik, değişik kalınlıkta olabilen hücresiz bir laminar tabaka ve bunun dışında adventisyal (kütiküler) tabakadan oluşmaktadır (Thompson 1995). Çeperinde, içte parazitin oluşturduğu ve kolayca soyulabilen germinatif zar ile kütikül katı, dışta ise konak dokularının oluşturdukları fibröz bağ doku katı bulunur. Germinal zardan, sıvı içinde serbest bulunan ve hidatid kumu adı verilen protoskoleksler, çimlenme kapsülleri, eksojen ve endojen keseler adı verilen kız keseler oluşmaktadır. Bu larva tipinin yapısı dıştan içe doğru aşağıdaki kısımlardan oluşmaktadır;

1. Dışta kütiküler tabaka
2. Kütiküler tabakanın iç yüzünde bulunan germinal zar
3. Çimlenme kapsülleri
4. Protoskoleksler
5. Kız keseler
6. Keseyi dolduran saydam sıvı (Güralp 1981, Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982).

Germinal tabaka erişkin parazitin tegümenti ile benzer özellikleri göstererek tegüment, kas, glikojen depolayıcı ve farklılaşmış hücrelerden oluşmaktadır. Perinükleer tabakadaki farklılaşmamış hücreler ise prolifere olarak kist içine doğru uzayan kapsülleri oluşturur. Bu kapsüller zamanla büyüyerek ortalarında bir boşluk gelişir ve bir sapla kiste bağlı olarak büyürler. Bu boşluğun içinde de yeniden kapsüller oluşur ve çok sayıda protoskoleks gelişir (Thompson 1995).

Germinal tabaka dıştan laminar tabaka ile desteklenmektedir. Laminar tabakanın Periodik Asit Schiff (PAS) boyası ile pozitif boyanması tanıda önemlidir. Laminar tabaka yapı olarak galaktozamin ve glikozamin birleşiminden oluşan polisakkarit protein kompleksi yapısındadır ve parazit orjinli olup, germinal membran tarafından salgılanma yolu ile üretilmektedir. Bu tabaka kistin etrafını sıkıca sararak iç basınç oluşturur. Ayrıca immünolojik bir engel oluşturarak kisti konağın immünolojik reaksiyonlarından korunmakta ancak immünoglobulinlerin geçişine engel olamamaktadır (Thompson 1995).

Adventisyal tabaka gelişmiş canlı kistin etrafını sarar ve postonkosferal gelişmenin ilk dönemlerinde oluşmaya başlamaktadır. Bu reaksiyon, konaklara göre değişik olmakla birlikte çok şiddetli reaksiyonlarda parazitin dejenerasyonuna neden olabilmektedir (Thompson 1995).

Hidatik kistler yavaş bir şekilde gelişmekte ve hayvanlarda hastalık oluşturabilmesi ve semptomların meydana gelmesi uzun yıllar almaktadır. Fertil kistlerin farelerde 6 ay, domuzlarda 10-12 ay, koyunlarda ise yaklaşık 2-4 yıl içinde meydana geldiği bildirilmiştir Hidatik kistlerin yaşam süreleri oldukça uzun olabilmektedir. Bu süre atlarda 16 yıl ve insanlarda 53 yıl olarak belirtilmiştir (Eckert ve ark 2001).

Hidatik kistlerde her zaman protoskoleks bulunmayabilir. Bu tip kistlere steril kist adı verilmektedir. Sığırlardaki kistlerin yaklaşık %90'ında, domuzlardakilerin %20'sinde ve koyunlardakilerin ise %8'inde protoskoleks bulunmayabilmektedir. Steril kist taşıyan organlar, uygun son konaklar tarafından yense bile bunların ince bağırsaklarında *E. granulosus* görülmemektedir. Enfekte hayvanın yaşı, kistin steril veya fertil olma durumunu etkilemektedir (Güralp 1981).

1.2.2. *E. multilocularis* larvası

E. granulosus'dan farklı olan *E. multilocularis* larvası oldukça kompleks bir yapıya sahiptir**.** Multiveziküler yapıda, birbirine yapışık, fakat her birinin kendi membranı, muhafazası bulunan birçok keseden yapılmış olup, etrafını sınırlayan bir adventisyal tabakaya sahip değildir. Konağa ait bu tabaka olmadığından dolayı eksojen ve endojen gelişme gösterebilir. Büyüme germinal tabakanın farklılaşmamış hücrelerinden içe ve dışa doğru gelişir. Germinal tabakadaki hücre filamanları ağı infiltrasyondan sorumludur. İnfiltratif büyümeyi sağlayan germinal tabaka hücreleri

zamanla ince uzun kistik yapılara dönüşürler. Bu tip kistlere en çok sığırlarda rastlanmaktadır (Güralp 1981, Thompson 1995).

1.3. *E. granulosus*'un Biyolojisi

E. granulosus'un erişkinleri köpek, kurt, çakal gibi karnivorların ince bağırsaklarında, larva şekli olan hidatik kist ise koyun, keçi, sığır, domuz ve diğer birçok evcil ve yabani memeli hayvanların ve insanların başta karaciğer ve akciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularında bulunmaktadır (Güralp 1981). Son konaklar kistler içindeki protoskoleksleri alarak, insan ve diğer arakonaklar ise son konak dışkısıyla atılan yumurtaları ağız yoluyla alarak enfekte olurlar. Ara konaklar tarafından alınan yumurtalar mide ve ince bağırsaklardaki enzimlerin etkisi ile açılır, onkosferler serbest kalır. Ekinokok yumurtalarının arakonak ince bağırsaklarında açılması iki evrede meydana gelmektedir:

1. Embriyoforu oluşturan keratin bloklarının parçalanarak onkosfer zarının ortaya çıkması: Embriyoforun parçalanmasında pepsin ve pankreatin gibi protein eritici enzimler rol oynar. Bu sırada onkosfer aktif değildir. Onkosfer membranının açığa çıkmasıyla birlikte safra tuzlarının etkisiyle membran geçirgenliğinde değişiklikler oluşur ve onkosfer aktif hale geçer. Omurgalılardaki safra tuzları bileşimindeki farklılıklar nedeniyle safra tuzlarının ara konak seçiminde rol oynadıkları düşünülmektedir. Ancak yumurtanın bağırsak sistemi dışında da açılabildiği göz önüne alındığında safranın yumurtaların açılması için şart olmadığı ortaya çıkmaktadır.
2. Onkosferin aktif hale geçerek onkosfer zarını delmesi: Aktive onkosfer serbest hale geçtiğinde ritmik hareketlerle ince bağırsak villuslarına tutunur ve onkosfer salgılarının da yardımıyla 30-120 dakika içinde lamina propriaya ulaşır (Üner 1991, Thompson 1995).

Serbest kalan onkosferler venöz kan dolaşımı yoluyla karaciğere taşınırlar. Kılcal damarlardan zengin olan bu organda onkosferin bir kısmı tutulur, tutulmayanlar ise kalbe oradan da akciğerlere ulaşır ve önemli bir bölümü de bu organlarda kalır. Kist hidatiğin karaciğer ve akciğerlerde fazla görülmesinin başlıca nedeni, bu organların, onkosferlerin karşılaştıkları ilk büyük kılcal damar alanlarına sahip olmasıdır. Bu organlarda tutunamayanlar büyük dolaşımla böbrek, dalak, beyin gibi diğer organlara giderek yerleşir. Bunlardan başka kemik iliği boşluklarında,

bağlayıcı doku aralıkları, göz, merkezi sinir sistemi, böbrek ve pankreas gibi birçok organ ve dokuda da rastlanmaktadır. Onkosfer yerleşim göstereceği organa ulaştığında larva dönemi başlamış olur. Onkosferin bir organa yerleşiminden sonra çok hızlı değişim gösterdiği ve 1-14 gün içinde hücre proliferasyonu, onkosfer çengellerinin kaybolması, kas atrofisi, veziküleşme, orta boşluğun şekillenmesi, germinal ve laminar tabakaların oluşması ile larva şekline dönüştüğü bildirilmektedir (Güralp 1981, Thompson 1995).

Tutundukları organın parankimine yerleşen embriyo çıkardığı enzim ile çevresindeki dokuyu eriterek bir vezikül oluşturur. Bu vezikül dördüncü günde 40-50 μm'ye, 20. günde 250 μm'ye ulaşır ve etrafında adventisyal bir membran oluşur. 10. güne doğru çimlenme zarında çekirdek oluşumu başlar. Vezikül dıştan ince bir kütiküle sarılır. 30. güne doğru çevresi doku reaksiyonu ile sarılır ve hidatik kist şekillenir. Beşinci ayda 1 cm çapına ulaşan kistin etrafında ikinci bir membran (germinal membran) şekillenir. Bundan sonraki büyüme daha hızlı olur, enfeksiyonun birinci yılından sonra kistlerin çapı 2 cm'yi geçer ve içlerinde protoskoleksler oluşmaya başlar. Protoskoleksler, germinal membran hücrelerinin proliferasyonuyla oluşan, başlangıçta bir sap ile membrana bağlı olan, çok sayıda çengel taşıyan rostellum taslağının invagine olduğu, kalsiyum granülleri bulunan hafif oval formlardır (Merdivenci 1976, Ayaz ve Tınar 2006).

Son konaklar canlı protoskoleksleri ağız yoluyla alarak enfekte olurlar. Ağız yoluyla alınan kistler çiğneme sırasında parçalanır ve kist içindeki protoskoleksler ya açığa çıkarlar yada midedeki pepsinin etkisiyle kapsül ve diğer kistik dokuların sindirilmesiyle serbest kalırlar. Protoskoleksler ağız yolu ile alınmadan önce apikal bölgesi (çekmenler, rostellum ve çengeller) mukopolisakkarit kaplı bir tabaka içine invagine durumdadır, bu durum evaginasyon uyarılıncaya kadar dış etkilerden koruma sağlar. Evaginasyon için uyarının kesin kaynağı bilinmemektedir. Ancak protoskoleksler çevresel değişikliklere karşı hassas olduğundan sıcaklık ve ozmotik basınçtaki değişiklikler evaginasyona neden olmaktadır. Arakonaklardan alınan kistlerde 10-20 °C'de protoskolekslerde birkaç günde evaginasyon olurken, 10 °C'nin altında evaginasyon olmamaktadır. Evaginasyon için spesifik enzim veya safra mutlaka gerekli değildir, ancak safranın varlığında evaginasyon oranı artmaktadır. Aerobik ortam ise evaginasyon için şarttır. Gelişmekte olan genç parazitler çekmenleriyle dokulara tutunurlar, tutunamayanlar ise bağırsaklardan

dışarı atılırlar. Erişkin parazitin gelişmesi germinal ve somatik değişimi içerir ve halkaların oluşması, olgunlaşması, büyüme ve segmentasyon şeklinde ilerler. Germinal farklılaşmada önce sıra ile yeni halkalar oluşur ve olgunlaşır. Somatik farklılaşmada ise parazit boyca büyür ve segmentasyonla her halka arasında somatik sınır oluşur ve buna halkalaşma denir. Enfeksyonun 14-17. günlerinde ilk halka şekillenmektedir. 17-20. günlerde ikinci halka, 28-30. günlerde 3. halka oluşmaya başlamaktadır. 33-37. günlerde strobilada 3 ya da 4 halka bulunmaktadır. 37-45. günlerde ise son halkada yumurtalar bulunmaktadır. Yumurta üretimi *E. granulosus*'da enfeksiyondan 34-58 gün sonra başlar. Ekinokok türlerinde gebe halkaların 7-14 günde bir oluşup koptukları düşünülmektedir (Thompson 1995).

Parazit olgun hale geçtiğinde ince bağırsağın belli bir bölgesine yerleşme eğilimi gösterir. *E. granulosus* ince bağırsağın ön 1/4 kısmına yerleşirken, *E. multilocularis* arka 1/4 kısmına yerleşir. Dağılımdaki bu farklılığın türlerin değişik metabolik ihtiyaçlarına ve ince bağırsağın ön ve son kısımlarındaki değişik fizyolojik koşullara bağlı olduğu düşünülmektedir (Thompson 1995).

Erişkin parazitler hermafrodittirler ve kendi kendini dölleme yeteneğine sahiptirler. Kendi kendini dölleme yeteneğinin özellikle hafif enfeksiyonlarda bir parazitin diğerini bulma olasılığı zor olduğundan *Echinococcus* gibi küçük sestodlar için bir avantaj olacağı bildirilmektedir (Thompson 1995).

1.4. Hidatidozun Yaygınlığı

1.4.1. Hidatidozun Dünyadaki Yaygınlığı

Dünyada hidatidozun görülme sıklığına göre Uruguay, Arjantin, Yeni Zelanda, Yunanistan, Kıbrıs birinci grubu, Türkiye, Akdeniz ülkeleri, yakın ve orta doğu ülkeleri ikinci grubu, İskandinavya, Birleşik Amerika, Kanada gibi ülkeler hastalığın daha az görüldüğü üçüncü grubu oluşturmaktadır (Budak 1991a).

Yapılan çeşitli çalışmalarda hidatidozun İtalya'da koyunlarda %11,3, Bulgaristan'da %4,3, Polonya'da %6,7, Romanya'da %5, Portekiz'de %9,4, Yunanistan'da %3,9, İspanya'da 2000-2008 yılları arasında sığırlarda %0,97-0,52, koyunlarda %0,98-3,68, domuzlarda 0,20-0,03, Afrika kıtasında sığırlarda %0,002-46, koyunlarda %0,3-96,3, keçilerde %0,05-56,4, evcil domuzlarda %0,003, develerde %2-61,4; Asya kıtasında sığırlarda %0,05-38,9, koyunlarda %2,1-71,

keçilerde %2,2-12,7, evcil domuzlarda %7,7, develerde %4,7-58,9, geyiklerde %2,1; Avustralya kıtasında koyunlarda %0,66, yaban domuzlarında %18,9-49 arasında yaygın olduğu kaydedilmiştir (Akyol 2004, Efsa 2008, Rojo-Vazquez ve ark 2011).

1.4.2. Hidatidozun Türkiye'deki Yaygınlığı

Türkiye'de son 20 yılda farklı illerde mezbaha çalışmaları ile kistik ekinokokkozisin yayılışı araştırılmıştır. Dik ve ark (1992) Konya'da kesilen hayvanlardaki enfeksiyon oranını koyunlarda %51,89, sığırlarda %11,2; Umur ve Aslantaş (1993), Kars'ta koyunlarda %48,4, sığırlarda %24,7; Öge ve ark (1998), Ankara'da koyunlarda %5,9, sığırlarda %9,4; Umur (2003), Burdur'da koyunlarda %26,6, sığırlarda %3,5 olarak bildirmişlerdir. Gıcık ve ark (2004), ise Kars ilinde koyunların %63,85, sığırların %31,25'inde; Esatgil ve Tüzer (2007), Trakya'da koyunların %3,5, sığırların %11,6'sında; Yılmaz ve ark (2009), Van'da koyunların %56,48, sığırların %20,65'inde; Düzlü ve ark (2010), Kayseri'de koyunların %28, sığırların %3'ünde kist hidatiğe rastlamışlardır. Farklı yörelerde yapılan bu çalışmalara göre kist hidatiğin koyunlardaki oranının %3 ile %63,85 arasında değiştiği görülmektedir.

1.5. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Hayvanlarda klinik semptomlar kistlerin geliştiği organa, yerleşim bölgesine, kistin büyüklüğüne ve sayısına, hayvanın yaşına ve kondisyonuna göre değişir. Kist, zarar verecek boyutlara ulaşabilmek için uzun sürelere ihtiyaç duyar. Bu nedenle genç hayvanlarda hidatidoza daha seyrek ve daha hafif enfeksiyonlar şeklinde rastlanmaktadır. Yaşlı hayvanlarda ise gelişen ve büyüklüğü artan kistlere bağlı olarak enfeksiyon daha ağır seyreder. Enfekte hayvanlarda semptomlar genelde belirsiz olup et verimi azalır, sağmal hayvanların süt verimi düşer, yapağının niteliği bozulur, vücut direncinin kırılması sonucu hayvanlar diğer hastalıklara kolayca yakalanır (Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982, Ayaz ve Tınar 2006). Karaciğerdeki kistlerde safra kanallarına baskısı sonucu şekillenen sarılık, karaciğerde büyüme ve palpasyonda ağrı, karın bölgesinde şişkinlik, asites, peritonit, akciğerdeki kistlerde öksürük, solunum güçlüğü, kistlerin bronşlara açılması halinde burundan gelen protoskoleks ve germinatif membran parçaları içeren pembe renkli sıvı akıntısı şekillenmektedir. Kalbe yerleşen kistler dolaşım bozukluğuna, beyne yerleşenler inkoordinasyon, görme ve çiğneme bozukluklarına sebep olmaktadır. Kemikteki

kistler ise; onkosferlerin karaciğer ve akciğer göçü geçirerek kan dolaşımı yolu ile kemiklere taşınması sonucu veya metastazla sekonder olarak gözlenebilmektedir (Gönenç ve ark 2004, Ayaz ve Tınar 2006). Akciğer ve karaciğer yüzeyindeki fertil kistlerin yırtılması sonucu pleura veya periton boşluğunda yada karaciğer ve akciğer paranşiminde primer kistlerden kız keselerin oluşması sonucu sekonder hidatidoz şekillenmektedir (Tınar ve Coşkun 1991).

Onkosferler son yerleşim bölgesine ulaştığında ilk birkaç saat içinde konağın mononükleer ve eozinofilik hücre infiltrasyonundan oluşan yangısal reaksiyonu ile karşılaşır ve onkosferlerin çoğu gelişemeden fagosite edilir. Alınan yumurtaların ancak %10'u çeşitli organ ve dokulara yerleşerek 5 gün içinde hidatik form şeklini alırlar. Büyüyen kistin etrafında yangı sonucu endotel hücreleri, eozinofiller ve yabancı cisim dev hücrelerini içeren fibröz bir doku oluşur. Çevrede fibroblast, yeni gelişen kan damarları ve kollajen dokudan ibaret bir tabaka oluşur ve büyüyen kist çevre dokulara bası yaparak atrofiye uğratır (Moris ve Richards 1992, Gönenç ve ark 2004). Doku ve organlardaki lezyonlar paranşimin yapısına ve oluşan kist sayısına göre farklılık gösterir. Yüzeysel kistler kolaylıkla görülür, dokunun derinlerinde gelişenler ise ancak palpasyonla veya kesit yapılarak anlaşılır. Fertil kistlerde prtoskoleks olması, steril kistlerde ise kist cidarının suya batırıldığında boru gibi kendi ekseni etrafında kıvrılması ile pratik olarak hidatik kist olup olmadığı anlaşılabilir. Ancak bu özellikler apseleşme, peynirleşme veya kireçlenme durumlarında görülmez. Peynirleşme kistin iç yüzeyi ile kütikülası arasından olmak üzere kesenin çevresinden başlar, ortaya doğru yayılır, kist duvarının kırışması ve birbirine yaklaşması ile boşluk küçülür, kist sıvısı yavaş yavaş emilir ve kese çöker. Kist cidarının dejenerasyonu ile oluşan peynirimsi madde boşluğu doldurur. Daha sonra kireç tuzları presipite olur ve kistin kireçlenmesi tamamlanır (Tınar ve Coşkun 1991).

1.6. Hidatidozun Ekonomik Önemi

Ekonomik açıdan en önemli kayıp tüketilebilen organların özellikle karaciğerin imha edilmesidir. Birçok ülkede bu tür organlar tamamen imha edilmesine rağmen, Uruguay gibi bazı ülkelerde farmasötik endüstrisinde değerlendirilmektedir (Torgerson 2003).

Hidatidozda hayvan sağlığı açısından en büyük kayıp, çiftlik hayvanlarındaki verim düşüklüğüne bağlı olarak şekillenen kayıplardır. Bunları canlı ağırlık artışında düşme, süt veriminde azalma, fertilite oranında düşme ve yün veya diğer ürün değerlerinde azalmalar oluşturur. %10 veya daha fazla olarak tahmin edilen bu kayıplar verim kayıplarının en önemlisini oluşturmaktadır (Torgerson 2003).

Merdivenci ve Aydınlıoğlu (1982)'nun Vibe'den aktardığına göre; enfekte koyunlarda et veriminde %10,4, yağ veriminde %19, süt veriminde %56-62, yün veriminde %9,5 azalma olduğunu ve gebe koyunlarda %12 oranında abort görüldüğü tahmin edilmektedir.

Paraziter hastalıkların hayvanlarda neden olduğu ekonomik kayıpların hesaplanmasında, meydana gelen verim kayıpları ve imha edilen organların değeri birlikte dikkate alınması gerekirken, hastalığın hayvanlar tarafından iyi tolere edilmesi nedeniyle hastalıklar genellikle kesimden sonra mezbahalarda tespit edilebilmekte ve ekonomik kayıplar buna göre hesaplanmaktadır (Perry ve Randolph 1999).

Dik ve ark (1992), Konya'da Et ve Balık Kurumu Kombina'sında yaptıkları çalışmada, 13,049 koyunun 6783 (%51,98)'ünde hidatidoza rastlamışlar, imha edilen organların neden olduğu maddi kaybın 360 milyon TL olduğunu belirtmişlerdir.

Umur ve Aslantaş (1993), 1992'de Kars Belediye Mezbahası'nda yaptıkları çalışmada hidatidoz nedeniyle oluşan ekonomik kaybın 170 milyon TL olduğunu belirtmişlerdir.

Düzlü ve ark (2010), Kayseri'de üç farklı mezbahada yaptıkları çalışmada hidatidoz nedeniyle enfekte olup, imha edilen koyun karaciğer ve akciğerlerine bağlı olarak oluşan ekonomik kaybın 368 TL (240 $), sığır karaciğerlerine bağlı olarak oluşan ekonomik kaybın ise 252 TL (165 $) olduğunu, hayvansal üretim kayıpları ve insan sağlığı harcamaları haricinde bir yılda kistik ekinokokkozise bağlı olarak meydana gelen ekonomik kayıpların 48.000 TL (31.372 $)'ye ulaştığını bildirmektedirler.

Balkaya ve Şimşek (2010), Erzurum'da Et ve Balık Kurumu Kombinası'nda ve özel bir mezbahada yaptıkları çalışmada hidatik kist tespit edilen karaciğerlerin

tamamının imha edildiğini varsayarak hidatidoz nedeniyle toplam 3.320 TL ekonomik kaybın olacağını bildirmişlerdir.

Türkiye'de hidatidoz kaynaklı yıllık ekonomik kayıp sığırlar için 32,4 milyon ABD Doları (26,2-39,1), koyun için 54,1 milyon ABD Doları (43,8-65,5) ve keçiler için 2,7 milyon ABD Doları (2,2-3,3) olarak tahmin edilmektedir. Türkiye'de hidatidozdan kaynaklanan toplam verim kaybı 2008'de 89,2 milyon ABD Doları (72,2-107,9) olarak hesaplanmıştır. Total kayıplar açısından bakılacak olursa ilk sırayı sığırlardaki süt verim kaybı (%60) oluşturmaktadır, bunu koyun (%36) ve keçilerdeki (%30) fertilite kaybı izlemektedir (Sarıözkan ve Yalçın 2009).

Portekiz'de hidatidozdan ileri gelen süt, et ve yapağı kaybının yaklaşık olarak sırasıyla %7-10, %5-20, %10-40 olduğu tahmin edilmiştir (Houin 1998).

Çin'de yapılan bir çalışmada ise hidatidoza bağlı olarak karkas ağırlığında sığır başına 7,21 kg, koyun başına 1,15 kg kayıp olduğu bildirilmiştir (Yang 1992).

İspanya'da hidatidozun neden olduğu ekonomik kaybın koyunlarda karkas ağırlığında %5, süt veriminde ise %10 olduğu bildirilmiştir (Jimenez ve ark 2002).

Dünya çapında çiftlik hayvanlarında hidatidozdan kaynaklanan yıllık verim kaybının 141, 605, 195 ABD Doları olduğu tahmin edilmektedir (Budke ve ark 2006).

1.7. Teşhis

Köpeklerde *Echinococcus* enfeksiyonlarının teşhisi, kontrol programları ve epidemiyolojik yaygınlık için oldukça önemlidir. *Echinococcus* enfeksiyonlarının köpeklerde ve diğer son konaklardaki teşhisi diğer tenya yumurtalarının son derece benzer olmasından dolayı problem oluşturmaktadır ve bundan dolayı dışkının mikroskobik muayenesi ile teşhis koymak risklidir ve spesifik değildir. Köpeklerde tanı amacıyla kullanılan başlıca iki yöntem arekolin purgasyon yöntemi ve nekropsidir. Son yıllarda özellikle *E. granulosus* ve *E. multilocularis* enfeksiyonlarının tanısı amacıyla iki esas yöntem geliştirilmiş olup bunlar, serumda spesifik antikorların tespiti ve dışkıda parazit antijenlerinin aranmasıdır (Zhang ve ark 2003).

a) Arekolin purgasyon yöntemi: Bu yöntem köpeklere arekolin uygulandıktan sonra purgasyon sonucu dışarı atılan dışkıda parazitlerin incelenmesi esasına dayanmaktadır. 1,75 ile 3,5 mg/kg arasında değişen dozlar köpekler için uygundur (Eckert ve ark 2001).

b) Nekropsi: *E. granulosus* enfeksiyonlarının nekropsiyle teşhisinde çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bağırsakların direkt muayenesinde bağırsak çok sayıda bölümlere ayrılır ve parçalar metal kaplara konulup makasla açıldıktan sonra 37 ºC'de serum fizyolojik içine alınır. Daha sonra bağırsak mukozasına yapışmış olan parazitler lup ya da stereo mikroskop yardımıyla toplanır. Bu yöntemin dezavantajı bir ya da iki segmentten oluşan küçük parazitlerin gözden kaçabilmesidir.

Sedimentasyon ve sayım tekniğinde ise daha kesin sonuçlar elde edilir. Bağırsak üç ya da daha fazla parçaya ayrıldıktan sonra her parça uzunlamasına açılarak serum fizyolojik içinde 37 ºC'de yarım saat bekletilir. Böylece parazitlerin sıvıya geçmesi sağlanır. Bağırsak duvarı spatula ile sıyrıldıktan sonra bütün materyal kaynatılır ve süzülerek yıkanır. Daha sonra siyah bir zemin üzerine alınarak parazitler lup ya da stereo mikroskop yardımıyla sayılır (Eckert ve ark 2001).

c) Serumda spesifik antikorların aranması: Deneysel enfekte köpeklerde ELISA ile protoskoleks antijenlerine karşı serumdaki spesifik antikorlar (IgG, IgA ve IgE) tespit edilebilir. *E. granulosus* ile enfekte olmuş köpekte 2-3 hafta sonra anti-ekinokok antikorlarının ortaya çıktığı ELISA ile gösterilmiştir. Çapraz reaksiyonlar *T. hydatigena* ve *T. psiformis* ile deneysel enfekte köpeklerdeki serum antikorlarına göre daha düşüktür. Ancak serolojik testler parazitin hiperendemik olduğu bölgelerde köpeklerde pek güvenilir sonuçlar vermediğinden, kullanımlarının güvenli olmadığı bildirilmektedir (Jenkins ve ark 1990).

d) Dışkıda koproantijenlerin aranması*:* Son yıllarda özel laboratuvarlarda dışkıdaki koproantijenlerin tespiti için ELISA kullanılmaktadır. Kopro ELISA yönteminde, *E. granulosus*'un somatik ya da ekskresyon/sekresyon antijenlerine karşı geliştirilmiş poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanılarak dışkıdaki spesifik ekinokok antijenleri saptanabilmektedir. Kopro ELISA testinin sensitivitesi serumda spesifik antikor tespitine yönelik serolojik testlerden daha fazla olup yeteri miktarda sensitiviteye ve yüksek miktarda bir spesifiteye sahiptir ve bireysel veya populasyon bazında tarama testleri için kullanılabilmektedir. Bu testin avantajlarından birisi 200'den fazla örneğin bir günde bir kişi tarafından işlenebilmesidir. Koproantijenler

prepatent ve patent periyot süresince son konaklarda bulunur ve konağın parazitten eliminasyonu sonrasında birkaç gün içinde kaybolur. Ağır enfekte hayvanlarda ELISA'nın absorbans değerinin daha yüksek olma eğilimine rağmen, enfeksiyon yoğunluk miktarını ölçmek mümkün değildir (Deplazes ve Mathis 1999, Eckert ve Deplazes 2004).

Echinococcus enfeksiyonlarında hastalığın arakonak hayvanlarda klinik tanısı zor olup, tanıda serolojik testlerden faydalanılmasına rağmen kesin tanı nekropsi ile yapılmaktadır (Zhang ve ark 2003). Tanıda ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MR), X-ray (röntgen) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. İnsanlarda sık başvurulan bu görüntüleme yöntemlerine, hayvanlarda nadiren başvurulmaktadır (Lightowlers ve Gottstein 1995).

1.8. Tedavi

Arakonak hayvanlarda *E. granulosus ve E. multilocularis'in* larval formlarının tedavisi pratik ve ekonomik değildir. Yine de yapılan çeşitli çalışmalarda değişik gruptan antelmentiklerin *Echinococcus* türlerinin arakonaklardaki larva safhalarına olan etkileri araştırılmıştır. Hidatidoz sağaltımında kullanılacak ilaçlar düşük konsantrasyonda germinal membrana ve protoskolekslere etkili olmalı, ağız yolu veya parenteral yolla verildikten sonra kanda uzun süre bu düşük konsantrasyonunu devam ettirip kistin kütikülasını geçebilmeli ve çok sayıdaki protoskoleksler ile kız keselere etkiyebilmelidir. Antibiyotikler, sülfonamidler, antiprotozoal bileşikler ve çeşitli antelmintik ilaçlarla yapılan etki çalışmalarının çoğu kemiricilerde yapılmış, ancak bazıları çiftlik hayvanlarında da denenmiştir. Yapılan çalışmalarda benzimidozollerin ara konaklardaki metasestod formlara karşı iyi düzeyde etkili oldukları ancak etkili dozlarının çok yüksek olması ve uzun süre uygulanması pahalı olduğundan evcil hayvanlardaki hidatidoz vakalarında rutin tedavide tercih edilmediği bildirilmektedir (Tınar ve Coşkun 1991, Haller ve ark 1998, Deplazes ve Eckert 2001).

Mebendazolün hidatidoz tedavisinde kullanılmış ilk benzimidazol bileşiği olduğu fakat bağırsaklardan emiliminin zayıf olmasından dolayı etkili sonuçların alınabilmesi için yüksek dozlarda (50 mg/kg/gün) verilmesi gerektiği bildirilmiştir. Albendazolün ise daha kolay emildiği, özellikle metaboliti olan albendazol

sülfoksidin kolaylıkla kist membranına difüzyonu, membran ve kist sıvısı içinde yoğunlaşmasından dolayı daha gelişmiş bir etki gösterdiği kaydedilmiştir (El-On 2003). Albendazol, fenbendazol ve flubendazol gibi benzimidazol türevleri deneysel olarak intraperitonal yolla sekonder hidatidoz oluşturulan rodentlerde test edilmiş ve günlük 30-50 mg/kg dozda 60-80 gün boyunca uygulandığında kistlerde ciddi hasar ve ölüm meydana geldiği bildirilmiştir (Ammann ve Eckert 1995). Çiftlik hayvanlarında ise sadece mebendazol ile ilgili çalışmalar yürütülmüş ve günlük 50 mg/kg dozda 3 aylık uygulamanın protoskoleksleri öldürdüğü bildirilmiştir (Gemmel ve Roberts 1995).

Praziquantelin de hayvanlardaki hidatik kistlere karşı etkisi test edilmiş fakat sonuçlar başarılı olmamıştır. İlaç farelere protoskoleks verilmeden birkaç gün önce uygulandığında fareledeki sekonder kist gelişimini %97 oranında engellediği tespit edilmiştir. Ancak enfeksiyondan birkaç gün sonra uygulandığında inhibe edici etkisi azalmış ve %78'lerde kalmıştır. Enfekte koyunlar derialtı 50 mg/kg veya oral 100 mg/kg dozda praziquantel ile tedavi edilmişler ancak kistlerde görülebilir değişiklikler tespit edilememiştir (Richards ve ark 1988).

Köpeklerde *E. granulosus* tedavisinde kullanılacak ilaçlar arasındaki ilk seçenek izoquinolin-pirazin türevi olan praziquanteldir. *E. granulosus* için ED90 (=parazitlerin %90'ının atıldığı doz) dozu 2,3 mg/kg, *E.multilocularis* için ise 4,6 mg/kg'dır. Oral uygulama için tavsiye edilen doz 5 mg/kg, kas içi uygulama için ise 5,7 mg/kg'dır. Bu dozlarda uygulandığında *E. granulosus* ve *E. multilocularis*'in genç ve olgun şekillerine yüksek oranda etki gösterir. Ancak praziquantelin ovisidal etkisi yoktur. Praziquantel gebe hayvanlarda güvenli bir şekilde kullanılabilir ve köpeklerde yüksek doz tolere edilebilir. Prepatent süre göz önüne alınarak 6-8 haftalık periyotlarla uygulama yapılmalıdır. Yapılan çalışmalarda tek doz oral uygulamanın %100 etkili olduğu bildirilmektedir (WHO/OIE 2001). Son yıllarda geliştirilen diğer bir ilaç ise epsipiranteldir. Praziquantele yapı olarak benzeyen bu ilaç köpeklere 5,5 mg/kg, kedilere 2,75 mg/kg dozda uygulanır. Kedi ve köpeklerde iyi tolere edilir. Praziquantelin tersine konak tarafından az miktarda emilir ve bundan dolayı sestodlara karşı direkt etkisinin olduğu sanılmaktadır (Manger ve Brewer 1989). Nitroskanat ve benzimidazol türevleri gibi diğer ilaçların *E. granulosus*'a karşı kısmi etkileri bulunmakta ancak bunlar praziquantel ve epsipirantelin etki seviyelerine ulaşamamaktadırlar (WHO/OIE 2001).

1.9. Korunma ve Kontrol

Hidatidoza karşı bugüne kadar İzlanda, Yeni Zelanda, Avusturalya ve Kıbrıs'ta kapsamlı kontrol programları uygulanmış, en başarılı sonuç İzlanda'da alınmıştır (Tınar ve Coşkun 1991).

Parazitin eradike edilmesine yönelik kontrol çalışmaları için çeşitli seçenekler vardır. Birinci seçenek (tip 1); eğitim, mezbaha hijyeni ve kontrolü, köpeklerin kontrol altına alınması gibi çalışmaları içermektedir. Ancak çeşitli ülkelerde kazanılan tecrübeler bu seçeneğin *E. granulosus*'un kontrolünde tek başına yeterli olmadığını ve çok yavaş etki gösterdiğini ortaya koymuştur. İkinci seçenek (tip 2) parazitin biyolojisini kesintiye uğratmayı hedefleyen önlemleri içermektedir. Saldırı fazı (atak faz, hücum faz) olarak adlandırılan bu seçenekle köpek ve koyun populasyonundaki hastalık kontrol edilmeye çalışılır. Köpeklerde *E. granulosus*'un varlığı kopro antijen ELISA veya arekolin testi, insanlarda hidatidoz varlığı ise ultrasonografi veya ultrasonografi-seroloji kombinasyonu gibi modern teknikler kullanılarak yapılabilir. Bu kontrol yöntemi köpeklerin antelmintiklerle tedavisi ile birlikte başıboş köpeklerin kontrolü, sahipli köpeklerin kayıt altına alınması, et muayenesi, mezbaha hijyeni gibi çeşitli önlemlerle desteklenmelidir. Yasal sınırlamalar ve finansal destek ile birlikte bu kontrol programlarının uygulandığı çeşitli ülkelerde saldırı fazının 15 yıldan daha kısa sürede başarılı bir şekilde sonuçlanabildiği gösterilmiştir. Bu kontrol yöntemi Yeni Zelanda, Tazmanya ve Kıbrıs gibi ada statüsündeki ülkelerde başarılı bir şeklide uygulanırken; Arjantin, Şili, Uruguay, Bulgaristan, İspanya gibi kıtasal özellik gösteren bazı bölgelerde sınırlı etki göstermiştir (Gemmel 2001, Eckert ve Deplazes 2004).

Hidatidozun kontrol altına alınmasında köpeklerdeki erişkin parazit kontrolü önemlidir. Bu amaçla alınması gereken önlemler şunlardır:

- Mezbahalarda kesim sonunda arta kalan hidatidozlu organların tamamen imha edilmesi ile başta köpekler olmak üzere son konakların enfeksiyonu önlenmiş ve parazitin gelişme halkalarından en önemlisi kırılmış olacaktır.
- Soğuk saklama ve imha ünitesi olmayan küçük mezbahalarda atıkların uzaklaştırılamaması sorunu mutlaka çözülmelidir.
- Enfekte organların mezbahalarda yakılarak imhası için uygun yakma fırınları olmalıdır.

- Kaçak hayvan kesimleri önlenmelidir.
- Sahipli köpekler kontrol altında tutularak iki ay aralıklarla periyodik olarak uygun antelmentik ilaç uygulanmalı, sahipsiz köpeklere karşı mutlaka önlem alınmalıdır.
- Hastalığın kontrol altına alınmasında önemli bir noktada halka, toplum sağlığı koruma bilgisinin verilmesidir. Bu konuda eğitim programları uygulanmalıdır (Budak 1991b).

Hidatidozdan korunmak amacıyla aşı geliştirme çalışmalarında oldukça önemli adımlar atılmıştır. Avusturalya ve Yeni Zelanda'da *Taenia* türlerinin koyun ve sığırlardaki larva formlarına karşı koruma sağlayabilen onkosfer antijenlerinin kullanıldığı aşılar geliştirilmiştir. Ara konaklarda aşılama *T. ovis*'e karşı geliştirilen rekombinant aşıyı takiben son yıllarda ilerleyerek benzer bir yaklaşımla *E. granulosus*'a karşı rekombinant aşı geliştirmek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. İlk olarak kist sıvısı, kist membranları ve protoskoleksleri içeren antijenler kullanılmış fakat onkosfer antijenlerinin daha yüksek seviyelerde koruma sağladığı belirtilmiştir. SDS-PAGE yöntemiyle ham onkosfer antijenlerinden ayrılan 25 kda'lık fraksiyonun da bağışıklığı uyardığı gösterilmiştir (Zhang ve ark 2003, Eckert ve Deplazes 2004). Lightowlers ve ark (1996) bu fraksiyona karşı hazırlanmış antikoru kullanarak onkosferal cDNA kütüphanelerinden seçilen cDNA klonlarını *Escherichia coli*' de glutasyon S transferaz (GST) ile füzyon proteini olarak eksprese etmişler ve koruyucu etkisini aşılanan koyunlarda test etmişlerdir. 16,5-kDa rekombinant proteinin (Eg95) 50 µg GST füzyon proteini ile yağlı adjuvantla formüle edilmesi veya Saponin, Quil A ve ISA 70 olmak üzere üç farklı adjuvantla formüle edilmesi sonucunda %96-98 oranında koruma sağladığı belirtilmiştir. Onkosferden klonlanan Eg95 aşısının, bağışıklığı en yüksek düzeyde uyaran klon olduğu ve *E.granulosus*'a karşı aşılama çalışmalarında başarı ile kullanılabileceği bildirilmiştir. 1 litre *Escherichia coli* kültüründen 10.000'den fazla aşı dozu üretilebilmektedir.

Eg95 aşısının koyunlarda yüksek derecede koruma sağladığı ve aşılanmış hayvanlarda kist sayısını yaklaşık olarak %90-100 oranında azalttığı ortaya konmuştur. Yüksek derecede bir bağışıklığın (%80) reenfeksiyon oluşmadığı takdirde 6 ay boyunca devam ettiği ve kuzulamadan önce aşılanan gebe koyunlarda yüksek antikor seviyelerinin kolostrum yoluyla yavrulara geçtiği bildirilmiştir (Lightowlers ve ark 1999, Eckert ve Deplazes 2004, Craig ve ark 2007). Heath ve ark (2003) Eg95 aşısının sığırlarda kist hidatiğe karşı %89-99 arasında koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Eg95 aşısı bir ay ara ile iki kez uygulandığında en az bir yıl koruma sağlamaktadır. Oluşan IgG antikorları kompleman varlığında onkosferi lizise uğratarak metasestoda dönüşmesini engellemektedir. Uzun süreli bağışıklık için ilk iki enjeksiyondan 6 veya 12 ay sonra üçüncü takviye doz uygulanmalıdır. Bağışıklık, aşılanmış annelerden pasif olarak yavrulara geçmektedir (Heath ve ark 2003).

1.10. *Echinococcus* Cinsinin Moleküler Karakterizasyonu

Suş tanımı aynı tür içerisinde olup, gen frekansları yönünden istatiksel olarak farklılık gösteren, hidatidozun epidemiyolojisi ve kontrolü açısından potansiyel öneme sahip bir veya daha fazla karakter yönünden farklılık sergileyen varyantlar olarak yapılmaktadır (WHO/OIE 2001).

Parazitin tür ve suş identifikasyonu analizlerinde kullanılan yöntemlerden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), izole edilen veya patolojik materyalde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA, RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. Reaksiyon başlıca denaturasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. PZR'nin üç aşamadan oluşan ilk amplifikasyon aşamasının, 25-30 kez tekrarlanması sonucunda, hedef DNA'nın milyonlarca kopyası elde edilmektedir. Amplifikasyon aşamasından sonra elde edilen ürünler, agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmakta, ethidium bromide ile boyanarak görünür hale getirilebilmektedir (Dinkel ve ark 2004).

Echinococcus cinsi içerisinde bulunan farklı suşların belirlenmesi hastalığın epidemiyolojisi ve kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır. Bu suş farklılıkları parazitin yaşam siklusu, konak spesifitesi, gelişim hızı, patojenitesi, antijenitesi, antelmentiklere duyarlılığı, bulaşma dinamikleri, hastalığın epidemiyoloji ve kontrol teknikleri üzerinde son derece önemlidir. Bu bakımdan endemik bölgelerde kontrol ve eradikasyon programlarının hayata geçirilebilmesi, bu bölgelerde baskın suş veya suşların belirlenmesine bağlıdır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *E. granulosus*'un 10 genotipi (G1-G10) tanımlanmıştır. *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) ve *E. canadensis* (G6-G10) olarak sınıflandırılmıştır (Thompson ve Lymbery 1988, Thompson ve McManus 2002, Ütük ve ark 2005, Nakao ve ark 2007).

1.11. Hidatidozda İmmünite

Hidatidozda enfeksiyonun ilerleyişini etkileyen faktörlerin başında immün sistemin antijenik özelliklere göre uyardığı T hücreleri aracılığıyla harekete geçirilen immün yanıtın tipi gelir. Bu hücrelerden özellikle CD4+ yüzey reseptörünü taşıyan ve yardımcı T lenfositleri olarak bilinen hücreler konağın immün savunma mekanizmasında belirleyici rol oynar. Yangısal ve immünolojik olaylarda lenfosit ve makrofajlardan hormon benzeri mediatör adı verilen sitokin veya interlökinler salgılanır. T ve B hücerleri tarafından üretilen bu sitokinlere lenfokinler adı verilir. Sitokinler yangıyı veya bağışıklığı, lökositlerin gelişmelerini, hareketlerini ve farklılaşmalarını sağlayarak düzenlerler. İnterlökin-1(IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, tümör nekroz faktörü (TNF) ve interferon (IFN)'lar başlıca önemli sitokinlerdir. Th hücreleri aldıkları uyarıların türüne ve özelliklerine bağlı olarak tam olarak bilinmeyen bazı faktörlerin de etkisi ile farklı sitokinleri salgılayan alt gruplara ayrılır. IL-2, IFN-γ ve lenfosit salgılayan Th1 hücreleri konağın savunma mekanizmasını güçlendirirken, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sentezleyen Th2 hücreleri konağı enfeksiyonlara karşı duyarlı hale getirir (Turgay ve Üstün 2004).

İnsan ve hayvanlarda *E. granulosus* ve *E. multilocularis* enfeksiyonlarında ortaya çıkan patojenite ve immün mekanizmaların şartlara göre geniş bir değişim aralığı vardır. İmmun mekanizma ve patolojik değişiklikleri etkileyen unsurlar; kistlerin lokalizasyonu, büyüklüğü, enfeksiyon gelişim hızı, genetik faktörler ve T hücreleri olarak sayılabilir. Etkin bir immün yanıt parazitin ölümüne, yetersiz bir immün yanıt ise bu parazitin hızla gelişimi anlamına gelir ve konağın ölümüne neden olabilir. Parazit- konak ilişkilerinde immün yanıt ürünleri sitokinler, interferonlar ve bağışıklık sistem hücreleri parazitlerin yaşamlarını devam ettirip gelişebilmelerinde etkilidirler (Turgay ve Üstün 2004).

Echinococcosis enfeksiyonlarında immün yanıt çalışmaları insanlara benzerlik gösteren deneysel fare modelleri üzerinde de yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre Th1 tip sekresyonu tarafından hücresel immünite oluşturulmakta ve metacestodun gelişiminin başlangıç döneminde parazitin ölmesinde etkili olmaktadır. Bunun yanında konağın immünogenetik karakterleri parazitin gelişiminin engellenmesinde en önemli etkendir. Ayrıca antijenik proteinler ve karbonhidratlar da antijen gelişimi ve hücre aktivasyonu ile metasestodlara zarar verirler (Öge ve ark 2007).

Hidatidozun immünolojik teşhisinde parazitin antijenine karşı hayvanlarda şekillenmiş IgG, IgM, IgA ve IgE antikorları rol oynar. Kistin yerleştiği organa ve gelişme durumuna bağlı olarak bu antikorların oluşması ve kandaki seviyeleri değişmektedir. Yapılan çalışmalarda karaciğer ve peritonda gelişen kistlerin akciğer, beyin ve göz gibi organlarda gelişen kistlere oranla daha fazla antikor oluşmasına neden olduğu ortaya koyulmuştur (Kagan 1968, Matossian 1976).

Hidatidozda serolojik tanı, konağın parazite karşı göstermiş olduğu hücresel ve humoral immün yanıtı ortaya koyma esasına dayanmaktadır. Serolojik testlerin, enfeksiyonlu kişilerin serumundaki spesifik antikorları tespit etme kapasitesi (sensitivite) ve kist hidatik hastalığı olanları diğer parazitik ve klinik hastalığı olanlardan ayırma kapasitesi (spesifite); kullanılan antijenin cinsi ve hazırlama şekli, değişik pozitiflik kriterleri, kistin canlılığı ve lokalizasyonu, parazitin suşu gibi birçok sebebe bağlıdır (Matossian 1977).

İmmünolojik tanıda en yaygın kullanılan antijen kaynakları, fertil kistlerden elde edilen kist sıvısı, kist membranı ve protoskolekslerdir. İnsan ve koyun kistlerinde, sığır ve domuz kistlerine, karaciğer kistlerinde ise akciğer kistlerine oranla daha fazla antijenik protein olduğu ve en yüksek antijen konsantrasyonunun koyun karaciğer kistlerinde olduğu bildirilmektedir (Musiani ve ark 1978). Hariri ve ark (1965) akciğer ve karaciğer kistlerinin her ikisinin de bulunduğu diğer konaklar antijen kaynağı olarak yetersiz olmasına rağmen, koyun karaciğerinde en yüksek antijen konsantrasyonunu bulmuşlardır. Canlı fakat fertil olmayan kistlerin sağlıklı germinal membranlarının diagnostik testler için uygun olabileceğini, antijenitenin sadece fertil kistlerle ilgili olmadığını, protoskolekslerin sayısıyla kist sıvısının antijenik etkisi arasında ilişki bulunduğunu ve protoskolekslerin hidatik antijenin tek değil fakat en önemli kaynağı olduğunu bildirmişlerdir. Hidatik kist sıvısı içinde konağa ait proteinlerin bulunması ve antijenlerin bir kısmının diğer helmintlerin yapısında da bulunmasından dolayı hidatidoz tanısında kullanılan serolojik testlerde yanlış pozitif reaksiyonlar şekillenmektedir. Serolojik testlerin tanısal gücünü artırmak amacıyla purifiye antijenler veya konak komponentlerini minimum düzeyde içeren kist sıvısı antijenleri kullanılmaktadır (Altaş 1981). En fazla kullanılan iki büyük hidatik kist sıvısı antijeninin; ısıya dayanıksız (termolabil) bir lipoprotein olan Antijen 5 ve ısıya dayanıklı (termostabil) bir protein olan Antijen B olduğu bildirilmiştir (Oriol ve ark 1971, Musiani ve ark 1978).

Antijen 5 ilk defa immünoelektroforez metoduyla at kist sıvısından elde edilmiş ve hidatidozun tanısındaki değeri üzerinde durulmuş, ayrıca Antijen 5'in çimlenme zarında, protoskolekslerin parankiminde ve bunların salgılarında bulunduğu tespit edilmiştir. Antijen 5, parazitin hidatik sıvısında ve kistin somatik dokularında bulunan 10 veya daha fazla antijenden biri olup, immünoelektroforetik çalışmalar bu antijene karşı oluşmuş antikorların hasta serumunda bulunmasının hidatidozun tanısında kesin bir kriter olduğunu göstermiştir (Capron ve ark 1970). Bu antijene aynı zamanda *T. hydatigena* sistiserkleri içindeki sıvıda da rastlandığı ve bu nedenle sistiserkozis ile çapraz reaksiyona neden olduğu bildirilmiş ve antijen 5'in spesifikliği tam olarak tespit edilememiştir (Varela-Diaz ve ark 1997). Dottorini ve Tassi (1977), ID ve IE tekniklerini kullanarak test ettikleri koyun, at ve sığır kaynaklı kist sıvısının antijenik bileşiminde farklılıklar bulmuşlar, fakat bazı antijenlerin her zaman bulunduğunu bunlardan birisinin de Antijen 5 (Arc 5) olduğunu, moleküler ağırlığının 100-300 kDa olduğunu, pH'sının 4-7 arasında değiştiğini ve 56 ºC'nin üstünde stabil olduğunu tespit etmişlerdir.

İkinci önemli hidatik antijen lipoprotein yapıda, ısıya dayanıklı ve moleküler ağırlığı 12000 kDa olan Antijen B'dir. İlk kez Oriol ve ark (1971) tarafından tanımlanan antijen B (AgB) hasta kanında ölçülebilmektedir ve bu da AgB'nin parazitin biyolojisinde ve konakla olan ilişkisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte AgB'nin SDS-PAGE yöntemiyle moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 8-12, 16 ve 24 kDa olan üç alt üniteden oluştuğu bildirilmiş, en küçük alt ünitesinin 8 kDa olduğu ve ekinokok türüne özgü olduğu gösterilmiştir. AgB, kist sıvısı kaynadıktan sonra geriye kalan en önemli antijenik bileşimdir. Kist membranının geçirgenliği AgB için Antijen 5'e göre 10 kat daha fazladır (Oriol ve ark 1971, Musiani ve ark 1978).

İnsanlardaki çalışmalarla kıyaslandığında *E. granulosus* enfeksiyonlarının arakonak hayvanlardaki immünolojik tanısı amacıyla yapılan çalışmalar daha azdır. Hayvanlarda serolojik tanıda en büyük sorun yüksek seviyedeki antikor cevabın görüldüğü insanlarla kıyaslandığında doğal enfekte hayvanlarda enfeksiyona karşı oldukça düşük düzeylerde antikor cevabı oluşmasıdır. Bu nedenle enfekte hayvanlarda sık olarak yanlış negatif cevap şekillenmektedir. Enfekte hayvanlarda diğer parazitlerle özellikle *T. hydatigena* ve *T. ovis* gibi tenya türleriyle hidatik kistler arasında çapraz reaksiyonlar olduğundan dolayı serolojik teşhis

güçleşmektedir (Lightowlers ve Gottstein 1995, Zhang ve ark 2003). *Echinococcus* antijenlerinin yalnızca cestodlarla değil, trematod ve nematodlarla da çapraz reaksiyon verdikleri, bunun sebeplerinden birisinin hidatik kist sıvısında, protoskolekslerde ve laminar zarda bulunan P1 aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Kist hidatikli hastalarda bulunan anti-P1 aktivitesi *Fasciola hepatica* ve diğer parazitlerde de bulunduğundan sık sık çapraz reaksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Altıntaş 1991).

Kistin şekillenmesi konağın doğal immünolojik aktivitesi ve bunun gelişmesi ile parazitin anti-komplementar aktivitesi, immün sistemi baskılaması, sitotoksik faktörleri salgılaması, konak hücrelerine karşı bariyer oluşturması gibi parazitin immünevasive stratejilerini içeren mücedaleye bağlıdır (Rogan ve Craig 1997). Hidatidozda ortaya çıkan immün mekanizmalar kist oluşumu öncesi ve sonrası dönemde farklı özellikler göstermektedir. Bu durum enfeksiyon başlangıcından 2-4 hafta sonra meydana gelmektedir (Rickard ve Williams 1982).

Primer enfeksiyonda görülen immünolojik reaksiyonlar: Enfeksiyonun başlangıcında fare ve koyunlarda hidatik kist sıvısına karşı gelişen IgG cevabın en erken 2 ile 14 hafta sonra, bazı maymun türlerinde ise 4 hafta sonra oluştuğu gözlenmiştir (Yong ve ark 1984, Rogan ve ark 1993). Erken enfeksiyon döneminde eozinofil, lenfosit ve makrofajların artarak patolojik değişikliklere neden olduğu ve bunun önemli bir inflamatuar hücresel cevapla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Koyunlarda enfeksiyondan sonraki 3-5 gün içinde nötrofil ve makrofaj infiltrasyonuyla onkosferler ile etrafındaki hücrelerin nekrozu oluşur. 25-30 gün içinde de eozinofil, lenfosit ve makrofajların oluşturduğu artan derecede leukositosis şekillendiği bildirilmiştir. İnvitro yapılan denemelerde aynı zamanda nötrofillerin *E. granulosus* onkosferlerinin ölümüne neden olabileceği ve buna bağlı olarak 'antikora bağlı hücresel immün cevabın' enfeksiyonun erken evresinde etkin olduğu sonucuna varılmıştır (Rogan ve ark 1992, Zhang ve ark 2003).

Aktive edilmiş makrofajların *Echinococcus* protoskolekslerinin öldürülmesinde önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *İn vitro* çalışmalarla protoskolekslerin öldürülmesinden sorumlu olan makrofajların sitokinler tarafından modifiye edildiği, IFN-γ tarafından artırıldığı, parazit tarafından stimüle edilen lenfositlerden salgılanan tanımlanmamış sitokinler (muhtemelen IL-10 veya IL-4) tarafından da azaltıldığı tespit edilmiştir (Rogan ve Craig 1997).

Sekonder enfeksiyonda görülen immünolojik reaksiyonlar: Farelerde deneysel olarak oluşturulan sekonder enfeksiyonda intraperitonal olarak enjekte edilen protoskolekslerin aktive olmuş makrofaj hücrelerinin de içinde bulunduğu hücresel infiltrasyonla üç gün içerisinde etrafının sarıldığı ve daha sonra nötrofil, eozinofil ve lenfositler tarafından çevrelendiği bildirilmektedir. Dalak hücreleri tarafından IL-10, IL-4 ve IL-5 sentezinin birinci haftanın sonunda tamamlandığı, IL-10'un tüm enfeksiyon boyunca var olan en güçlü sitokin olduğu dikkat çekmiştir (Zhang ve ark 2003).

Kist oluşumu sırasında şekillenen immünolojik reaksiyonlar: Kist oluşumuyla birlikte eozinofiller, nötrofiller, makrofajlar ve fibrositleri içeren bir inflamatuar cevap oluşur ve bu hücreler kistin etrafında fibröz tabaka oluşturarak kisti konak dokusundan ayırma eğilimindedir. Eozinofili ve yüksek seviyedeki IgE sentezi helmint enfeksiyonlarının yaygın sonuçlarıdır. Eozinofili, özellikle kist fagosite edilemeyecek kadar büyük olduğundan konağın savunma amaçlı verdiği yanıt olarak gelişmektedir. Eozinofiller nötrofillerden daha az fagositik olmalarına rağmen nötrofiller gibi larval dönemdeki paraziti öldürebilmekte, bu aktivitelerinin sitokinler tarafından artırıldığı bildirilmektedir. Diğer helmint enfeksiyonlarında olduğu gibi hidatidoz da Th1 ve Th2 olmak üzere iki farklı sitokin sentezine neden olmaktadır. Th1 hücrelerinden IL-2, IFN-γ ve lenfotoksin sentezlenirken, Th2 hücrelerinden IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sentezlenmektedir. Th1 ve Th2 hücrelerinin sentezledikleri bu sitokinler genellikle birbirleri üzerinde inhibitör etkilidir. IFN-γ Th2 hücre proliferasyonunu inhibe ederken; IL-10, Th1 sitokin sentezini inhibe etmektedir (Zhang ve ark 2003).

Kist gelişiminin önlenmesi sırasında görülen immünolojik reaksiyonlar: Genellikle, kistin gelişme döneminde immün cevaptan etkilenmediği kabul edilmektedir. Ancak koyunlardaki doğal enfeksiyonlarda bazı kistlerin gelişimleri sırasında öldürülebildiği, nispeten sık görülen kalsifiye metasestod veya nekrotik kist şeklinde ölüm meydana geldiği gösterilmiştir. Bu tür kistlerin immünolojik bir fenomenden dolayı öldüğüne dair doğrudan bir kanıt olmadığı, fakat büyük bir olasılık olduğu düşünülmektedir. Kist dejenerasyonunda ilerleme meydana geldiğinde immün cevabın parazitin öldürülmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu durum kistin ilerlemesi ile immünolojik stimulasyonun arttığı anlamına gelebilmektedir. Deneysel enfeksiyonlarda protoskolekslerin %10'dan daha az bir

kısmının kist formunda yaşamını sürdürdüğü, parazit ölümünün daha çok enfeksiyondan sonraki iki hafta içinde meydana geldiği kabul edilmektedir. Aktive olan makrofajların protoskolekslerin öldürülmesinde görev aldığı bilinmektedir. Yapılan invitro çalışmalarda potoskolekslerin aktive edilmiş makrofajlar tarafından öldürülmesinin IFN-γ tarafından artırıldığı ve lenfositlerden salınan bazı sitokinler (IL-10, IL-4) tarafından da azaltıldığı gösterilmiştir (Zhang ve ark 2003).

E. granulosus'un metasestod enfeksiyonları aylar hatta yıllar sonra tespit edilemeyen yavaş gelişen hidatik kistlerle karakterizedir. Hidatik kistlerdeki bu devamlılık tamamen şekillendiklerinde konak immün yanıtı tarafından etkilenmediklerinden dolayı immünojik açıdan önemlidir (Rogan ve Craig 1997).

Konağın immün yanıtını bozan iki çeşit mekanizma vardır. Bunlardan biri parazitin hidatik kist oluşturarak immün yanıtın zararlı etkilerinden korunması anlamına gelen pasif kaçış; diğeri ise immünomodulasyondur ki bu durumda parazit konak yanıtının etkisini azaltmak için konağın immün sistemiyle aktif bir etkileşime girer (Zhang ve ark 2003).

1.12. Kistik Ekinokokkozisin Teşhisinde Kullanılan Testler

1.12.1. Casoni Testi (intra dermal- ID)

İlk kez 1912'de Casoni tarafından kullanılan Casoni deri testinde antijen olarak insan veya hayvan orjinli steril kist sıvısı deri içine verilmektedir. Tepkime olumlu olduğunda 15-20 dakika içinde iğnenin girdiği noktanın çevresinde kızarıklık oluşur. Tepkimenin erken görülmesi ve sürekli olması tanı için önemlidir, geç olması ise kökeni parazitten kaynaklanmayan albuminlere bağlanır ve önemsizdir (Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982). Testte kullanılan antijenin yüksek azot ve protein konsantrasyonuna sahip oluşu ve kan grubu maddelerinden zenginliği nedeniyle % 30-40'a varan yalancı pozitif reaksiyonlar ile karşılaşılmaktadır (Kagan ve ark 1966). Bunlara ek olarak kistin lokalizasyonuna göre Casoni testinin duyarlılığı değişmektedir. Steril kistlerde reaksiyon daha güçsüz, fertil kistlerde ise daha güçlüdür. Deneysel enfeksiyonlarda 12 ay sonra bile olumlu alerjik tepkime oluşabildiği saptanmıştır (Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982).

1.12.2. Komplement Birleşme Reaksiyonu (KBR)

İlk kez 1906'da Ghedini tarafından kullanılan bu test bağışık serumdaki antikorların komplemanla karşılaşınca spesifik antijenlerle bağlanması esasına dayanmaktadır. Hidatik kist sıvısındaki bazı bileşikler doğrudan kompleman aktivasyonuna yol açtığından sıklıkla yanlış pozitiflik ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda %23 yalancı pozitiflik saptanmıştır. Günümüzde daha duyarlı testlerin geliştirilmesi sonucu bu test hemen hemen terk edilmiştir (Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982, Baldelli ve ark 1992).

1.12.3. İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)

Hidatidoz tanısında IFA testini ilk kez 1964'de Azevedo ve Rombert kullanmışlardır. Fluoressein izosiyanat, Fluoressein izotiyosiyanat ve Rodamin B200 gibi fluoresans verici maddelerle işaretlenmiş antikor, antijen ile bağlanınca fluoresan mikroskop altında görülebilir hale gelmektedir. Pozitif preperatlar sarı-yeşil fluoresans vermektedir (Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982).

IFA testi paraziter immünolojinin gelişmesinde önemli katkılar sağlamış ve diğer birçok testin uygulanması sırasında referans test olarak kullanılmıştır. Bu testin birçok avantajlarının yanı sıra, özellikle reaksiyonun okunması ve pozitiflik sınırının belirlenmesi sırasında bir takım güçlükleri de vardır (Özcel ve ark 1997).

Tanıda kullanılan antijenler, kesitlerin lam üzerine sabitlenmesiyle hazırlanmaktadır. Antijenlerin, üzerinde içi boş daireler olan özel lamlara fikzasyonu antijen tasarrufunun yanı sıra testin hazırlanması ve mikroskopta değerlendirilmesi sırasında kolaylıklar sağlamaktadır. Antijenli lamlar -20 ºC'de veya daha verimli olması isteniyorsa -70-80 ºC'de uzun süre saklanabilmektedir. Derin dondurucuda saklanan antijenli lamların sık sık çözdürülüp dondurulmasından sakınılması gerektiği bildirilmektedir (Özcel ve ark 1997).

Antijeni damlatmak için 75 mm boyunda, 25 mm eninde, 0,12 mm kalınlığında, üzerinde testin uygulanacağı alanların elmas kalemle çizilerek belirlendiği klasik lamlar kullanılabileceği gibi, ticari olarak hazırlanmış özel multi-test lamları da kullanılabilmektedir. Bu lamlar piyasada bulunan Fluoroglide (Chemplast) veya Anti-hart spray 899 (Spraytechnik Rotebühlst 89/2, 7000 Stuttgart) gibi sprey boyalardan faydalanılarak da hazırlanabilmektedir. Bu

uygulama için lamların püskürtme boya ile kaplanmadan önce, üzerlerinde testin yapılacağı alanları belirlemek gerekir. Bu amaçla lamın üzerindeki belli noktalara gliserin damlatılır ve daha sonra lamın yüzeyi sprey boya ile örtülmektedir. Boya kuruduktan sonra lamlar yıkanmakta ve böylelikle gliserin damlatılan alanlar test için boş kalmaktadır. Fluoroglide ile boyanan lamların testte kullanılmadan önce 90ºC'lik etüvde 90 dk bekletilmesi önerilmektedir (Özcel ve ark 1997).

Özcel (1978), IFA testinde antijen olarak bütün protoskoleks antijeni, protoskoleks kesit antijeni ve germinal zar kesit antijeni kullanıldığını belirtmiştir.

Bütün protoskoleks antijeni: Antijenler genellikle mezbahalardan temin edilen (özellikle hastalıklı koyun karaciğerinden izole edilen) fertil kistler içindeki protoskolekslerden hazırlanmaktadır. Kist içine yapılan punksiyonla kist sıvısıyla birlikte çekilen protoskoleksler, kist sıvısının santrifüj edilmesiyle sedimentte toplanmakta ve üst kısmın atılmasıyla kist sıvısından ayrılmaktadır. Daha sonra 2-3 kez fizyolojik su ile yıkanan protoskolekslerden mililitrede 4000 veya 6000 adet bulunacak şekilde bir süspansiyon hazırlanmaktadır. Bu süspansiyondan pastör pipeti ile alınarak özel boyalı lamlar üzerindeki çukurlara doğrudan birer damla konup laboratuvar ısısında kurutulmaktadır. Bu şekilde hazırlanan antijenler -20 °C'de 6 ay kadar saklanabilmektedir. Bu antijenler %10'luk formaldehitle tespit edildikten sonra veya hiç tespit edilmeden IFA testinde kullanılabilmektedir (Özcel ve ark 1997).

Protoskoleks kesit antijeni: Hidatik kist sıvılarından steril olarak elde edilerek en az üç kez fizyolojik tuzlu su ile yıkanan protoskoleksler tespit edilmeden bir alüminyum kağıt üzerine konularak kenarlarından filtre kağıdı ile yavaş yavaş suyu alınır. Küme haline getirilen protoskoleksler ince şerit halindeki alüminyum kağıt üzerinde dondurulmak üzere içinde bloklama solüsyonu bulunan plastik bir kapsül içine daldırıldıktan sonra kuru buz veya sıvı azot içinde dondurularak saklanır (Özcel 1978).

Germinal zar kesit antijeni: Kist içinden elde edilen zarlar küçük parçalara ayrılır ve fizyolojik tuzlu su ile üç kez yıkanır. Kobay ya da tavşandan alınmış ince çizgili kasa sarılarak dondurulur ve kesit alınır. Alınan kesitler lamlar üzerine konup -20 °C'de saklanır (Özcel 1978).

IFA testinin çalışma ilkesi, seri sulandırmaları yapılmış şüpheli serumların, daha önceden hazırlanmış antijen lamlarının üzerine damlatıldıktan sonra 37 °C'de

inkübasyona bırakılması, ardından da yıkama işleminin yapılması, daha sonra da antijen-antikor reaksiyonunun meydana gelip gelmediğini anlamak için fluoressein izotiyosiyanat ile işaretli spesifik antikorların (anti-globulin) damlatılması, tekrar 37°C'de 30 dk inkübasyon ve yeniden yıkama aşamasından sonra fluoresan mikroskop altında reaksiyonun gösterilmesi aşamalarından oluşur. Spesifik antikorlar, fluoresan veren bir madde olan fluoressein izotiyosiyanat yardımıyla görülür hale getirilmektedir. Spesifik olmayan fluoresan veya yeşil ışığı maskelemek için Evans blue gibi karşıt boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Test, immünfluoresan mikroskobunda değerlendirilmekte, genellikle parazitin çeperinde veya çekirdeğinde oluşan yeşil-sarı renkteki fluoresan ışık, pozitifliği göstermektedir. Buna karşın negatif olgularda parazitler kırmızı renkte görünmektedirler (Özcel ve ark 1997).

Testin sağlıklı değerlendirilebilmesi için, IFA testi ile yapılan incelemelerin her serisinde, antikor titresi bilinen pozitif ve negatif referans serumlar, konjugat ve fosfat tampon solüsyonu (PBS) da şüpheli seruma yapılan işlemlerin aynılarına tabi tutulmalıdır (Özcel ve ark 1997).

Antijen-antikor reaksiyonunun okunması fluoresan mikroskop ile yapılmaktadır. Mikroskopta testin değerlendirilmesi sırasında, mümkün olan en küçük objektiften yararlanılmalıdır. Böylece parazitleri daha geniş bir alanda değerlendirmek mümkün olmaktadır. Değerlendirme sırasında gözü kamaştıracak kadar şiddetli aydınlatmalardan kaçınılmalıdır. Lam üzerinde şüpheli serum örneklerinin incelendiği her kuyucuk, kontrol örneklerinin bulunduğu kuyucuklar ile karşılaştırılarak değerlendirilmelidir. Bazı preparatların incelenmesi sırasında, kontrol lamlarına birçok kez bakma ihtiyacının doğması nedeniyle, lamların bir lam taşıyıcı üzerine belirli bir sıra ile dizilmesi okuyucuya avantaj sağlayabilmektedir (Özcel ve ark 1997).

IFA testinde spesifiklik limitinin 1/10 veya 1/20 olabileceği birçok araştırıcı tarafından kabul edilmekle birlikte karaciğerde lokalize olan kistlerde, IFAT'ın olguların %95'inde doğru sonuç ve yüksek pozitiflik verdiği; pozitif olguların %25'inde ise pozitiflik değerinin 1/40'ın altında kaldığı, bu zayıf sonuçların diğer yöntemlerle doğrulanması gerektiği ileri sürülmektedir. Akciğerlerde yerleşen kistlerde IFA testinin yaklaşık %66 doğru pozitiflik verdiği ve pozitiflik düzeyinin 1/80'i nadiren geçtiği, bu durumun ise testin sonuçlarının yorumlanmasını

güçleştirdiği bildirilmiş ve sonuçların kistin gelişmesi veya prognozu ile ilgili temeller üzerine oturtulmasının doğru olmayacağı açıklanmıştır (Özcel ve ark 1997).

Şenlik (2000), antijen olarak fertil karaciğer koyun kistlerinden elde edilen protoskoleksleri kullanarak yaptığı çalışmada, pozitif reaksiyonlar için IFA testinde 1/128 ve daha yüksek titrelerin esas alınması gerektiğini, testin duyarlılığının %78,95, özgüllüğünün %92,57 olduğunu bildirmiştir. Kistlerin karaciğer ve akciğerde birlikte bulunduğu durumlarda oluşturdukları antikor düzeyi daha yüksek bulunmuş, sadece karaciğer veya akciğerde bulundukları durumlarda ise antikor titreleri daha düşük düzeyde tespit edilmiştir. Ayrıca kist sayısı ile IFA testi titreleri arasında tam olmamakla birlikte kuvvetli bir korelasyon bulunduğu ve kist sayısının artışına bağlı olarak IFA testinin titrelerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Koyunlarda hidatidoz enfeksiyonlarının teşhisinde, IFA testi ile IHA testine göre daha daha güvenilir sonuçlar alınmıştır. Hem IFA testinde hem de IHA testinde düşük sulandırmalarda yüksek düzeyde yanlış pozitif reaksiyonlar görülmekte olup pozitiflik titrelerinin dikkatli belirlenmeleri gerektiği vurgulanmaktadır.

Şener ve ark (2004), bütün protokoleks, kesit protoskoleks ve germinal membran kesit antijenlerini kullanarak yaptıkları çalışmada IFA testi ile anti-ekinokok antikorlarını araştırmışlardır. IFA testi için, germinal membran kesit antijeninde özgüllüğü ve duyarlılığı %100, bütün protoskoleks antijeninde özgüllüğü %80, duyarlılığı %95, kesit protoskoleks antijeninde özgüllüğü %97, duyarlılığı %100 olarak saptamışlardır. Her üç yöntemle de hazırlanan antijenlerin IFA testinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Germinal membran kesit antijeni ile çapraz reaksiyon görülmemesi, antijen hazırlamak için germinal membran temininin çok daha kolay olması ve bir kist içinden çıkarılacak germinal membran ile yüzlerce test yapılabilecek antijen hazırlanabilmesinin büyük avantaj sağlayabileceğini kaydetmişlerdir.

1.12.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Antijen antikor reaksiyonlarını göstermek için enzimlerin kullanıldığı bir serolojik tanı yöntemi olan ELISA, Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da adlandırılmaktadır (Ak 1997).

Parazitolojik tanıda ELISA şüpheli materyalde antikor yada antijen aramak amacıyla kullanılmaktadır. Parazite özgü antikor aramak amacıyla yapılan ELISA, katı ortamda sandviç yöntemi ve sandviç inhibisyon yöntemi olarak iki şekilde yapılmaktadır. Parazit antijeni ise, direk ELISA tek basamaklı sandviç yöntemi, indirekt ELISA, kompetatif ELISA ve dot-ELISA yöntemleriyle aranmaktadır (Ak 1997).

ELISA testinde polistren plaklara emdirilmiş antijen molekülleri ve anti-immünglobulin eklenmiş renksiz enzimin bulunduğu ortama şüpheli serum dökülür. Serumda antikor varsa antijen-antikor-antiimmünglobulin kompleksi oluşur ve enzim kromojen madde bağlı substrat ile birleşir. Test spektrofotometre ile değerlendirildiğinde absorbans ölçümleri kriter alınır ve belli bir eşik değerin (cut-off) üstü pozitif kabul edilir. Hidatidozun tanısında kullanılan ELISA yönteminin duyarlılığının yüksek olup, çok az miktarda serumun yeterli olması, kesin kantitatif ölçmeyi sağlaması ve kısa zamanda çok sayıda serum örneklerinin işlenmesine olanak sağlaması bakımından rutin kullanıma uygun, duyarlı, özgül ve ekonomik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Altaş 1981).

ELISA yöntemi için kullanılan antijenler, parazitler üretildikten sonra her parazite göre farklı olarak in vivo veya in vitro ortamda saf bir şekilde elde edilmekte ve parazitlerin antijenik özellikleri bozulmadan çeşitli yöntemlerle eritilerek hazırlanmaktadırlar. Bu antijenlerle uygulanan serolojik yöntemlerde parazitlerin tüm proteinleri serolojik reaksiyona katılmaktadır. Bu nedenle pozitiflik ve çapraz reaksiyon oranları artmakta, bunun için başlangıç sulandırma oranları, çapraz reaksiyon oranları araştırıldıktan sonra tespit edilmektedir (Ak 1997).

Ham kist sıvısı antijeni: Koyun karaciğerinden elde edilen fertil hidatik kist sıvısı 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek protoskoleks ve diğer partiküllerin çökmesi sağlanmaktadır. Bu aşamadan sonra elde edilen supernatant 0.45µm'lik filtreden geçirilir ve 12 saat PBS'ye karşı +4°C'de diyaliz edilerek tuz konsantrasyonu düşürülür. Daha sonra porsiyonlara ayrılarak kullanıncaya kadar -20°C'de saklanır (Şimşek ve Köroğlu 2004).

Kısmi Purifiye Antijen (AgB): Hidatik kist sıvısından Antijen B bakımından zengin antijen koyun karaciğerinden elde edilen hidatik kist sıvısı 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek protoskoleks ve diğer partiküllerin çökmesi sağlanır. Elde

edilen 100 ml supernatant hem antijen 5 hem de AgB'yi içermektedir. Bu supernatant 1 gece +4 °C'de 0,005 M acetat buffer (pH=5.0)'a karşı diyaliz edildikten sonra +4 °C'de 15000 g'de 30 dakika santrifüj edilir. Supernatant atılıp altta kalan pellet toplanır ve 10 ml 0,2 M fosfat buffer (pH=8.0)'da çözdürülür. Bu solüsyon 15 dakika su banyosunda tutulduktan sonra +4 °C'de 20000 g'de 1 saat süreyle santrifüj edilerek elde edilen pellet atılır ve Antijen B'den zengin supernatant porsiyonlara ayrılıp kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanır (Oriol ve ark 1971).

ELISA mikropleytlerinin her çukuruna 1 µgr/100 µl olacak şekilde antijen sulandırılarak 100 µl konmaktadır. Mikropleytin üzeri parafilmle veya kendi kapağı ile kapatılarak 1 gece +4 ºC'de bekletildikten sonra ertesi gün mikropleytteki antijen solüsyonu silkelenerek ve kurutma kağıdına ters çevrilip yavaşca vurularak kurutulmaya çalışılmaktadır. Bu işlem kurutma işlemi olarak adlandırılır. Antijenle kaplı mikropleytin çukurlarında antijenle kaplanmamış bölgeler varsa bunları kaplanması amacıyla her çukura 150 µl yağsız süt tozu konarak 1 saat oda ısısında bekletilmektedir. Bu işleme bloklama adı verilmektedir. Antijenler kullanıma hazır hale getirildikten sonra -20 ºC'de 3-6 ay, -70 ºC'de 1 sene saklanabilmektedirler (Ak 1997).

Test edilecek serumlar, pH'sı 7,4 olan PBS ile istenilen dilüsyonlarda seri olarak sulandırıldıktan sonra antijen ile kaplı ve bloklama işlemi yapılmış mikropleyte aktarılır. ELISA yönteminde plak çukurlarına aktarım yapılan her aşamadan sonra 37 ºC'de veya oda ısısında değişen sürelerde inkübasyon uygulanmaktadır. Ayrıca katı faza antjen veya antikor bağlanması ve testin sonunda subsrat eklenmesi basamakları dışındaki her inkübasyondan sonra da PBS ile 3-5 kez yıkanmaktadır (Ak 1997).

ELISA pleytinin kuyucuklarındaki eriyik antijene bağlanmış olan şüpheli serumundaki antijene-spesifik antikorla birleşen anti-insan immünoglobulinleri (polivalan IgG, IgM ve diğerleri) konjuge olarak adlandırılmaktadır. Bu anti-insan antikorlar keçi veya tavşandan elde edildikten sonra, bir enzimle (alkalen fosfataz-AP veya horseradish peroksidaz-HRP) kovalent bağlanarak işaretlenmekte ve liyofilize halde veya solüsyon şeklinde ticari olarak satışa sunulmaktadır. Uygulanan ELISA yönteminde kullanılan konjugedeki enzime paralel olarak da kromojenik substrat seçilmektedir (Zeyrek ve ark 2009).

ELISA sonuçları spektrofotometre (ELISA okuyucusu) ile okunabileceği gibi antikorun olup olmadığı açısından gözle de değerlendirilebilmektedir. Renk yoğunluğu serumdaki parazitin antikor miktarı ile doğru orantılı olmaktadır. Şüphelenilen örnekte antikor veya antijen varlığında yeşil, kahverengi ve mavi olmak üzere kullanılan substrata göre farklı renkler oluşmaktadır. Antijen veya antikor yok ise sonuç renksizdir. Spektrofotometre kullanıldığında sonuçlar absorbans değeri olarak alınmakta, negatif kontrollerin ortalaması ile 2 standart sapma değeri toplandıktan sonra (cut-off) elde edilen sayının üstü pozitif olarak kabul edilmektedir. Ölçülen absorbans ile antijen veya antikor düzeyi arasında belli bir sınıra kadar doğrudan ilişki olmakta, antijen veya antikor belli bir sınırın üstünde olduğunda kaplanmış protein veya konjuge miktarı sınırlayıcı faktör olabilmektedir (Ak 1997). Eckert ve ark (1984), ELISA'da cut-off değeri olarak kabul edilmiş başka bir kiriter yoksa negatif kontrol serumların ortalama değerlerinin iki standart sapması üzerindeki absorbans değerinin alınamsını tavsiye etmişlerdir.

Valerie ilk kez 1971'de peroksidaz konjugatını doku kistlerinde kullanmış ve ELISA'nın IFA testine göre çok daha basit ve duyarlı olduğunu savunmuştur. Farag ve ark (1975), antijen olarak ham ve saflaştırılmış kist sıvısını kullandıkları ELISA testinde saflaştırılmış antijenle daha iyi sonuç aldıklarını, insan hidatidozunun tanısında duyarlı ve spesifik bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Kanwar ve ark (1992), cerrahi olarak doğrulanmış 20 hasta insan serumu ile yaptıkları çalışmada ELISA'nın duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %76 olarak bildirmişlerdir.

Hidatidozlu hayvanların teşhisinde uygulanan ELISA'da farklı antijenler kullanılmıştır. Deneysel enfekte koyunlarda enfeksiyondan sonraki en erken dördüncü ve altıncı haftalarda hidatik antijenlerine karşı şekillenen antikorlar tespit edilmiş ve en az dört yıl kalabilmiştir. Buna rağmen *E. granulosus* ve diğer sestodlar arasındaki serolojik çapraz reaksiyonlar ham parazit antijenlerinin kullanıldığı ELISA ile hidatik enfeksiyonların spesifik tanısını güçleştirmektedir (Zhang ve ark 2003). Ming (1986), antijen olarak saflaştırılmış koyun kist sıvısını kullandığı ELISA yönteminde sığır ve koyunlarda %92,6 ve %95,8 duyarlılık, %95,6 ve %93,3 özgüllük elde etmiştir. Kittelberger ve ark (2002), hidatik kist sıvısından purifiye edilen 8 kDa antijeni (8 kDa ELISA), rekombinant EG95 onkosfer proteini (onc-ELISA) ve ham protoskoleks antijenini (prot-ELISA) kullanarak ELISA testini uygulamışlar ve bu antijenlerin koyun hidatidozisinin tanısındaki yerini

araştırmışlardır. Prot-ELISA'nın özgüllüğü %95,8- 99,5, duyarlılığı ise %51,4-62,7 arasında tespit edilmiştir. Ibrahem ve ark (2002), koyun ham kist sıvısı antjeni, kısmi purifiye kist sıvısı antijeni (AgB) ve rekombinant AgB'yi kullanarak uyguladıkları ELISA testinde ham kist sıvısı antijeninin duyarlılığını %32, özgüllüğünü %90; kısmi purifiye kist sıvısı antjeninin duyarlılığını %88, özgüllüğünü %95 olarak belirlemişler. Rekombinant AgB için ise bu oranları sırasıyla %28 ve % 95 olarak bildirmişlerdir. Moossavi ve ark (2004), testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %79 olarak bildirmişlerdir. Türkiye'de ELISA'yı koyun ham kist sıvısı antijenini kullanarak uygulayan Şimşek ve Köroğlu (2004), testin duyarlılığını %60, özgüllüğünü %94 olarak belirlemişlerdir. Organ lokalizasyonuna bağlı olarak karaciğerdeki kistlerde testin duyarlılığını %47,3, akciğerdeki kistlerde %60, her iki organda birden bulunan kistlerde %69,2, fertil kistlerde %67,8, steril kistlerde %75 ve yeni gelişmeye başlayan kistlerde %38,4 olarak tespit etmişlerdir. Şimşek ve ark (2006), yaptıkları bir diğer çalışmada koyun ham kist sıvısı antijeni ile kısmi purifiye kist sıvısı antijenini kullanarak her iki antijenin duyarlılık ve özgüllük oranlarını ELISA ile test etmişlerdir. AgB'nin duyarlılığı %91,6, özgüllüğü %77,1 olarak belirlenmiş; ham kist sıvısı antijeni için ise bu oranların sırasıyla %79,1 ve %60,4 olduğu tespit edilmiştir.

1.12. 5. Indirekt Hemaglütinasyon Testi (IHAT)

IHA testi arakonaklarda hidatik kistlerin tanısı amacıyla en fazla kullanılan serolojik testlerden birisidir. Hidatidozda kullanılan IHA testi, önceden tannik asitle duyarlılaştırılmış koyun alyuvarlarının uygun antijen ve hasta serumu ortamında birbirine yapışıp kümelenerek (aglütine olmalarıyla) çökmeleri kuralına dayanmaktadır (Merdivenci ve Aydınlıoğlu 1982).

Lightowlers ve ark (1986), hidatik kistlerle enfekte olan ve hidatik kist sıvısı antijeni ile immünize edilen koyunlarda oluşan spesifik serum antikorlarını incelemişler ve tüm enfekte koyunlarda IHA testi ile yüksek antikor titreleri belirlediklerini bildirmişlerdir. Sweatman ve ark (1963), yaptıkları deneysel çalışmada 20 koyunun 18'ini IHA testi ile pozitif tespit etmişler ve pozitiflik sınırını 1/400 olarak belirlemişlerdir. Nijeruh ve Gathuma (1987), hidatik kistli koyun ve keçi serumlarında yaptıkları çalışmada 1/256 titrede testin duyarlılığını %92,7, özgüllüğünü %99 olarak tespit etmişlerdir. Conder ve ark (1980), deneysel enfekte

koyun serumlarına IHA testini uygulamışlar ve düşük titrelerde yanlış pozitif reaksiyonların görülebileceğini belirtmişlerdir. 1/1024 ve daha yukarı titrelerin pozitif kabul edildiğinde ise çapraz reaksiyonları elimine ettiğini gözlemlemişlerdir. Türkiye'de ise IHA testi ile koyunlarda yapılan çalışmalarda Dik ve ark (1998), %91.04 duyarlılık, %80,7 özgüllük elde etmişlerdir. Bazı araştırıcılar akciğer kistlerinin %73'ünde, karaciğer kistlerinin %89'unda IHAT pozitif bulmuş iken (Kuru ve Baysal 1999), bazı araştırıcılar akciğer kistlerinin %59'unda, karaciğer kistlerinin ise %76'sında IHAT pozitifliğine rastlamışlardır (Wattal ve ark 1986). Şenlik (2000), koyunlarda yaptığı çalışmada 1/256 ve daha yukarı titrelerde testin duyarlılığını %78,2, özgüllüğünü %77,03 olarak tespit etmiştir. Araştırmada *Cysticercus tenuicollis* ve *Monezia* türleri ile enfekte koyun serumlarında IHA testi ile çapraz reaksiyonlar görülmüştür. Ayrıca fertil kistlerde daha yüksek antikor cevabı oluştuğu, kalsifiye kistlerde ise antikor cevabının daha düşük düzeyde kaldığı tespit edilmiştir.

1.12.6. Lateks Aglütinasyon Testi (LAT)

İlk kez 1960'da kullanılan bu testte ekinokok antijenleri ile kaplanmış lateks partikülleri kullanılmaktadır. Hasta serumu ile karşılaşan lateks partikülleri 10 dakikada çökmektedir. Force ve ark (1992), yaptıkları çalışmada testin duyarlılığının %83, özgüllüğünün %94 olduğunu bildirmişlerdir. Picardo ve Guisantes (1981) de yaptıkları çalışmada LA testinin duyarlılığının %86,7, özgüllüğünün %99 olduğunu ifade etmişlerdir.

1.12.7. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein karışımlarının polyacrylamide jel içinde analizine dayanan bu yöntem oldukça hızlı ve mikrogramla ifade edilebilecek bir hassasiyete sahip olduğu gibi boyama veya otoradyografi ile jeldeki proteinlerin teşhisinde son derece hassas bir yöntemdir. Yöntemin en önemli özelliklerinden biri de çok sayıda komponent içeren proteinlerin kompleks karışımlarının ayrılmasını sağlamasıdır (Altıntaş ve Yolasığmaz 1997).

Burgu ve ark (2000) koyun hidatik kist sıvısının SDS-PAGE ile analizinde dokuz farklı spesifik protein bandı elde etmişler ve 116 kDa'lık bandın koyunlarda

spesifik tanı koyulmasında en önemli bant olduğunu belirtmişlerdir. Aynı yöntemi kullanan Şimşek ve Köroğlu (2004) ise altı farklı polipeptid bandı tespit etmişler ve bunlar içerisinde en belirgin olanın yine 116 kDa'lık bant olduğunu bildirmişlerdir.

1.12.8. Western Blot (Immunoblot)

Ayrıştırılan proteinlerin jellerden membranlara transfer yöntemlerinin geliştirilmesi, proteinlerin elektroforetik analizi için yeni bir devir açılmasına neden olmuştur. Immünoblotting ya da Western blotting adı verilen bu immünokimyasal yöntemler bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada kullanılmaktadır. Bu transfer yöntemi 'blotting', proteinlerin membranlara transferi ise 'western blotting' olarak isimlendirilmiştir (Stott 1989).

Elazığ yöresindeki koyunlarda yapılan bir çalışmada Western Blot'un duyarlılığı %88, özgüllüğü %84 olarak belirlenmiş, karaciğerdeki kistlerde duyarlılık %84,2, akciğerdeki kistlerde %80,2 her iki organda birden bulunan kistlerde %92,3 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada testin duyarlılığı fertil kistlerde %92,8, steril kistlerde %75, kalsifiye kistlerde %100 ve yeni gelişmeye başlayan kistlerde %84,6 olarak saptanmıştır (Şimşek ve Köroğlu 2004). Koyunlarda Enzyme linked immünoelectrotransfer blot (EITB) testini kullanan Dueger ve ark (2003) ise duyarlılığı %91,4 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca yalnız karaciğeri kistli koyunlarda %81,8, yalnız akciğeri kistli koyunlarda %84,8, hem karaciğeri hem de akciğeri kistli koyunlarda %94,4 olarak tespit etmişlerdir.

1.12.9. Immundifüzyon (ID) ve Immunoelektroforez (IE)

Bu testler antijen ve antikor moleküllerinin jel içinde optimal konsantrasyonda yayılırken karşılaştıkları bölgede presipitasyon oluşturarak çizgi şeklinde görülür hale gelmesi esasına dayanmaktadır. İlk kez Chordi ve Kagan hasta serumuyla karşılaşan kist sıvısı antijenlerinin aynı bölgede çok belirgin bir presipitasyon bandı verdiklerini gözlemlemişler, bu banda 'Arc5' ve bunu yapan antijene de Antijen 5 adını vermişlerdir (Chordi ve Kagan 1965).

Hamel ve Ris (1982), doğal enfekte, deneysel enfekte ve enfekte olmayan koyunlarda yaptıkları çalışmada IE'de kullanılan katodik antijene karşı oluşan antikorların tanıda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmada ortaya çıkan yanlış

pozitifliklerin çoğunun *T. ovis* veya *T. hydatigena* larvalarının hafif enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. İnsanlardaki kistik ekinokokkozis enfeksiyonları için en spesifik immünodiagnostik test olan IE testinin koyunlardaki enfeksiyonların kesin teşhisinde kullanışlı olmadığı bildirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneysel Enfeksiyon

Araştırmada 4-5 aylık Akkaraman 20 erkek kuzu ve 4-5 aylık 1 adet dişi köpek kullanılmıştır. Bahri Dağdaş Uluslarası Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilen kuzuların dışkı muayeneleri yapılarak paraziter enfeksiyonlar yönünden negatif oldukları kaydedilmiştir. Kuzuların 10'u deneme, 10'u kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Hayvanlar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliğinde barındırılmış ve deney süresince kuzu büyütme yemi ve kaba yem ile ad libitum olarak beslenmiştir.

Mezbahadan alınan ve kısa sürede laboratuvara getirilen kistli koyun karaciğerinden steril koşullarda kist sıvısı enjektörle aspire edilerek protoskoleksler ayrılmış ve protoskolekslerin canlılık tayini Methylene blue boyama yöntemi ile yapılmıştır. 15.000 canlı protoskoleks sonda yoluyla köpeğe verilmiştir. 2 ay sonunda gelişen *E. granulosus*'ları ince bağırsak lümeninden toplamak için ötanazi sonrası nekropsi yapılmıştır. Nekropsi sonucunda bistüri ve pens yardımıyla bağırsak mukozasından kazınarak toplanan parazitler fizyolojik suda yıkanarak olgun halkalar ezilmiş ve elde edilen yumurtalardan deneme grubundaki her bir kuzuya yaklaşık 2000 adet oral yolla verilerek enfeksiyon oluşturulmuş ve 12 ay boyunca takip edilmiştir. 12 ay sonunda hayvanların nekropsileri yapılarak başta karaciğer ve akciğer olmak üzere bütün organ ve dokular hidatik kist yönünden makroskobik olarak incelenmiştir. Bu süre sonunda gelişen hidatik kistlerden bir tanesinin germinal membranı ve protoskoleksleri ayrılarak DNA izolasyonunda kullanılmış ve suş tayini yapılmıştır.

2.2. Laboratuvar Çalışmaları

2.2.1. Serumların Elde Edilmesi

Deneme ve kontrol gruplarında bulunan hayvanların *Vena jugularis*'lerinden 10-15 ml kan alınmıştır. Kan örnekleri, yumurtalar oral yolla verildikten sonra iki ay boyunca haftalık periyotlarla toplanmış ve bundan sonra da aylık periyotlarla toplanmaya devam edilmiştir. Steril tüplerdeki kan numuneleri 4000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiş ve serum ayrılmıştır. Her bir kan örneğinden elde edilen serumlar 1.5 ml'lik ependorf tüplere paylaştırılmış, ELISA ve IFA testinde kullanılıncaya kadar -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

2.3. ELISA Testi

ELISA testinin uygulanması sırasında gerekli olan araç, gereç ve tampon solüsyonlar şunlardır:

a) ELISA okuyucusu

b) Kapaklı test mikropleytleri

c) Antijen: Kısmi Purifiye Antijen (AgB) kullanılmıştır.

Koyun karaciğerinden elde edilen hidatik kist sıvısı 5000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek protoskoleks ve diğer partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Bu supernatant 1 gece +4 °C'de 0,005 M acetat buffer (pH=5.0)'a karşı diyaliz edildikten sonra +4 °C'de 15000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant atılıp altta kalan pellet toplanmış ve 10 ml 0,2 M fosfat buffer (pH=8.0)'da çözdürülmüştür. Bu solüsyon 15 dakika su banyosunda tutulduktan sonra +4 °C'de 20000 g'de 1 saat süreyle santrifüj edilerek elde edilen pellet atılmış ve Antijen B'den zengin supernatant elde edilmiştir (Şimşek ve ark 2006).

d) Stok solüsyonlar ve tamponlar:

I. Karbonat buffer (pH: 9,6):

Na_2CO_3	1,59 g
$NAHCO_3$	2,93 g
Distile su	1000 ml

II.10XPBS (pH: 7,4):

NaCl	80 g
KCL	2 g
Na_2HPO_4	11,5 g
KH_2PO_4	2 g
Distile su	800 ml

Bu karışımın pH'sı ayarlandıktan sonra karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

III. % 0,1 Tween-20 içeren PBS:

1X PBS içerisine % 0,1 oranında Tween-20 eklenip iyice karıştırılmıştır.

IV. % 0,002 Tween-20 içeren PBS:

1X PBS içerisine % 0,02 oranında Tween-20 eklenip iyice karıştırılmıştır.

V. Konjugat:

Peroksidaz enzimiyle işaretli anti-sheep IgG antikoru (Sigma Immünochemicals Cat, No: A3415) kullanılmıştır.

VI. Substrat:

10 ml substrate solusyonu için:

0,1 M citric asit	3,68 ml
0,2 M Na_2HPO_4	6,32 ml
H_2O_2 (%3'lük)	100 µl

Bu karışımın içerisine 10 mg o-phenylenediamine (OPD) (Sigma cat. No: P3804) tableti atılarak eritildikten sonra koyu renkli bir cam şişede karanlıkta bekletilmiştir.

VII. Durdurma solüsyonu:

Reaksiyonu durdurmak için 3 M H_2SO_4 solüsyonundan her bir kuyucuğa 50 µl damlatılmıştır.

e) ELISA testinde kullanılan kontrol maddeleri:

- Negatif kontrol serumu: Mezbahada kesimi yapılan ve herhangi bir paraziter enfeksiyonun saptanmadığı koyun serumu kullanılmıştır.
- Pozitif kontrol serumu: Mezbahadaki kesim sonrası muayenede karaciğer veya akciğerinde çok fazla kist hidatik bulunan, bağırsaklarında sestod ve nematod saptanmayan koyun serumu kullanılmıştır.

f) Test için gerekli diğer malzemeler

İnkübasyon işlemlerinde yararlanılan 37 ºC'lik etüv, tek kanallı ve çok kanallı mikropipetler ve serum titrelerinin yapılacağı sulandırma tüpleri veya mikropleytler, testin uygulanması sırasında kullanılan diğer malzemelerdendir.

2.3.1. Plakların antijenle kaplanması

ELISA pleytinin her bir kuyucuğuna protein konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde 0,05M Karbonat/Bikarbonat Buffer (pH:9,6) ile sulandırılan eriyik antijenden tüm çukurlara 100 µl konularak üzeri kapatılmış ve +4 ºC'de 1 gece bekletilmiştir.

2.3.2. Testin uygulanışı

- Bir gece önceden antijenle kaplanan pleytler +4 ºC'de 1 gece inkubasyondan sonra antijen dökülüp pleyt, her bir kuyucuğa 130 µl olcak şekilde %0,1 Tween 20 içeren PBS ile bir kez yıkanmıştır.
- Plağın antijenle kaplanmamış bölgelerini kaplamak için her bir kuyucuğa 130 µl 1X PBS ile sulandırılmış %5'lik yağsız süt tozundan damlatılarak bloklama işlemi yapılmış ve bu şekilde 37 ºC'lik etüvde 2 saat bekletilmiştir.
- Bloklama işleminden sonra %0,1'lik Tween-20 içeren PBS ile iki defa yıkanmıştır.
- İşlenecek serumların her biri usulüne uygun şekilde %0,02 Tween-20 içeren PBS ile 1/200 oranında sulandırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 110 µl damlatılmıştır. Her sulandırma kontrol amacıyla çift çukur olarak çalışılmıştır.
- 37 ºC etüvde 1,5 saat bekletilmiştir.
- Daha sonra en az beş defa %0,1'lik Tween-20 içeren PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama işlemi bittikten sonra konjugat %0,02 Tween-20 içeren PBS ile 1/5000 oranında sulandırılmış ve her kuyucuğa 100 µl damlatılarak 37 ºC etüvde tekrar 1,5 saat bekletilmiştir.
- Konjugat dökülerek %0,1'lik Tween-20 içeren PBS ile en az beş defa yıkama işlemi yapılmıştır.
- Yıkama işleminden sonra her kuyucuğa 100 µl substrat damlatılmış ve 15-20 dakika beklenmiştir. Bu substratlar enzim tarafından hidrolize edildiğinde renk açığa çıkmaktadır.

- Bu sürenin sonunda her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu ilave edilmiş ve kuyucuklar ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedilmiştir.

2.3.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlar absorbans değeri olarak alınmıştır. Test edilen negatif kontrol serumlarının absorbans değerlerinin standart sapması 2 ile çarpılıp, aritmetik ortalaması ile toplanarak pozitiflik sınırı (cut-off) tespit edilmiştir. Bu değerin üstündeki değerler pozitif olarak kabul edilmiştir. Standart sapma SPSS 16,0 istatistik programı ile hesaplanmışır.

2.4. IFA Testi

IFA testinin uygulanması sırasında gerekli olan araç-gereç ve tampon solüsyonlar şunlardır:

a) Fluoresan mikroskop

Bu araştırmada Olympus BX51 (Japan) fluoresan mikroskop kullanılmıştır.

b) Antijen Lamları

Bu araştırmada ticari multitest slaytlar (15 well, ICN- 6041505) antijen kaplamak için kullanılmıştır.

c) Tampon solüsyonlar

Bu araştırmada serum sulandırmaları ticari PBS tabletleriyle hazırlanan tamponla yapılmıştır. Test prosedürü sırasındaki yıkamalarda kullanılan PBS tampon aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

I. PBS tampon (pH 7,2)

NaCl	38,25 g
Na_2HPO_4	3,62 g
KH_2PO_4	1,05 g
Distile su	5 lt

II. Gliserin tampon: Bu araştırmada dokuz hacim saf gliserin içine bir hacim PBS tampon (pH 7,2-7,6) karıştırılarak hazırlanan gliserin tampon kullanılmıştır.

d) Flouresans Konjuge (Konjugat)

Bu araştırmada FITC-conjugated anti-sheep IgG (Sigma F-7634) konjugatı kullanılmıştır.

f) Testte kullanılan diğer malzemeler

İnkübasyon işlemlerinde yararlanılan 37 ºC'lik etüv, nemli ortam için kullanılacak kapaklı küvetler, lam yıkama kapları (şale), lam taşıyıcıları, pipetler ve serum titrelerinin yapılacağı sulandırma tüpleri veya mikropleytler, testin uygulanması sırasında kullanılan diğer malzemelerdendir.

2.4.1. Bütün protoskoleks antijeninin hazırlanması

Mezbahada kesilen ve karaciğerinde hidatik kist olduğu saptanan koyun karaciğeri bekletilmeden laboratuvara getirilmiştir. Kist içindeki sıvı enjektörle tamamen aspire edilerek protoskolekslerin ve diğer partiküllerin çökmesi için 30 dakika bekletilmiş ve 1000 devir/dak'da 15 dakika santrifüj edilerek parazit yoğunluğu arttırılmıştır. Daha önce 1 saat alkol eter karışımında bekletilmiş multitest lamların her bir çukuruna 10-15 protoskoleks düşecek şekilde yayılmıştır. Oda ısısında kurutulan lamlar paketlenerek kullanılıncaya kadar -20 ºC' de saklanmıştır.

2.4.2. Testin uygulanışı

- İşlenecek olan serumlar bir gün önce derin dondurucudan (-20 ºC) çıkarılmış ve buzdolabına (+4 ºC) konulmuştur.
- Antijen preparatları teste başlamadan 30 dk önce buzdolabından (+4 ºC) çıkarılmış ve oda ısısında bekletilmiştir.
- İşlenecek serumların her biri usulüne uygun şekilde mikrotiter pleytlerde PBS ile 1/80 oranında sulandırılmıştır.
- Antijen preparatları numaralandırılarak rutubetli ortama konulmuş (Rutubetli ortam, kapaklı bir küvet içine süzgeç kâğıdı serilerek üzerine distile su dökülüp hazırlanmıştır), sonra sulandırılmış serumlardan antijen preparatlarındaki kuyucuklara 10'ar µl damlatılmıştır.
- Rutubetli ortam küvetinin kapağı kapatılıp 37 ºC etüvde 30 dk inkubasyona bırakılmıştır.
- Bu sürenin sonunda preparatlar, PBS ile beşer dakika süreyle bir defa elde, iki defa manyetik karıştırıcıda yıkanmıştır.

- Preparatlar yeniden küvet içine dizilmiş, her kuyucuğa hazır konjugattan birer damla damlatılmış ve preparatlar 37 ºC etüvde tekrar yarım saat bekletilmişlerdir.
- Preparatlar PBS ile beşer dakika süreyle bir defa elde, iki defa manyetik karıştırıcıda tekrar yıkanmıştır.
- Daha sonra her bir preparatın üzerine 2-3 damla gliserinli buffer damlatılarak üzerlerine lamel kapatılmıştır.
- Preparatlar karanlık odada, fluoresan mikroskobun 40'lık neofluar objektifi ile incelenmişlerdir.

IFA testi değerlendirmeleri aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

+++ : Mükemmel pozitiflik

++ : İyi pozitiflik

+ : Pozitiflik

- : Negatif (fluoresan vermeyen)

Bu testi değerlendirirken kullanılan (+) değerler, fluoresan mikroskopta parlamanın güçlü ve net oluşuna göre semi kantitatif olarak tespit edilmişlerdir.

2.5. DNA Ekstraksiyonu

Bir yıl sonunda gelişen hidatik kistlerden bir tanesinin germinal membranı ve protoskoleksleri ayrılarak %70 ethanol içine alınmış ve genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla ticari kit olarak Genomic DNA Purification kiti (K0512, Fermentas) kullanılmıştır.

- Protoskoleksler ve germinal membran PBS ile 5 kez yıkanıp 600 µl Lysis solüsyonu içerisinde 20 µl Proteinaz K (20mg/µl) eklenerek 56 ºC'de bir gece inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresince ependorf tüp periyodik aralıklarla vortekslenerek sindirim işleminin daha etkili olması sağlanmıştır.
- 12 saat sonunda süpernatant temiz bir ependorfa alınmış ve üzerine 600 µl kloroform ilave edilerek elle 3-5 kez alt-üst edilmiştir.
- Sonra 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip üstteki berrak kısım alınmıştır.

- Üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonundan ilave edilerek elle 1-2 dk altüst edilmiştir.
- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve üzerine 100 µl 1,2 M NaCl solüsyonundan ilave edilerek yavaş şekilde vortekslenmiştir.
- Daha sonra üzerine 300 µl saf soğuk etanol ilave edilerek 10 dk -20 ºC'de bekletilmiştir.
- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek süpernatant yavaşca atılmış ve üzerine %70'lik 600 µl soğuk etanol ilave edilip vortekslenerek yıkanmıştır.
- Daha sonra 1 dk sanrifüj edilmiş ve süpernatant dökülerek ependorf ters çevirilerek kurumaya bırakılmıştır.
- Pellet, üzerine 70 µl steril distile su eklenerek sulandırılmış ve 65 ºC'de 1 saat bekletildikten sonra +4 ºC'ye kaldırılmış ve hedef DNA olarak kullanılmıştır.

PZR'de *E.granulosus* s.s.'nun mitokondrial 12S rRNA geninin 254 baz çiftlik (bç) bölgesini çoğaltan E.g.ss1for. 5'- GTATTTTGTAAAGTTGTTCTA-3' ve E.g.ss1rev. 5'-CTAAATCACATCATCTTACAAT-3' (Iontek, Türkiye) primer çifti kullanılmıştır. Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR buffer, 5 µl 25 mM $MgCl_2$, deoksinükleotidlerin her birinden 250 µM, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase enzimi (MBI Fermentas, Lithuania), primer çiftlerinin her birinden 20 pmol ve ortalama 200 ng template DNA ilave edilmiştir. PZR amplifikasyonunda 95 ºC'de 3 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94 ºC'de 30 sn denaturasyon, 57 ºC'de 1 dk annealing, 72 ºC'de 40 sn sentez olarak gerçekleştirilmiştir. Son siklusu takiben 72 ºC'de 5 dk son uzama işlemi yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu Thermo-Hybaid PX2 cihazında gerçekleştirilmiştir.

PZR'de elde edilen ürünler %1,4'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. 10 µl PCR ürünü, 5 µl yükleme solüsyonu (Promega, Madison, WI, USA) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, ethidium bromide (10mg/ml) ile 30 dk boyanıp, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelenmiştir. Bandların moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bp'lik marker (Promega, Madison, WI, USA) kullanılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak daha önce DNA dizi analizi

yaptırılarak koyun suşu (G1) olduğu belirlenen koyun izolatının DNA'sı, negatif kontrol olarak ise steril distile su kullanılmıştır.

2.5.1. PZR analizinde kullanılan ayıraçlar

I. 10XPCR Buffer (MBI Fermentas, Lithuania):

Tris-HCl (pH=8,8; 25 ºC)	750 mM
$(NH_4)_2SO_4$	200 mM
Tween 20	%0,1

II. $MgCl_2$ (MBI Fermentas, Lithuania): 25 mM $MgCl_2$ 5 µl kullanılmıştır.

III. dNTP Set (100 mM; dATP, dTTP, dCTP, dGTP; MBI Fermentas, Lithuania): Steril distile su ile 1,25 mM sulandırılarak 4 µl kullanılmıştır.

IV. Taq DNA Polymerase Enzimi (5 U/ µl; MBI Fermentas, Lithuania): 0,25 µl kullanılmıştır.

V. Primerler (Bio Basic, Markham Onterio, Canada)**:**

E.g.ss1for. 5'-GTATTTTGTAAAGTTGTTCTA-3'

E.g.ss1rev. 5'CTAAATCACATCATCTTACAAT-3'

Primerler PZR'de 20 pmol olacak şekilde sulandırılmıştır.

2.5.2. Elektroforez işleminde kullanılan solusyonlar

I. 5XTris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu:

Tris	54,4 g
Borik Asit	27,2 g
EDTA	4,6 g

Distile su ile 1 lt'ye tamamlanıp pH 8,3'e ayarlanmıştır.

II. Agarose LE, (Promega, Madison, US): Kaynatılarak hazırlanmıştır.

Agaroz	0,7 gr
1XTBE	50 ml

III. 100bp DNA ladder (Promega, Madison, US): 5 µl kullanıldı.

IV. Loading Dye Solüsyonu (6X; Promega, Madison, US): 1/6 oranında sulandırılarak 5 µl kullanılmıştır.

V. Ethidium Bromide (Promega, Madison, US): %1,4'lük hazırlanan agaroz jel içine 60 µl Ethidium bromide ilave edilerek jel kasetine dökülmüş, tarak yerleştirilmiş ve +4 ºC'de 10-15 dk bekletilerek donması sağlandı.

3. BULGULAR

Deneysel enfeksiyon oluşturulan koyunların 12 ay sonunda nekropsileri yapılmış ve başta karaciğer ve akciğer olmak üzere bütün organ ve dokular hidatik kist yönünden makroskobik ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Bu bulgulardan elden edilen makroskobik sonuçlar Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneme grubu koyunlarının nekropsi sonuçları.

Kuzu No	Karaciğer		Akciğer		
	Kist Sayısı	Kist Çapı (cm)	Kist Sayısı	Kist Çapı (cm)	Toplam kist sayısı
1	2	0,1	2	0,7-0,5	4
2	3	0,1	4	0,7-0,5	7
3	2	1,5	-	-	2
4	-	-	3	0,5-1	3
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	
8	1	0,1	-	-	1
9	2	0,2-0,7	-	-	2
10	1	0,1	-	-	1
Toplam	11		9		20

Bu tabloda görüldüğü gibi, bir nolu koyunda akciğerde sağ kaudal lobun uç kısmında bir adet, akciğer yüzeyinde bir adet, karaciğer yüzeyinde iki adet toplu iğne başı büyüklüğünde kistler tespit edildi (Resim 3.1).

İki nolu koyunda akciğerinde sağ kaudal lobunda 0,7 cm çapında bir ve akciğerin sağ cranial lobunda 0,5 cm çapında iki ve sağ cranial lobun uç kısmında kesit yüzünde de devam eden sert beyazımsı 0,5 cm çapında bir kist tespit edildi. Karaciğerde ise kesit yüzünde devam eden bir, yüzeyde ise iki kalsifiye kist tespit edildi.

Üç nolu koyunda karaciğerin kaudal kısmında kesit yüzeyinde de devam eden 1,5 cm çapında bir kist ile karaciğer yüzeyinde toplu iğne başında büyüklüğünde kalsifiye bir kist tespit edildi.

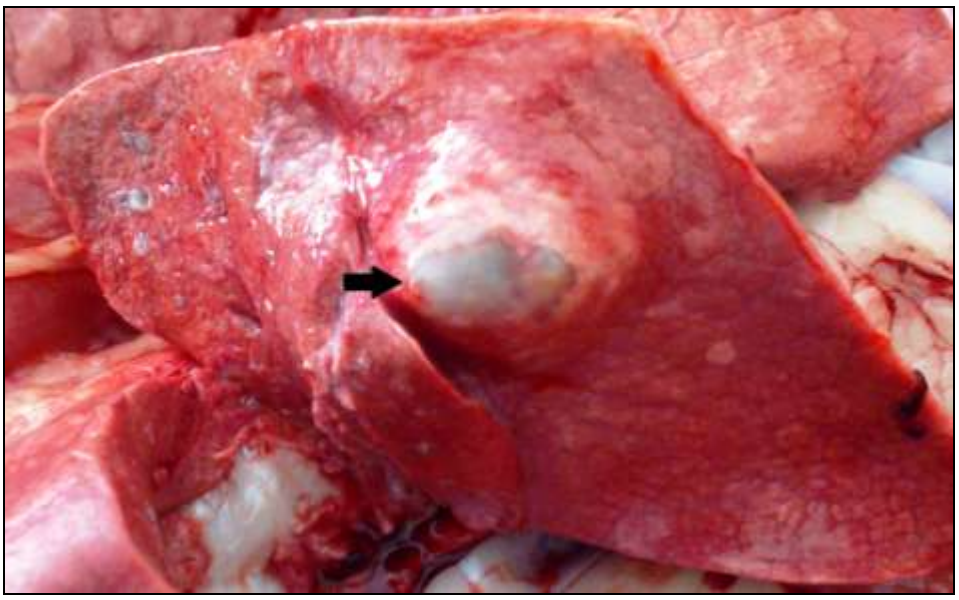
Dört nolu koyunda akciğerin sol cranial lobunda 1cm çapında bir kist ve sol caudal lobun ön kısmında 0,5 cm çapında iki kist tespit edildi (Resim 3.2).

Dokuz nolu koyunda birisi karaciğer yüzeyinde (0,2 cm çapında), diğeri ise kesit yüzünde (0,7 cm çapında) olmak üzere iki kist tespit edildi (Resim 3.3).

Sekiz ve on nolu koyunlarda karaciğerde kalsifiye kistler tespit edildi.

Beş, altı ve yedi nolu koyunlarda kist oluşumu gözlenmedi.

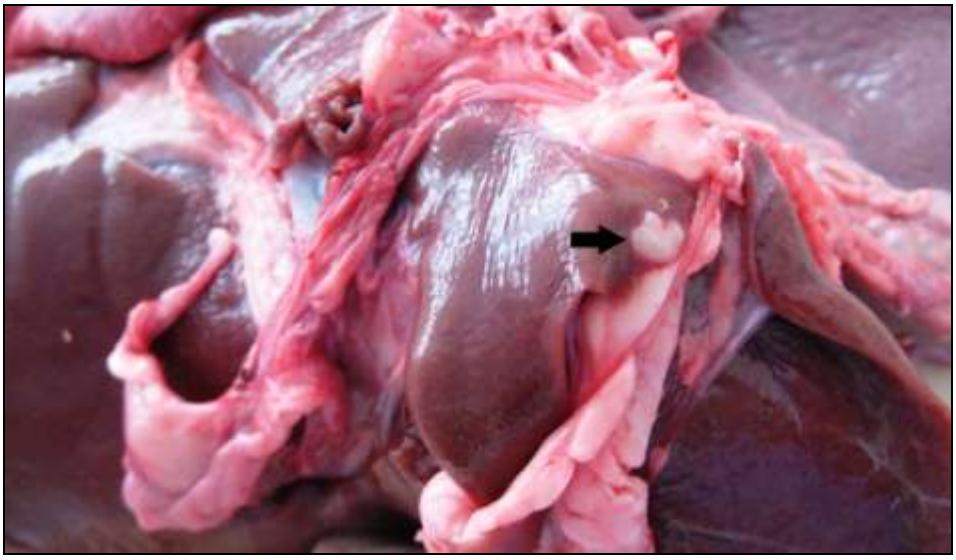
Kist sayısı ile OD (Absorbans) arasında yapılan Pearson korelasyon testine göre korelasyon tespit edilmemiştir (0,358, p<0,310).



Resim 3.1. Bir numaralı koyunda akciğerde hidatitk kist



Resim 3.2. Dört numaralı koyunda akciğerde hidatik kist'ler



Resim 3.3. Dokuz numaralı koyunda karaciğer parankiminde hidatik kist

Deneysel enfeksiyon oluşturulan koyunların karaciğer ve akciğer dokuları hidatik kist yönünden histopatolojik olarak da incelenmiştir. Bu bulgulardan elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Bir numaralı koyunda akciğerde kist duvarı gözlendi. Kist duvarının dışında yabancı cisim dev hücreleri ve mononükleer hücre infiltrasyonu ve en dışta fibröz kapsül gözlendi.

İki numaralı koyunda akciğerdeki iki ayrı bölgede kist duvarının şekillendiği gözlendi. Kistin olduğu kısımlarda yer yer nekroz ve kalsifikasyon gözlendi. Bağ doku ve mononükleer hücre infiltrasyonun fazla olduğu dikkat çekti. Kistik yapının en dışında fibröz bir kapsülün geliştiği gözlendi. Karaciğerde iki ayrı bölgede ise yoğun eozinofil infiltrasyonu ve kalsifikasyon tespit edildi (Resim 3.4).

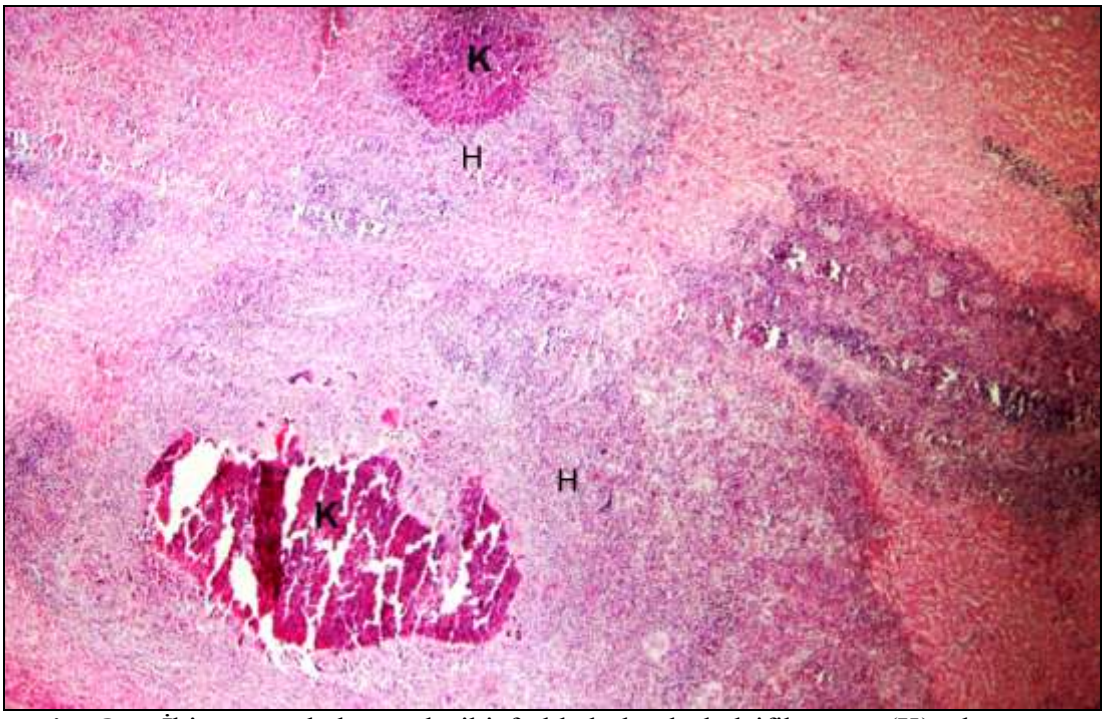
Üç numaralı koyunda karaciğerde bir alanda nekroz bunun etrafında yabancı cisim dev hücreleri, mononükleer hücre infiltrasyonu ve en dışta kapsül oluşumu saptandı. Farklı bir bölgede birbirine yakın iki ayrı kistik oluşum ve bunlara ait kist duvarı saptandı. Kist duvarının dışında yabancı cisim dev hücreleri, mononükleer hücre infiltrasyonu ve en dışta fibröz kapsül saptandı (Resim 3.5).

Dört numaralı koyunda karaciğerde iki ayrı alanda kalsifikasyon vardı. Kalsifiye alanın etrafında yabancı cisim dev hücreleri ve mononükleer hücre infiltrasyonu, ayrıca eozinofil granülositler belirlendi. Bağ dokudan oluşmuş bir

kapsül oluşumu gözlenmedi. Akciğerde kist duvarının şekillendiği gözlendi. Kistin bulunduğu alanlarda nekroz ve kalsifikasyon gözlendi. Etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu ve kistik yapının en dışında fibröz kapsül gelişmişti.

Sekiz ve on numaralı koyunda karaciğerde bir bölgede fokal mononükleer hücre infiltrasyonu, eozinofil granülosit infiltrasyonu ve kalsifikasyon gözlendi.

Dokuz numaralı koyunda karaciğerde bir bölgede kist duvarı, kist duvarının dışında yabancı cisim dev hücreleri ve mononükleer hücre infiltrasyonu ve en dışta fibröz kapsül gözlendi. Karaciğerde farklı bir alanda nekroz, nekrozun etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu ve eozinofil granülositler gözlendi.



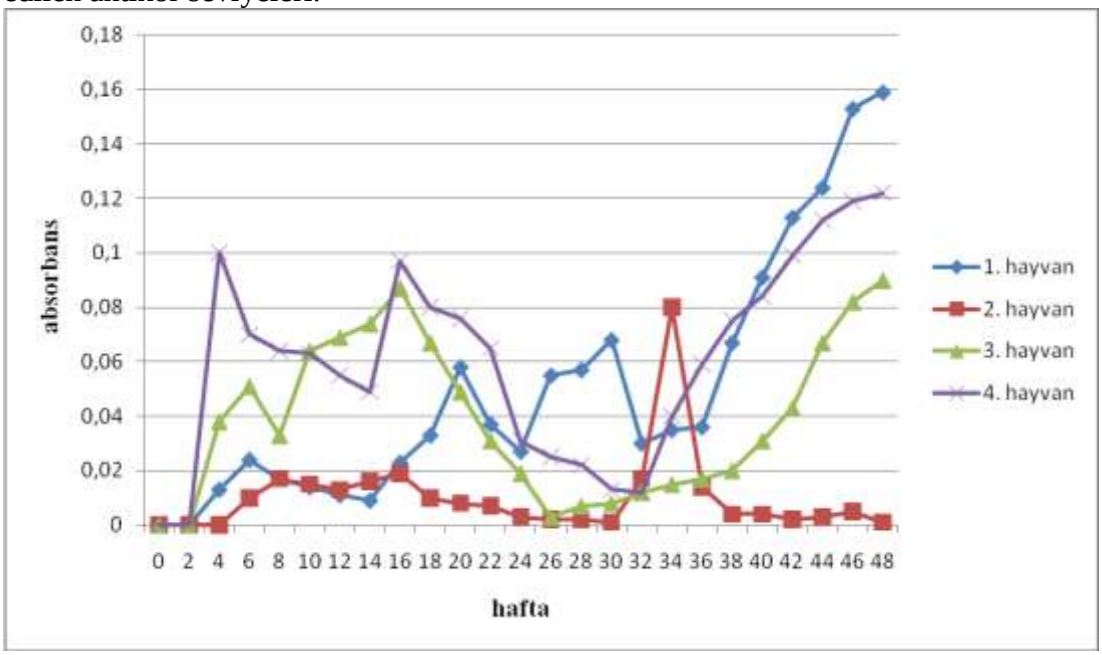
Resim 3.4. İki numaralı koyunda iki farklı bölgede kalsifikasyon (K) oluşumu ve bunların etrafında mononükleer hücre ile eozinofil granülosit infiltrasyonları (H), HE x4



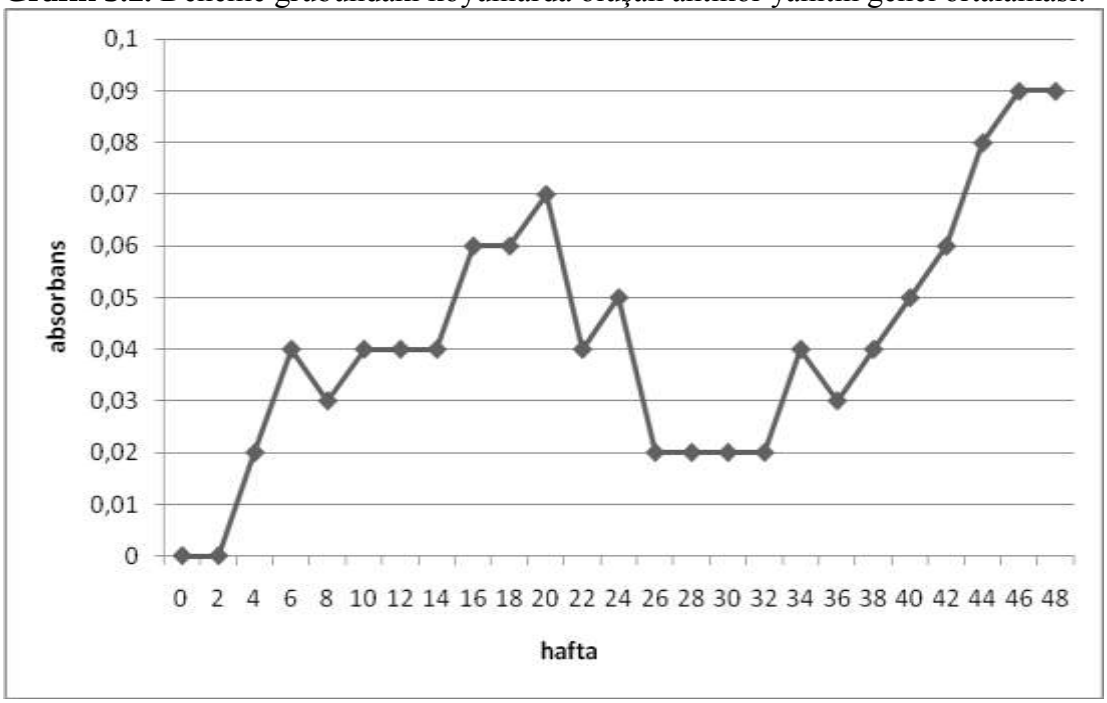
Resim 3.5. Üç numaralı koyunda karaciğerde iki ayrı kistik oluşum, kist duvarı (oklar), bunları çevreleyen yabancı cisim dev hücreleri (ok başı) ve en dışta fibröz kapsül (F), HE x20

Deneysel enfeksiyon oluşturulan koyunlardan 2 ay boyunca haftalık periyotlarla bundan sonrada aylık periyotlarla, kan alınarak serumları çıkarılmış ve bu serumlar ELISA ve IFA testi ile test edilmiştir. Bu periyotta enfeksiyon oluşan koyunlarda şekillenen antikor yanıtları Grafik 3.1 ve 3.2'de belirtilmiştir.

Grafik 3.1. Deneme grubundaki koyunlarda enfeksiyondan sonraki dönemde tespit edilen antikor seviyeleri.



Grafik 3.2. Deneme grubundaki koyunlarda oluşan antikor yanıtın genel ortalaması.



Kontrol grubundaki koyunlarda antikor yanıt tespit edilmemiştir. Deneysel enfekte on koyunun ELISA'da şekillenen antikor yanıtları ile nekropsi bulguları arasındaki ilişki Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Deneysel enfekte koyunların ELISA sonuçları ve nekropsi bulguları arasındaki ilişki.

Kuzu no	Seroloji	Nekropsi
1	Pozitif	Pozitif
2	Pozitif	Pozitif
3	Pozitif	Pozitif
4	Pozitif	Pozitif
5	Pozitif	Negatif
6	Negatif	Negatif
7	Negatif	Negatif
8	Negatif	Pozitif
9	Negatif	Pozitif
10	Negatif	Pozitif

Bu çalışmada nekropsi sonuçları altın standart olarak ele alınmış ve ELISA testinin duyarlılık ve özgüllüğü ile iki veri arasındaki uyumluluk hesaplanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Deneysel enfekte koyunların ELISA ve nekropsi sonuçlarının karşılaştırılması.

	NEKROPSİ			
ELISA		+	-	Toplam
	+	4 (a)	1 (b)	5
	-	3 (c)	2(d)	5
	Toplam	7	3	10

Duyarlılık (sensitivite): a/a+cX100

Özgüllük (spesifite): d/b+dX100

Yanlış pozitiflik oranı: b/b+dX100

Yanlış negatiflik oranı: c/a+cX100

Çalışmada kullanılan ELISA testinin duyarlılık ve özgüllük oranlarının belirlenmesi Çizelge 3.3'de belirtilen kriterlere göre yapılmıştır. Bu çalışma ile ELISA'nın özgüllüğü %66,6, duyarlılığı %57,1 olarak bulunmuştur. Yanlış negatiflik oranı %42,8, yanlış pozitiflik oranı ise %33,3 olarak tespit edilmiştir.

Testlerin sonuçları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemliliği ki kare testiyle incelenmiştir. Otopsi sonucu (7/10, %70) bulguları ile serolojik bulgular (4/10, %40) arasında yapılan ki kare testine göre iki sonucun karşılaştırılmasında istatiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p>0,178$).

Bu çalışmada kontrol grubu ve deneme grubundaki hayvanların serumları anti-*E. granulosus* antikorlarının varlığı yönünden skoleks antijeni kullanılarak IFA testi ile de incelenmiştir. Tüm incelemeler sonunda spesifik bir reaksiyon tespit edilememiştir. Enfekte olmayan hayvanların serumlarında da nonspesifik reaksiyonların varlığı, her iki grup arasında fark olup olmadığını tespit etme konusunda büyük bir engel teşkil etmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada skoleks antijenleri kullanılarak yapılan IFA testinden performans alınamamıştır.

Çalışmada 12 ay sonunda gelişen hidatik kistlerden bir tanesinin germinal membranı ve protoskoleksleri ayrılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'nın mitokondrial 12S rRNA geninin 254 baz çiftlik (bç) bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. Yapılan PZR analizi sonucu enfeksiyon kaynağının *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3 kompleks) suşu olduğu tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Hidatidoz insan ve hayvan sağlığının yanı sıra, sebep olduğu ekonomik kayıplar sebebiyle de dünyanın birçok bölgesinde ve ülkemizde önemini koruyan zoonoz bir hastalıktır. Hastalığın arakonak hayvanlarda hassas ve spesifik serolojik testlerle tanısı kontrol çalışmalarına büyük katkılar sağlamaktadır. 1970'lerde ve 1980'lerin başında arakonaklardaki hidatidozun tanısında güvenilir ve doğru immünolojik testlerin geliştirilmesi amacıyla uluslararası düzeyde önemli çabalar gösterilmiş fakat son yıllarda bu alanda sınırlı sayıda çalışma yürütülmüştür (Lightowlers ve Gottstein 1995).

İnsanlarla karşılaştırıldığında arakonak hayvanlardaki hidatidozun immünolojik tanısı amacıyla yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Komplement fiksasyon testi, aglütinasyon testleri, double gel diffusion, immünoelectrophoresis ve ELISA testleri koyunlardaki hidatidozun serolojik teşhisindeki çalışmalarda kullanılmıştır (Sweatman ve ark 1963, Blundell-Hasell 1969, Conder ve ark 1980). Kullanılan bu testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları ham ve purifiye *E. granulosus* antjenleri kullanılarak tespit edilmiştir. Ancak hiçbir testin güvenilebilir ayrımı yapılamamıştır. Bunun yanı sıra canlı hidatik kist taşıyan bazı hayvanlar serolojik testlere yanıt vermediğinden enfekte koyunlardaki *E. granulosus* antikorunun tespiti problem oluşturmuştur (Sweatman ve ark 1963, Conder ve ark 1980).

Hidatidozun tanısında kullanılan ELISA yöntemi kesin kantitatif ölçmeyi sağlaması, çok az miktarda serumun yeterli olması, kısa zamanda çok sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlaması, duyarlı, özgül ve ekonomik bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmektedir (Altaş 1981). Hidatidozun immündiagnozu amacıyla yapılan çalışmalarda çeşitli antijenlerin kullanıldığı ELISA testinin sürü bazında enfeksiyonun tanısında kullanılabileceği ancak bireysel olarak hayvan bazında tanıda güvenilir olmadığı belirtilmektedir (Lightowlers ve ark 1984, Yong ve ark 1984, Kittelberger ve ark 2002). İnvitro kültivasyon sonucu protoskolekslerden ve hidatik kist membranından elde edilen polisakkarit antijenleri kullanarak ELISA yöntemini uygulayan Ris ve ark (1987) testin özgüllüğünü %81,8, duyarlılığını %80,6 olarak belirlemişlerdir. Kittelberger ve ark (2002), hidatik kist sıvısından purifiye edilen 8 kDa antijeni (8 kDa ELISA), rekombinant EG95

onkosfer proteini (onc ELISA) uygulamışlar ve bu antijenlerin koyun hidatidozunun tanısındaki yerini araştırmışlar ve Prot ELISA'nın özgüllüğünü %95,8-99,5, duyarlılığını ise %51,4-62,7 arasında tespit etmişlerdir. Ibrahem ve ark (2002), koyun ham kist sıvısı antjeni, kısmi purifiye kist sıvısı antijeni (AgB) ve rekombinant AgB'yi kullanarak uyguladıkları ELISA testinde ham kist sıvısı antijeninin duyarlılığını %32, özgüllüğünü %90; kısmi purifiye kist sıvısı antjeninin duyarlılığını %88, özgüllüğünü %95 olarak belirlemişlerdir. Rekombinant AgB için ise bu oranları sırasıyla %28 ve %95 olarak bildirmişlerdir. Türkiye'de ELISA'yı koyun ham kist sıvısı antijenini kullanarak uygulayan Şimşek ve Köroğlu (2004), testin duyarlılığını %60, özgüllüğünü %94 olarak belirlemişlerdir. Gatti ve ark (2007) total kist sıvısı, purifiye kist sıvısı ve purifiye lipoprotein antijenlerini kullanarak koyunlarda uyguladıkları EIA testinde en yüksek duyarlılığı total kist sıvısı antijeninden (%77,8-89,2) ve en yüksek özgüllüğü purifiye kist sıvısı (%93,9-99,4) antijeninden elde etmişlerdir. Nijeruh ve Gathuma (1987) sığır hidatik kist sıvısından saflaştırdıkları antijen 880'i (ısıya dayanıklı antijen B bakımından zenginleştirilmiş) kullandıkları ELISA yöntemi ile doğal enfekte koyun ve keçilerde %91 duyarlılık tespit etmişlerdir. Deve hidatik kist sıvısından hazırladıkları purifiye AgB'yi ELISA'da kullanarak koyun serumlarını inceleyen Ibrahem ve ark (1996) benzer sonuçlar (%90 duyarlılık) elde etmişlerdir. Khan ve ark (1990) sığır, manda ve develerde uyguladıkları ELISA ile duyarlılığı sırasıyla %42,9, %60, %62,5 ve özgüllüğü %80, %60 ve %0 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, koyun hidatidozunun serolojik tanısında kısmi purifiye kist sıvısı antijeni (AgB) kullanılmış ve ELISA testinin duyarlılığı %57,1, özgüllüğü ise %66,6 olarak tespit edilmiştir. ELISA'nın duyarlılığı açısından bu çalışmada elde edilen oran Kittelberger ve ark (2002)'nın bildirdiği oranla hemen hemen aynı iken, Ibrahem ve ark (2002)'nın bildirdiklerinden düşük, Şimşek ve Köroğlu (2004)'nun bildirdikleri orana yakın bulunmuştur. Yapılan literatür taramalarında daha duyarlı ve özgül yanıtlar vermesi nedeniyle ham kist sıvısı antijeni yerine AgB kullanılmıştır.

Yong ve ark (1984) koyun hidatik kist sıvısından hazırladıkları antijenleri kullandıkları ELISA testini deneysel enfekte koyunlarda uygulamışlar ve %32 duyarlılık, %65 özgüllük elde etmişlerdir. ELISA'da kullandıkları bu antijenlerin deneysel ve doğal enfekte koyunların spesifik teşhisinde uygun olmadığını bildirmişlerdir. Testin duyarlılığı ve etkinliği bakımından kullanılan antijenin parazitin çeşitli gelişim evrelerinde hayvanlar tarafından üretilen bütün antikorlara

karşı antijenik determinantları içermesi gerektiğini bildirmektedirler. Ris ve ark (1987) iki farklı antijen kullandıkları ELISA ile deneysel enfekte koyunlarda %80 duyarlılık ve özgüllük elde etmişlerdir. Yong ve ark (1984)'nın bulduğu duyarlılık oranı bu çalışmadaki orandan düşük, özgüllük oranı ise hemen hemen aynı iken, Ris ve ark (1987)'nın bulduğu duyarlılık ve özgüllük oranının bu çalışmadaki orandan yüksek olduğu görülmektedir.

Force ve ark (1992) insan serumlarında ELISA ile yaptıkları çalışmada duyarlılığın %94, özgüllüğün %99 olduğunu açıklarken, Kanwar ve ark (1992) duyarlılığın %100, özgüllüğün ise %76 olduğunu bildirmişlerdir. Sbihi ve ark (1996) %96,5 duyarlılık, Iacona ve ark (1980) %63,7 duyarlılık, Baldelli ve ark (1988) %80 duyarlılık saptamışlardır. Ülkemizde yapılan az sayıdaki çalışmada Yazar ve Altıntaş (2003), ELISA'nın duyarlılığını %96,7, özgüllüğünü %92,6 olarak bildirmiş ve ELISA'nın en duyarlı yöntem olduğunu ifade etmişlerdir. Tüter ve ark (1994) %70 duyarlılık , % 100 özgüllük, Akısu ve ark (2005) %87,1 duyarlılık, %89,2 özgüllük saptamışlardır. İnsanlarda yapılan çalışmalardaki belirtilen duyarlılık ve özgüllük oranlarıyla bu çalışmadaki oranlar kıyaslanacak olursa elde edilen ELISA duyarlılık oranı Iacona ve ark (1980)'ninkine yakın ancak diğerlerinin elde ettiği duyarlılık oranlarından düşüktür. Bu durum Lightowlers (1990)'ın bildirdiği gibi, koyunlarda oluşan hidatik kistlere karşı immün cevabın yetersiz kalışına bağlanabilir. Testin duyarlılık ve özgüllüğündeki bu farklılıkların kullanılan antijenin kaynağına, kistlerin yerleşim yeri ve niteliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

İnsanlardaki hidatidoz enfeksiyonlarında serolojik teşhis oldukça etkili olmasına rağmen arakonak hayvanlarda benzer teknikler kullanılarak daha az başarı elde edilmiştir. Bunun en önemli nedeni doğal enfekte hayvanlarda enfeksiyona karşı çok düşük düzeylerde antikor cevabın oluşmasıdır. Bundan dolayı enfekte koyunlarda yanlış negatif reaksiyonlarla sık olarak karşılaşılmaktadır (Lightowlers ve ark 1986). Kistin büyüklüğü, lokalizasyonu, yapısı, canlılığı ve immün sistem aktivitesine bağlı olarak antikor oluşumu gözlenmeyebilir. Bu nedenle de yüksek sensitivitesi olan testler (IgG-ELISA) kullanıldığında dahi antikorlar teşhis edilemeyebilir ve yanlış negatif sonuçlar şekillenebilir (Pawlowski ve ark 2001). İnsanlarda görülen vakaların önemli bir kısmında (%30) dolaşımdaki spesifik antikorlar bakımından seronegatiflik görülebilmekte ve bu duruma koyun enfeksiyonlarında da rastlanabilmektedir (Rogan ve Craig 1997). Ancak bu olayın arkasındaki mekanizmanın açık olmadığı bildirilmektedir. Craig (1986) dolaşımdaki

parazit antijenlerinin spesifik antikorları nötralize ettiğini ve hem dolaşımdaki antijenlerin hem de immün komplekslerin bazı seronegatif bireylerde tespit edilebileceğini öne sürmüştür. Düşük antikor yanıtı olan koyunlarda antijen tespitindeki başarısızlığa testin sensitivitesinin düşük olmasının veya dolaşımdaki antijen seviyesinin düşük düzeyde bulunmasının neden olabileceği bildirilmektedir (Judson ve ark 1985). Yapılan çalışmalarda koyunlarda hidatidozun tanısında kullanılan serolojik testlerde yanlış negatif reaksiyonların sık olarak şekillendiği bildirilmektedir (Blundell-Hasell 1969, Hamel ve Ris 1982, Lightowlers ve ark 1984, Judson ve ark 1985). Ris ve ark (1987), ELISA ile yaptıkları çalışmada deneysel enfekte 14 koyun serumunun ikisinde negatif reaksiyon (yanlış negatiflik), enfekte olmayan 40 koyun serumunun yedisinde negatif reaksiyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Şimşek ve Köroğlu (2004), yaptıkları çalışmada yeni gelişmekte olan kistlerden 8'inin ELISA ile yanlış negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da deneme grubundaki koyunlardan bir tanesinde karaciğerde farklı çaplarda iki adet kist oluşmasına rağmen serolojik olarak antikor yanıt şekillenmemiştir. Bu durumun kistlerin yeni gelişmekte olmasına veya dolaşımdaki düşük düzeydeki antikor seviyesine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan seroepidemiyolojik çalışmalar sonucunda Peru'nun dağlık bölgesinde yaşayanların %20'sinin seropozitif olduğu ancak sadece %3'ünde hidatik kist bulunduğu, yine benzer bir çalışmada Çin' de popülasyonun %26'sı seropozitif iken, sadece 43/100.000 kişide ameliyatla hidatik kistlerin uzaklaştırıldığı bildirilmektedir. Bu epidemiyolojik veriler *E. granulosus* enkefsiyonlarının çoğunun hastalık geliştirmediğini ve hidatik kistlerin gelişiminin sınırlandırılmasında immün sistemin çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Zhang ve ark 1994, Gavidia ve ark 2008). Lightowlers ve ark (1984) sestod taşımayan hayvanlarda bile koyun hidatik kist sıvısındaki komponentlerin nonspesifik olarak koyun immünglobulinlerine bağlanarak yanlış pozitif reaksiyonlara neden olabileceğini bildirmektedirler. Yong ve ark (1984) düşük dozda (on adet) *E. granulosus* yumurtasıyla enfekte ettikleri üç koyunda antikor cevabın şekillendiğini gözlemlemişler ancak nekropside hidatik kist saptamamışlardır. İnokülasyondan 10-14 gün sonraki serolojik dönüşümle enfeksiyonun son dönemindeki hayvanların serolojik testlerde pozitif olarak ve nekropside negatif olarak sınıflandırılabileceğini doğrulamışlardır. Bu çalışmada deneme grubundaki koyunlardan bir tanesi nekropsi sonucunda karaciğer ve akciğerde kistik oluşum gözlenmemesine rağmen serolojide pozif bulunmuştur.

Lightowlers (1990) kist sayısı ile antikor titreleri arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulunmadığını bildirirken, Blundell-Hasell (1969) yaptıkları deneysel çalışmada kist sayısıyla birlikte titrelerde de bir artış olduğunu fakat kist sayısıyla titreler arasında kesin bir korelasyon olmadığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde Yong ve ark (1984) 12 ay sonunda hayvanlarda bulunan total kist sayısıyla oluşan antikor cevabın istatistiksel olarak ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Şenlik (2000) kist sayısı ile antikor titreleri arasında tam olmamakla birlikte kuvvetli bir korelasyon saptamış ve kist sayısının artışına bağlı olarak IFAT ve IHAT titrelerinin artış gösterdiğini tespit etmiştir. Liu ve ark (1992) farelerde oluşturdukları sekonder hidatidozda kist sayısı daha fazla olan farenin daha yüksek antikor üretme eğiliminde olabileceğini ancak kistin gelişme derecesinin de önemli olduğunu, toplam 20 adet kist bulunan bir farede düşük antikor cevap oluştuğunu, kistlerin çapının 1 cm'den az olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada kist sayısı ile antikor cevap arasında korelasyon tespit edilmemiştir (0,358, p<0,310).

Hidatidoz tanısında kullanılan antijenin cinsinin, hazırlanma şeklinin, testlerdeki değişik pozitiflik kriterlerinin, kistin canlılığı ve lokalizasyonunun, parazitin suşunun serolojik testlerin özgüllüğünü ve duyarlılığını değiştirdiği bilinmektedir (Sbihi ve ark 1996). Siracusano ve ark (1991), özgüllükde görülen farklılıkların antijen hazırlama şekli ve populasyonlardaki çevresel faktörlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Hidatidoz tanısında en çok kullanılan antijen kaynağı kist sıvısıdır. Yapılan bir çalışmada protoskoleksler, kist membranları ve kist sıvısı serolojik testler için antijenik özellikleri bakımından denenmiş ve kist sıvısının en uygun antijenik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Kagan ve Norman 1961). Kist sıvısının konak antijenlerini içermesi ve antijenlerin bir kısmının bazı helmintlerde de bulunmasından dolayı ham kist sıvısının kullanıldığı serolojik testlerde spesifikliğin düştüğü ve bunu önlemek için de antijenin saflaştırıldıktan sonra kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Shepherd ve McManus 1987). Şimşek ve ark (2006), koyun ham kist sıvısı antijeni ile kısmi purifiye kist sıvısı antijenini kullanarak yaptıkları çalışmada her iki antijenin koyun hidatidozunun tanısındaki etkinliğini araştırmışlar ve koyunlarda hidatidozun seroprevalansının belirlenmesinde ham kist sıvısı antijeni yerine, hazırlaması oldukça basit olan ve AgB'den zengin kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin kullanılmasını önermişlerdir. Bu çalışmada

ELISA testi için, fertil hidatik kist ile enfekte bir koyunun karaciğerinden elde edilen kist sıvısından hazırlanan kısmi purifiye kist sıvısı antijeni kullanılmıştır.

Lightowlers ve ark (1984), 2000 *E. granulosus* yumurtasını ağız yoluyla vererek enfekte ettikleri iki aylık kuzularda, hidatik kist sıvısından hazırladıkları antijenleri kullandıkları ELISA ile ilk altı ay boyunca yavaş reaksiyon meydana geldiğini ve nihayet enfeksiyondan dört yıl sonra yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Lightowlers ve ark (1986), yaptıkları deneysel çalışmada koyunların doğal enfeksiyona karşı spesifik immün cevaplar oluşturduğunu, fakat bu cevapların sürekli bir antikor oluşumunu sağlamadığını, parazitin varlığını devam ettirmesine rağmen antikor seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir. Ghorbanpoor ve ark (2006) 2000 *E. granulosus* yumurtasıyla oral olarak enfeksiyon oluşturdukları 13 koyunda uyguladıkları IHA testinde enfeksiyondan sekiz hafta sonra antikor yanıtın ortaya çıktığını, testin duyarlılığının 11-12. haftada maksimum seviyeye (%92) ulaştığını ve daha sonra azalmaya başladığını bildirmişlerdir. Ris ve ark (1987) en az 100 *E. granulosus* yumurtasıyla enfeksiyon oluşturdukları koyunlarda ELISA ile enfeksiyondan 27 hafta sonra antikor yanıtın yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Yong ve ark (1984) ise en erken antikor cevabı enfeksiyondan sonraki iki hafta içinde tespit etmişler ve 12 ay sonunda farklı antijenlerle tespit edilen antikor cevabın farklı zamanlarda pik yaptığını bildirmişlerdir. Larrieu ve ark (2009) koyunları üç farklı dozda *E. granulosus* yumurtası ile enfekte etmiş ve üç faklı çeşit antijenin kullanıldığı ELISA yöntemi ile 500 gün boyunca immün cevabı değerlendirmişler, en erken immün cevabı 10. günde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da en erken antikor cevap inokülasyondan sonraki ikinci hafta içinde tespit edilmiştir. ELISA ile tespit edilen antikor yanıt Yong ve ark (1984) ile Larrieu ve ark (2009)'nın bildirdiğine yakın bulunmuştur.

Echinococcus enfeksiyonunun metasestod evresinde insanların yanısıra deneysel fare modelinde immün yanıt ile ilgili yapılan çalışmalar şunları göstermektedir:

1. Th1 tip sitokin salınımının neden olduğu hücresel immünite, gelişimin başlangıç evrelerindeki metasestodları başarılı bir şekilde öldürebilmektedir.
2. Onkosfer veya metasestodun antijenik proteinleri ve karbonhidratları (ve belki de non-antijenik ve mitojenik komponentleri) antijen sunumu ve hücre aktivasyonu ile konak lenfositleri ve diğer immün hücrelerin sitokinlerini (IL-10) ve

hücresel immün yanıtın efektör fazını inhibe edebilme özelliğine sahip olan diğer medyatörleri üretebilmeleri için müdahale edebilmektedirler.

3. Konağın immünogenetik özellikleri parazit kaynaklı immün cevaptaki sapma için gereklidir (Vuitton 2003).

E. granulosus protoskolekslerinin intraperitonal inokülasyonu ile farelerde oluşturulan sekonder hidatidoz konak-parazit arasındaki immünolojik çalışmalar için faydalı bir model oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada farelere 2000 adet protoskoleks intraperitonal yolla verilerek 68 hafta boyunca immün cevap takip edilmiştir. Farelerdeki antikor yanıt, titrelerin yanı sıra oluştukları zaman bakımından da iki farklı pik göstermiş ve enfeksiyon süresince inişli çıkışlı bir antikor yanıt oluştuğu gözlenmiştir (Ferragut ve Nieto 1996). Yine benzer bir çalışmada farelerde üç hafta sonra önemli bir antikor cevabın oluştuğu gözlenmiş, 38. haftaya kadar antikor seviyesinde sabit bir artış olduğu ve 58. haftaya kadar yüksek seviyelerde kaldığı ve enfeksiyonun sonuna doğru azalmaya başladığı bildirilmiştir (Severi ve ark 1997). Liu ve ark (1992) protoskoleks antijen (Px), Antijen 5 (Ag5) ve Antijen B (AgB)'yi kullanarak üç farklı antijen ile ELISA yöntemini kullandıkları farelerde oluşturdukları sekonder hidatidozu 64 haftaya kadar takip etmişlerdir. Enfeksiyondan sonraki üç gün içinde Anti-Px IgG antikorları tespit edilmiş, yaklaşık dört hafta titrelerdeki kısa düşüşün ardından antikorlarda sabit bir artış gözlenmiş ve 8-16 hafta arasında pik seviyeye ulaşmış ve daha sonra yüksek seviyelerde devam ettiği saptanmıştır. Bu çalışmada da 12 ay boyunca koyunlarda inişli çıkışlı bir antikor yanıt oluştuğu gözlenmiştir (Grafik 3.2). Parazitin çeşitli gelişme fazları süresince meydana gelen salgı, boşaltım ve somatik antijenlerin miktar ve niteliklerindeki değişikliklerin farklı antikor cevaba neden olabileceği düşünülmektedir.

Karaciğer kistlerinin genel görünümü özellikle insan enfeksiyonlarında önemli değişiklikler gösterebildiğinden, 121 kistik ekinokokkozis vakası ultrason görüntüleri temel alınarak kistin yapısına ve morfolojik özelliklerine göre 5 farklı tipte sınıflandırılmıştır (Gharbi ve ark 1981). Tip I, sınırları belirgin ve içi kist sıvısı ile dolu univesiküler kistleri, Tip II kız kistleri olmayan ancak gözle görülebilir laminar tabakayla çevrili tipik unilocüler kistleri, Tip III kız kistleri olan ve laminar tabakayla çevrili kistleri, Tip IV solid (yoğun) kistik oluşumları, TipV ise kalsifikasyon gösteren kistleri oluşturmaktadır. Bu morfolojik sınıflandırmaya göre Tip I ve II gözle görülebilen uniloküler kistleri, Tip III ve IV dejenere olmuş primer

kistleri ve onunla ilgili kız kistleri, Tip V ise ölü kistleri oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada bu morfolojik tiplendirmelere göre Tip I'den Tip IV'e kadar seropozitifliğin artığı, Tip V'de ise aniden düştüğü görülmüştür (Craig ve ark 1996). Beyin, kemik ve göz de yerleşen kistler ile kalsifiye kistlerin çok düşük düzeyde antikor yanıta neden olduğu hatta hiç antikor oluşturmayabildiği bildirilmektedir (Amman ve Eckert 1996). Bu çalışmada da kalsifikasyon şekillenen kistlerde antikor yanıt oluşmadığı gözlenmiştir.

Nekropsinin en iyi teşhis yöntemi olduğu ve aynı zamanda serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenebilmesinde referans test olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Eckert ve ark 2001). Yapılan bir çalışmada mezbahada %37,2 oranında hidatidoz tanısı konulan koyunlarda histopatolojik çalışmalarla hidatidoz olmadığı, diğer taraftan sağlıklı görünenlerin %1,1'de hidatidoz olduğu tespit edilmiştir (Larrieu ve ark 2001). Larrieu ve ark (2001)'nın yaptığı bu çalışmada mezbahada konulan teşhis ile histopatolojik doğrulama arasında istatiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmemiştir. Bu çalışmada nekropsi sonucu elde edilen bulgular ile serolojik bulgular arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmamıştır ($p>0,178$).

Koyunlarda hidatidozun yaygınlığına yönelik yapılan çalışmalarda uygulanan IFAT ile Casado-Escribano ve ark (1984) 41 adet koyun serumu ile testin sensitivitesini %71,4, spesifitesini %95; yanlış negatiflik oranını %25 ve yanlış pozitiflik oranını da %5 olarak tespit etmişlerdir. Sekar ve ark (1989) ise testin sensitivitesini %89,5, spesifitesini %73,3 olarak bildirmişlerdir. Doğanay ve ark (2003) protoskoleks kesit antijenini kullandıkları IFA testi ile koyunlarda duyarlılık ve özgüllüğü %90 olarak tespit etmişlerdir. Şenlik (2000), hidatidozun teşhisi amacıyla 300 koyun serumuna uyguladıkları IFA testinin duyarlılığını %78,95, özgüllüğünü %92,57 olarak bildirmiştir. Bu çalışmada deneme ve kontrol grubu hayvanlarının, protoskoleks antijeni kullanılarak yapılan IFA testlerinde, nonspesifik reaksiyonlardan dolayı IFA sonuçları hakkında net veriler elde edilememiştir. Bu nedenle IFA testinin koyun hidatidozunda kullanışlı hale getirilebilmesi için ilave çalışmaların yapılması gerekmektedir.

E. granulosus'un farklı suşlarının farklı titrelerde antikor cevap oluşturabileceği, bu nedenle farklı bölgelerdeki koyunların serolojik yanıtının farklı olabileceği bildirilmektedir (Lightowlers ve ark 1984). Yapılan çalışmalar sonucunda; Türkiye'de ve dünyada yaygın olan suşun *E. granulosus sensu stricto*

(G1-G3 kompleks) olduğu, bu suşun koyunlar dışında keçi, sığır, manda, yak, deve, domuz ve tek tırnaklılar gibi birçok hayvan grubunda enfeksiyona neden olduğu ortaya çıkmış ve bu suşun insan enfeksiyonlarının başlıca sebebi olduğu belirtilmiştir (Thompson ve Lymbery 1988, Thompson ve McManus 2002, Ütük ve ark 2006, Ütuk ve ark 2008). Bu çalışmada da yapılan PZR analizi sonucu enfeksiyon kaynağının *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3 kompleks) suşu olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kontrol ve deneme grubundaki koyunların serumları anti-*E. granulosus* antikorlarının varlığı yönünden ELISA ve IFA testi ile incelenmiştir. Koyunlarda hidatidoz enfeksiyonlarının erken teşhisinde ELISA testi nekropsi bulguları ile kıyaslandığında %57 duyarlılık ve %67 özgüllük gösterirken, IFA testinden güvenilir bir sonuç elde edilememiştir. ELISA testinde kısmi purifiye kist sıvısı antijeni kullanılarak koyunlar 12 ay boyunca spesifik antikorlar yönünden teste tabi tutulmuş ve antikor yanıtın farklı zamanlarda pik yaptığı gözlenmiştir. En erken antikor cevap inokülasyondan iki hafta sonra tespit edilmiştir. Kalsifikasyon şekillenen kistlerde ise antikor yanıt belirlenememiştir. Protoskoleks antijeninin kullanıldığı IFA testi ile spesifik bir reaksiyon tespit edilememiştir. Nekropsi sonuçları altın standart olarak ele alınmış, ELISA testinin duyarlılık ve özgüllüğünü belirlemede referans test olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen veriler deneysel enfekte koyunlarda kistik hidatidozun erken teşhisi amacıyla uygulama kolaylığı ve ekonomik olması sebebiyle ELISA testinin kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak testin duyarlılık ve spesifitesinin artırılması için yeni immünodominant antijenlerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun erken dönemlerinde hastalığa spesifik olarak enfeksiyonu tespit edebilecek alternatif teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu araştırmada 12 aylık deneme süresi sonunda şekillenen kistlerin küçük çapta olması nedeniyle, bu alanda daha verimli sonuçların elde edilebilmesi için deneme süresi uzatılarak yeni çalışma protokollerinin uygulanması faydalı olacaktır. Deneysel enfekte edilen koyunların bağışıklık sistemleri baskılanarak daha fazla sayıda kist ve antikor yanıt oluşması sağlanabilir.

IFA testi günümüze kadar prevalans çalışmalarında yaygın olarak kullanılmış ve duyarlılık ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, deneysel enfeksiyonların takibinde bu testin elverişli olup olmadığı yönünde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışmada IFA testi ile verimli bir sonucun elde edilememesi, kullanılan antijenden kaynaklamış olabileceği gibi yeterli düzeyde antikor yanıt oluşmamasına da bağlı olabilir. Bu nedenle IFA testinde testin

duyarlılığını ve özgüllüğünü artırmak amacıyla antijenik özelliği güçlü olan parazite ait yapıların incelenmesi ve diğer antijenik yapıların denenmesi gerekmektedir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneysel Enfekte Koyunlarda Kistik Hidatidozun

ELISA ve IFAT ile Teşhisi

Nermin IŞIK

Parazitoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2012

Kistik hidatidoz, *Echinococcus granulosus*'un metasestod formunun neden olduğu ve önemli ekonomik kayıplar ile sağlık sorunlarına neden olan zoonotik bir enfeksiyondur. Kistik hidatidozda klinik bulgulara dayanarak tanı koymak çok zordur. Bu nedenle tanıda spesifik antikor yanıtının belirlenmesini amaçlayan serolojik yöntemler kullanılmaktadır.

Bu araştırma deneysel enfekte koyunlarda kistik hidatidozun serolojik teşhisinde ELISA ve IFA testlerinin duyarlılıklarını belirlemek ve hastalığın erken teşhisinin mümkün olup olmadığını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 10 deneme 10 kontrol olmak üzere 20 kuzu (4-5 aylık) kullanıldı. Kistli karaciğerden elde edilen 15.000 canlı protoskoleks ağız yoluyla köpeğe verildi ve iki ay sonunda gelişen *E. granulosus*'lar bağırsak lümeninden toplandı. Elde edilen yumurtalardan deneme grubundaki her bir koyuna yaklaşık 2000 adet oral yolla verildi. Koyunlar 12 ay boyunca takip edildi. Bu süreçte koyunlar parazite spesifik antikorlar yönünden her iki test ile muayene edildi. Kısmi purifiye kist sıvısı antijeninin kullanıldığı ELISA testi nekropsi bulguları ile kıyaslandığında %57 duyarlılık ve %67 özgüllük gösterdi. 12 ay boyunca koyunlarda gelişen antikor yanıtın farklı zamanlarda pik yaptığı gözlendi. En erken antikor cevap inokülasyondan iki hafta sonra tespit edildi. Kalsifikasyon şekillenen kistlerde antikor yanıt oluşmadığı gözlendi. Bu çalışmada protoskoleks antijeninin kullanıldığı IFA testi ile spesifik bir reaksiyon elde edilemedi.

Sonuç olarak deneysel enfekte koyunlarda hidatidoz enfeksiyonlarının erken teşhisinde IFA testine göre ELISA'dan daha güvenilir sonuçlar elde edildi. Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenebilmesinde nekropsi sonuçlarının referans test olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı. 12 aylık deneme süresi sonunda şekillenen kistlerin küçük çapta olması nedeniyle deneme süresinin uzatılabileceği ve IFA testinde testin duyarlılığı ve özgüllüğünü artırmak amacıyla antijenik özelliği güçlü olan parazite ait yapıların incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: ELISA; IFA testi; kistik hidatidoz; koyun

7. SUMMARY

Diagnosis of cystic hydatidosis in experimentally infected sheep by ELISA and IFAT

Cystic hydatidosis, a zoonotic infection, is caused by metacestod formation of the *Echinococcus granulosus*, and it causes major economical loses and health disorders. Clinical diagnosis of cystic hydatidosis is very difficult since clinical signs is not quite. Therefore serologic methods which determine responses to specific antibodies are in use for diagnosis.

This study was carried out to determine the sensitivities of ELISA and an IFA test in order to serologic diagnosis of cystic hydatidosis in experimentally infected sheep. The serology was used to determine if an early diagnosis is possible. A total of 20 sheep (4-5 months) were subjected in this study as 10 for control and another 10 for experimental group. A total of 15.000 live protoscolex collected from liver with hydatic cyst were administered into a dog via oral route, and at the end of two months, maturated *E. granulosus* was collected from intestinal lumen. Approximately 2000 eggs were administered into each sheep in the experiment group. Sheep had been observed for 12 months. During this period, all the sheep were checked by using both tests for parasite specific antibodies. ELISA test used with partially purified cyst fluid antigen had shown 57% sensitivity and 67% specifity when compared to necropsy. Antibody responses in sheep during 12 months were shown different peaks in different times. The foremost antibody response was determined in two weeks after inoculation. No antibody response was determined in calcified cysts. In this study, no specific responses in IFA test in which protoscolex antigen was used.

In conclusion, more reliable results were observed in ELISA test in sheep with experimental infection for the diagnosis of cystic hydatidosis compared to IFA test. Necropsy findings can be used as reference for determination of sensitivity and specifity of serology. The study period could be extended due to the small cysts that have been observed at the end of 12 months and in order to increasing of sensitivity and specifity of IFA it should be examined the high antigenic structures belongs to the parasite.

Keywords: ELISA, IFA test, cystic hydatidosis, sheep

8.KAYNAKLAR

1. Ak M. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), In: Özcel MA, Altıntaş N, editors. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını no 15, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1997. p. 241-59.
2. Akısu Ç, Delibaş SB, Yuncu G, Aksoy Ü, Özkoç S, Biçmen C, Sevinç S,Yaldız S. Akciğer hidatidozunun tanısında IHA, ELISA ve Western Blot testlerinin değerlendirilmesi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi. 2005; 53: 156-60.
3. Akyol ÇV. Echinococcus Türlerinin Epidemiyolojisi, In: N Altıntaş, R Tınar, A Çoker editors. Echinococcosis. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004. p. 259-83.
4. Altaş K. İnsan Hidatidozunun tanımında ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)'nın değeri. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji, Doçentlik Tezi, 1981.
5. Altıntaş N, Yazar S. *Cystic Echinococcosis'de tanı*. T Parazitol Derg. 1999; 23: 160-8.
6. Altıntaş N, Yolasığmaz A. Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE, In, Özcel MA ve Altıntaş N editors, Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını no 15, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1997. p. 321-41.
7. Altıntaş N. Echinococcus sp. ve kist hidatiğin immunolojisi. 'İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. T Parazitol Dern Yay. No:10, p. 89-95, 1991, İzmir.
8. Amman RW, Eckert J. Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. In: Thompson RCA, Lymbery AL editors. Echinococcus and hydatid disease. Wallingford, Oxon, CAB International, 1995. p. 411-63.
9. Ammann RW, Eckert J. Cestodes: Echinococcus. Gastroenterol. Clin North Am. 1996; 25: 655–89.
10. Ayaz E, Tınar R. Cestoda In: Tınar R editors. Helmintoloji. Ankara, Nobel Yayın no 965, 2006. p.103-213.
11. Aykol F. Tabii enfekte koyunlarda kist hidatiğin counter immünoelektropheresis ve çift difüzyon testlerle karşılaştırmalı teşhisi. Doğa Türk Vet Hay Derg. 1987; 11: 201-08.
12. Baldelli F, Papili R, Francisci D, Tassi C, Stagni G, Pauluzzi S. Postoperative surveillance of human hydatidosis: evaluation of immünodiagnostic tests. Pathology. 1992; 24: 75-9.
13. Baldelli F, Tassi C, Papili R, Pauluzzi S. The behaviour of specific antibody classes in human hydatid disease. Pathology. 1988; 20: 119-23.
14. Balkaya İ, Şimşek S. Erzurum'da Kesilen Sığırlarda Hidatidosis ve Fasciolosis'in Yaygınlığı ve Ekonomik Önemi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010; 16: 793-7.
15. Blundell-Hasell SK. Serological diagnosis of larval cestodes in sheep. Australian Veterinary Journal. 1969; 45: 334-6.
16. Budak S. Kist Hidatik'in Epidemiyolojisi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. T Parazitol Dern Yay. No:10, p. 55-64, 1991a, İzmir.
17. Budak S. Kist Hidatik'te Korunma. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. T Parazitol Dern Yayını. No:10, p:125-28, 1991b, İzmir.
18. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socio economic impact of cystic echinococcosis. Emerg Inf Dis. 2006; 12: 296–303.
19. Burgu A, Doğanay A, Gönenç B, Sarımehmetoğlu HO, Kalınbacak F. Analysis of fluids of Hydatid Cysts from sheep by SDS-PAGE, and determination of specific antigens in protein structure by western blotting. Turk J Vet Anim Sci. 2000; 24: 493-500.
20. Capron A, Yarzabal LA, Vernes A, Fruit J. Le diagnostic immünologique de I'echinococcose humaine. Pathologie Biologie. 1970; 18: 357-65.
21. Casado–Escribano N, Cuesta-Bandera C, Martinez-Fernandez AR. IFAT for diagnosis of natural hydatidosis and following of experimental secondary hydatidosis. Rev İberica Parasitol. 1984; 44: 429-43.
22. Chordi A, Kagan IG. Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immünoelectrophoresis. J Parasitol. 1965; 51: 63-71.
23. Conder GA, Andersen FL, Schantz PM. İmmünodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: an evaluation of double diffusion, immünoelectrophoresis, indirect haemaglutination and intradermal tests, J Parasitol. 1980; 66: 577-84.

24. Craig PS, McManus DP, Lightowlers MW, Chabalgoity JA, Gracia HH, Gavidia CM, Gilman RH, Gonzalez AE, Lorca M, Naquira C, Nieto A, Schantz PM. Prevention and control of cystic echinococcosis. Lancet Infect Dis. 2007; 7: 385-94.
25. Craig PS, Rogan MT, Allan JC. Detection, Screening and Community Epidemiology of Taeniid Cestode Zoonoses: Cystic Ech inococcosis. Alveolar Echinococcosis and Neurocysticercosis. Adv Parasitol. 1996; 38: 169-250.
26. Craig PS. Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. Parasite Immunol. 1986; 8: 171–88.
27. Deplazes P, Eckert J. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis a zoonosis of public health significance. Vet Parasitol. 2001; 98: 65-87.
28. Deplazes P, Mathis A. Methods for direct diagnosis of Echinococcus multilocularis in definitive hosts. Arch Int Hidatid. 1999; 33: 6–10.
29. Dik B, Cantoray R, Handemir E. Konya Et ve Balık Kurumu Kombinası'nda kesilen küçük ve büyük baş hayvanlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. T Parazitol Derg. 1992; 16: 91-9.
30. Dik B, Sevinç F, Köse M. Koyunlarda kistik ekinokokkozun indirekt hemaglütinasyon (IHA) testi ile teşhisi, V. Ulusal Nükleer Tarım ve Hayvancılık Kongresi, p. 224-9, 20-22 Ekim 1998, Konya.
31. Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Walz M, Zeyhle E, Elhamdi IE, Mackenstdt U, Romig T. A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus–complex, with reference to the epidemiological situation in Eastern Africa. Int J for Parasitol. 2004; 34: 645-53.
32. Doğanay A, Burgu A, Tanyüksel M, Sarımehmetoğlu O, Gönenç B, Kozan E, Yıldırım A. İnsan ve koyunlarda hidatidozun indirekt floresan antikor tekniği ile teşhisi. 13. Ulusal parazitoloji kongresi. 8-12 Eylül 2003, Konya.
33. Doğanay A. Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. AÜ Vet Fak Derg. 1983; 30: 550-6.
34. Dottorini S, Tassi C. Echinococcus granulosus: Characterization of the main antigenic component (Arc 5) of hydatid fluid. Experimental Parasitology. 1977; 43: 307-14.
35. Dueger EL, Verastegui M, Gilman RH. Evaluation of the enzyme-linked immünoelectrotransfer blot (EITB) for ovine hydatidosis relative to age and cyst charactristics in naturally infected sheep. Vet Parasitol. 2003; 114: 285-93.
36. Düzlü Ö, Yıldırım A, Sarıözkan S, İnci A. Kayseri yöresinde üç farklı mezbahada kesilen koyun ve sığırlarda Kistik Echinococcosis'in ekonomik önemi. J Fac Vet Med Univ Erciyes. 2010; 7: 7-11.
37. Eckert J, Deplazes P, Craig PS, Gemmel M, Gottstein B, Heath DD, Jenkins J, Kamiya M, Lightowlers MH. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmel M, Meslin F, Pawlowski Z. editors, Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern, WHO/OIE, France, 2001, p: 195–203.
38. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev. 2004; 17: 107-35.
39. Eckert J, Gemmell MA, Matyas Z, Soulsby EJL. Guidelines for surveillence, prevention and control of Echinococcosis. 1984, WHO. VPH/81,28.
40. Efsa. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1496.htm, 12.06.2012.
41. El-On J. Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. Acta Tropica. 2003; 85: 243-52.
42. Esatgil UM, Tüzer E. Prevalence of hydatidosis in slaughtered animals in Thrace, Turkey. Türkiye Parazitol Derg. 2007; 31: 41-5.
43. Faraq H, Bout D, Capron A. Specific immünodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immünosorbent assay (ELISA). Biomedicine. 1975; 23: 276-8.
44. Ferragut G, Nieto A. Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation. Parasite Immunology. 1996; 18: 393-402.
45. Force L, Torres JM, Carrillo A, Busca J. Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. Clin Infect Dis. 1992; 15: 473-80.
46. Gatti A, Alvarez AR, Araya D, Mancini S, Herrero E, Santillan G, Larrieu E. Ovine echinococcosis. İmmünological diagnosis by enzyme immünoassay. Vet Parasitol. 2007; 143: 112–21.

47. Gavidia CM, Gonzalez AE, Zhang W, McManus DP, Lopera L, Ninaquispe B, Garcia HH, Rodriguez S, Verastegui M, Calderon C, Pan WKY, Gilman RH. Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 260–6.
48. Gemmel MA, Roberts MG. Modelling echinococcus life cycles. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. Echinococcosis and Hydatid Diseases. CAB International Oxon, 1995, p: 333-354.
49. Gemmell MA. Control of echinococcosis, in: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS, editors. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern, WHO/OIE, Paris; 2001, 195-229.
50. Gharbi HA, Hassine W, Brauner MW, Dupuch K. Ultrasound examination of the hydatic liver. Radiology. 1981; 139: 459-63.
51. Ghorbanpoor M, Razi Jalali MH, Hoghooghi Rad N, Nabavi L, Esmail Zadeh S, Rafiei A, Haji Hajikolaei MR. Detection of specific hydatid antigens and antibodies in serum and urine of experimentally infected sheep. Vet Parasitol. 2006; 142: 91–4.
52. Gıcık Y, Arslan ÖM, Kara M, Köse M. Kars ilinde kesilen sığır ve koyunlarda kistik ekinokokkozisin yaygınlığı. T Parazitol Derg. 2004; 28: 136-9.
53. Gönenç B, Doğanay A, Öge H. Echinococcosis'in patojenitesi ve kliniği. In: Altıntaş N, Tınar R, Çoker A, editors. Echinococcosis. Hidatidoloji derneği Yayın No1, İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası Bornova, 2004. p: 285-94.
54. Güralp N. Helmintoloji. 2. Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları no 368, Ders Kitabı, No 266, 1981.
55. Haller M, Deplazes P, Guscetti F, Sardinas JC, Reichler I, Eckert J. Surgical and chemotherapeutic treatment of alveolar echinococcosis in a dog. J Am Hosp Assoc. 1998; 34: 309-14.
56. Hamel KL, Ris DR. The use of cathodic antigen in the immünoelectrophoretic serodiagnosis of echinococcus granulosus in sheep. Vet Immunol Immunopathol. 1982; 3: 419-25.
57. Hariri MN, Schwabe CW, Koussa M. Host-parasite relationships in echinococcosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1965; 14: 592–604.
58. Heath DD, Jensen O, Lightowlers MW. Progress in control of hydatidosis using vaccination a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Trop. 2003; 85: 133-43.
59. Houin R. Current situation of echinococcosis in Europe. Symposium on Environmental Adaptation of Echinococcosis. 18–20 August 1998, Hakkaido University, Sapparo, Japan.
60. Hüttner M, Nakao M,Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A. Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. Int J Parasitol. 2008; 38: 861–8.
61. Iacona A, Pini C, Vicari G. Enzyme-linked immünosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of hydatid disease. Am J Trop Med Hyg. 1980; 29: 95-102.
62. Ibrahem MM, Craig PS, Mcvie A, Ersfeld K, Rogan MT. Echinococcus granulosus antigen B and seroreactivity in natural ovine hydatidosis. Research in Veterinary Science. 1996; 61: 102-6.
63. Ibrahem MM, Rafiei A, Dar FK, Azwai SM, Carter SD, Craig PS. Serodiagnosis of cystic echinococcosis in naturally infected camels. Parasitology. 2002; 125: 245-51.
64. Jenkins DJ, Gasser RB, Zeyhle E, Romig T, Macpherson CNL. Assessment of a serological test for the detection of Echinococcus granulosus infection in dogs in Kenya. Acta Trop. 1990; 47: 245-8.
65. Jimenez S, Perez A, Gil H, Schantz PM, Ramalle E, Juste RA. Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. Acta Trop. 2002; 83: 213–21.
66. Judson DG, Dixon JB, Clarkson MJ, Pritchard J. Ovine hydatidosis: some immünological characteristics of the seronegative host. Parasitology. 1985; 91: 349-57.
67. Kagan IG, Norman L. Antigenic analysis of Echinococcus antigens by agar diffusion techniques. Am J Trop Med Hyg. 1961; 10: 727-34.
68. Kagan IG, Osimani JJ, Varela JC, Allain DS. Evaluation of intradermal and serologic tests for the diagnosis of hydatid disease. Am J Trop Med Hyg. 1966; 15: 172-9.
69. Kagan IG. A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease. Bull W H O. 1968; 39: 25-37.

70. Kanwar JR, Kaushık SP, Sawhney IMS, Kamboj MS, Mehta SK, Vınayak VK. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immünoblotting. J Med Microbiol. 1992; 36: 46- 51.
71. KhanMQ, Afzal M, Ali S. Prevalence and serology of hydatidosis in large ruminants of Pakistan. Vet Parasitol. 1990; 37: 163-8.
72. Kittelberger R, Reichel MP, Jenner J, Health DD, Lightowlers MW, Moro P, Ibrahem MM, Craig PS, O'Keefe JS. Evaluation of three enzyme-linked immünosorbent assays (ELISAs) for the detection of serum antibodies in sheep infected with echinococcus granulosus. Vet Parasitol. 2002; 110: 57-76.
73. Kuru C, Baysal B. Uniloküler kistik ekinokokkozis'in tanısında indirekt hemaglütinasyon yönteminin değeri. T Parazitol Derg. 1999; 23: 251-4.
74. Larrıeu E, Alvarez Ar, Gattı A, Mancını S, Bıgattı R, Danıel Araya, Veronıca Vespolı, Juan Garcıa Vınet, Cacheau MG, Alvarez E, Cavagıon L. Fısıopatologıa y respuesta inmune de ovinos experımentalmente infectados con Echinococcus granulosus. Medicina (Buenos Aires) 2009; 69: 00-00.
75. Larrieu E, Cantoni G, Alvarez R, Cavagion L, Labanchi JL, Bigatti R, Araya D, Herrero E, Alvarez E, Mancini S, Cabrera P. Ovine Echinococcus granulosus transmission dynamics in the province of Rio Negro, Argentina, 1980-1999. Vet Parasitol. 2001; 98: 263–72.
76. Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauc CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Heath DD. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. Parasite İmmünol. 1996; 18: 457-62.
77. Lightowlers MW, Gottstein B. Antigens, İmmünological and moleculer diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. Echinococcosis and Hydatid Diseases. CAB International Oxon, 1995, p: 355-410.
78. Lightowlers MW, Jensen O, Fernandez E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, Jenkins DJ, Heath DD. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int J Parasitol. 1999; 29: 531-4.
79. Lightowlers MW, Rickard MD, Honey RD, Obendorf DL, Mitchell GF. Serological diagnosis of Echinococcus granulosus infection in sheep using cyst fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. Aust Vet J. 1984; 61: 101-8.
80. Lightowlers MW, Rickard MD, Honey RD. Serum antibody response following parenteral immünization with hydatid cyst fluid in sheep infected with Echinococcus Granulosus. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35: 818-23.
81. Lightowlers MW. Cestode infections in animals: immunological diagnosis and vaccination. Rev Sci Tech. 1990; 9: 463-87.
82. Liu D, Lightowlers MW, Rickard MD. Examination of murine antibody response to secondary hydatidosis using ELISA and immünoelectrophoresis. Parasite İmmünology. 1992; 14: 239-48.
83. Manger BR, Brewer MD. Epsiprantel, an new tapeworm remedy. Preliminary efficacy in dogs and cats. Br Vet J. 1989; 145: 384-8.
84. Matossian RM, Alami SY, Salti I, Araj GF. Serum immünoglobulin levels in human hydatidosis. Int J Parasit. 1976; 6: 367-71.
85. Matossian RM. The immünological diagnosis of human hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1977; 71: 101-4.
86. Merdivenci A, Aydınlıoğlu K. Hidatidoz (Hidatik kist hastalığı). İstanbul: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, No:97, 1982.
87. Merdivenci A. Türkiye'de hidatik kist hastalığı (Hydatidosis in Turkey). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, Rektörlük No:2145, Dekanlık No:36, 1976.
88. Mimioğlu M, Güralp N, Sayın F. Ankara köpeklerinde görülen parazit türleri ve bunların yayılış nisbeti. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1960; 6: 53-68.
89. Ming RJ. Application of enzyme-linked immünosorbent assay (ELISA) to the diagnosis of echinococcosis of sheep and cattle. Acta Vet Zootech Sinica. 1986; 17: 55-62.
90. Moossavi T, Motamedi GR, Akhavizadegan MA, Zariffard MR, Asadi N. Diagnosis of sheep hydatid cyst using ELISA test. Iranian Journal of Veterinary Research. 2004; 5:140-9.
91. Moris DL, Richards KS. Hydatid Disease. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd. 1992; p: 25-57.
92. Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, Arru E, Pozzuoli R. Echinococcus granulosus spesific quantification of the two most immünoreactive antigens in hydatid fluids. J Clin Pathol. 1978; 31: 475-78.

93. Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus Echinococcus inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology. 2007; 134: 713-22.
94. Nijeruh FM, Gathuma JM. Serodiagnosis of hydatidosis in livestock by the indirect haemagglutination test (IHA) and enzyme-linked immünosorbent assay (ELISA). Bull Anim Health Prod Afr. 1987; 35: 124-29.
95. Oriol R, Williams JF, Perez Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of E. granulosus from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg. 1971; 20: 569-74.
96. Öge H, Kalınbacak F, Gıcık Y, Yıldız K. Ankara yöresinde kesilen koyun, keçi ve sığırlarda bazı metasestodların (Hidatid kist, Cysticercus tenuicollis, Cysticercus bovis) yayılışı. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1998; 45: 123–30.
97. Öge S, Sarımehmetoğlu O, Gönenç B, Burgu A, Doğanay A, Öge H, Bölükbaş SC. Cestod enfeksiyonlarında bağışıklık II. bazı metacestod enfeksiyonları için bağışıklık yanıtının irdelenmesi, In: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E editors. Tıbbı ve veteriner immünoparazitoloji. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:21, 2007. p. 563-75.
98. Özcel MA, Üner A, Ertuğ S. İmmunofloresans Yöntemi In: Özcel MA, Altıntaş N, editors. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını no 15, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1997. p. 215-39.
99. Özcel MA. İmmunofluoresans ve parazitolojide uygulanması. İzmir: Ege Üniversitesi matbaası, 1978.
100. Pamukçu AM, Ertürk E. 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1961; 8: 323-46.
101. Pawlowski ZS, Eckert J, Vuitton DA, Ammann RW, Kern P, Craig PS, Dar KF, De Rosa F, Filice C, Gottstein B, Grimm F, Macpherson CNL, Sato N, Todorov T, Uchino J, von Sinner W, Wen H. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmel M, Meslin F, Pawlowski Z. Editors, Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a public health problem of global concern, WHO/OIE, France, 2001, p: 47-58.
102. Perry BD, Randolph TF. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. Vet Parasitol. 1999; 84: 145-68.
103. Picardo NG, Guisantes JA. Comparison of three immünological tests for seroepidemiological purposes in human echinococcosis. Parasite İmmünol. 1981; 3: 191-9.
104. Richards KS, Morris DL, Daniels D, Riley EM. Echinococcus granulosus: the effects of praziquantel, in vivo and in vitro, on the ultrastructure of equine strain murine cysts. Parasitology. 1988; 96: 323-36.
105. Rickard MD, Williams JF. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. Adv. Parasitol. 1982; 21: 229–96.
106. Ris DR, Hamel KL, Mackle ZM. Use of two polysaccharide antigens in ELISA for the detection of antibodies to Echinococcus granulosus in sheep sera. Res Vet Sci. 1987; 43: 257-63.
107. Rogan MT, Craig PS, Zehyle E, Masinde G, Wen H, Zhou P. In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera fromhydatid endemic areas. Acta Trop. 1992; 51: 291–296.
108. Rogan MT, Craig PS. Immunology of Echinococcus granulosus infections. Acta Tropica. 1997; 67: 7-17.
109. Rogan MT, Marshall I, Reid GD, Macpherson CN, Craig PS**.** The potential of vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) and baboons (*Papio anubis*) as models for the study of the immunology of *Echinococcus granulosus* infections. Parasitology. 1993; 106: 511–7.
110. Rojo-Vazquez FA, Pardo-Lledias J, Hunefeld MF, Cordero-Sanchez M, Alamo-Sanz R, Hernandez-Gonzalez A, Brunetti E, Siles-Lucas M. Cystic Echinococcosis in Spain: Current Situation and Relevance for Other Endemic Areas in Europe. Plos Negl Trop Dis. 2011; 5: 1-6.
111. Sarıözkan S, Yalçın C. Estimating the production losses due to cystic echinococcosis in ruminants in Turkey. Vet Parasitol. 2009; 163: 330–4.
112. Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 1996; 24: 205-11.
113. Sekar M, Rao VNA, Ramadass P, Raghavan N. Comparative study of serological diagnostic test in hydatidosis in sheep. Cherion. 1989; 18: 10-4.
114. Severi MaA, Ferragut G, Nieto A. Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: Protoscolex specific response during infection is associated with decreasing specific IgG1/IgG3 ratio as well as decreasing avidity. Parasite immünology. 1997; 19: 545-52.

115. Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. Mol Biochem Parasitol. 1987; 25; 143-54.
116. Siracusano A, Ioppolo S, Notargiacomo S,Ortona E, Rigano R, Teggi A, De Rosa F, Vicari G. Detection of antibodies against Echinococcus granulosus major antigens and their subunits by immünoblottting. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1991; 85: 239-43.
117. Soulsby EJL. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Baillier and Tindall. London. 1986.
118. Stott DI. İmmünoblotting and dot blotting. J İmmünol Methods. 1989; 119: 153-87.
119. Sweatman GK, Williams RJ, Moriarty KM, Henshall TC. On acquired immünity to Echinococcus granulosus in sheep. Res Vet Sci. 1963; 4: 187-98.
120. Şener S, Yazar S, Şahin İ. Cystic echinococcosis' in (CE) indirekt fluoresan antikor testi (IFAT) ile tanısında kullanılan antijenlerin tanı değerlerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2004; 13: 1-6.
121. Şenlik B, Diker Aİ. Echinococ'ların taksonomisi ve morfolojisi, In: Altıntaş N, Tınar, R Çoker A, editors, Echinococcosis. Hidatidoloji derneği, Yayın No1, İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004. p.13-30.
122. Şenlik B. EchinococTücosisde Hayvanlarda Tanı, In: N Altıntaş, R Tınar, A Çoker editors. Echinococcosis. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004. p. 295-316.
123. Şenlik B. Koyunlarda hidatidoz'un teşhisinde indirekt floresan antikor (IFA) ve indirekt hemaglütinasyon (IHA) testlerinin kullanımı. T Parazitol Derg. 2000; 24: 408-13.
124. Şimşek S, Köroğlu E, Dumanlı N, Aktaş M. Seroprevalence of Cattle Hydatidosis in Some Districts in the East Anatolian Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: 1305-10.
125. Şimşek S, Köroğlu E. Evaluation of enzyme-linked immünosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immünoelectrotransfer blot (EITB) for immünodiagnosis of hydatid diseases in sheep. Acta Tropica. 2004; 92: 17-24.
126. Şimşek S, Ütük AE, Köroğlu E. Hidatik kist sıvısından antijen B (Agb)' nin kısmi purifikasyonu ve koyun hidatidosisinin tanısındaki etkinliği. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2006; 20: 337-40.
127. Thompson RCA, Lymbery AJ: The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus. Adv Parasitol. 1988; 27: 209-58.
128. Thompson RCA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. Trends Parasitol. 2002; 18: 452-7.
129. Thompson RCA. Biology and systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA, Lymbery AJ editors. Echinococcus and hydatic disease. CAB International Oxon, 1995. p. 1-50.
130. Tınar R, Coşkun ŞZ. Hayvanlarda kist hidatik (Echinococcoses). 'İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis)' 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. T Parazitol Dern Yay. No 10, p. 157-96, 1991, İzmir.
131. Tınar R. Echinococcosisin Tarihçesi, In: Altıntaş N, Tınar, R Çoker A, editors, Echinococcosis. Hidatidoloji derneği, Yayın No1, İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004. p. 1-12.
132. Tiğin Y, Burgu A, Doğanay A. Hayvanlarda ekinokok türleri (Echinococcus sp.). İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. T Parazitol Dern Yay. No:10, p. 129-55, 1991, İzmir.
133. Torgerson PR. Economic effects of echinococcosis. Acta Tropica. 2003; 85: 113-8.
134. Turgay N, Üstün Ş. Echinococcosis'de immün cevap, In: N Altıntaş, R Tınar, A Çoker editors. Echinococcosis. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 2004. p.107-13.
135. Tüter Y, Kuştimur S, Güzel H. Kist hidatik hastalığı tanısında İHA ve IgG-ELISA testlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 1994; 24: 274-6.
136. Umur S. Prevalence and economic importance of cystic echinococcosis in slaughtered ruminants in Burdur, Turkey. J Vet Med. 2003; B50: 247-52.
137. Umur Ş, Aslantaş Ö. Kars Belediye Mezbahası'nda kesilen ruminantlarda hidatidozun yayılışı ve ekonomik önemi. T Parazitol Derg. 1993; 17: 27-34.
138. Unat EK. Ekinokoklar'ın ve enfeksiyonlarının tarihçesi. İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. Turk Parazitol Dern Yay. No:10, p.13-28, 1991, İzmir.
139. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP: Molecular genetic characterization of different isolates of Echinococcus granulosus in East and Southeast Regions of Turkey. Acta Tropica. 2008; 107: 192-4.

140. Üner A. Ekinokok'ların sistematiği ve biyolojisi 'İnsanlarda ve Hayvanlarda Kist Hidatik (Echinococcosis). 7. Uusal Parazitoloji Kongresi Özel Kitabı. T. Parazitol. Derg. Yay. No:10, p. 13-28, 1991, İzmir.
141. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. Echinococcus cinsinin moleküler genetik karekterizasyonu. T Parazitol Derg. 2005; 29: 171- 6.
142. Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E. Echinococcus granulosus'un koyun suşunun (G1) RAPD-PCR ve DNA dizi analizi ile tanısı. 3. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, 2006.
143. Valeire P. Peroxidase conjugates for demonstration of tissue antibodies. Clin Exp Imm. 1971; 9: 407-718.
144. Varela-Diaz VM, Coltorti EA, Rickard MA, Torres JM. Comperative antigenic charecterization of Echinococcus granulosus and Taenia hydatigena cyst fluids by immünoelectrophoresis. Res Vet Sci. 1997; 23: 213-6.
145. Vuitton DA. The ambiguous role of immünity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? Acta Tropica. 2003; 85: 119-32.
146. Wattal C, Malla N, Khan IA, Agarwal SC. Comperative evaluation of enzyme-linked immünosorbent assay for the diagnosis of pulmonary echinococcosis. Journal of Clinical Microbiology. 1986; 24: 41-6.
147. WHO/OIE. Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, In Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawłowski ZS editors. Paris, 2001.
148. Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. Echinococcus shiquicus n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. Int J Parasitol. 2005; 35: 693–701.
149. Yang FC. A study of domestic animals with Echinococcus infection in Qinghai Province and suggestions for control. Qinghai Xumu Shouyi Zazhi. 1992; 22: 22–5.
150. Yazar S, Altıntaş N. Serodiagnosis of cystic echinococcosis in Turkey. Helminthologia. 2003; 40: 9-13.
151. Yılmaz H, Cengiz ZT, Çiçek M. The problem of Cystic Echinococcosis in Van province. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009; 15: 607-10.
152. Yong WK, Heath DD, Van Knapen F. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immünosorbent assay for the diagnosis of Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and Taenia ovis infections in sheep. Res Vet Sci. 1984; 36: 24–31.
153. Zeyrek FY, Erdoğan DD, Korkmaz M. ELISA. IN: Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H, editors. Moleküler Parazitoloji. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22; 2009. p. 289-94.
154. Zhang W, Li Jun, McManus DP. Concepts in immünology and diagnosis of hydatid disease. Cilinical Microbiology reviews. 2003; 16: 18-36.
155. Zhang WB, Zhang ZZ, Alili H, Chi PS. An investigation of factors influencing the hyperendemic of echinococcosis in Xinjiang (in Chinese). Chin J Zoonoses. 1994; 10: 204–5.

10. ÖZGEÇMİŞ

Nermin Işık 1980 yılında Merzifon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1999 yılında kazanmış olduğu Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2004 yılında mezun oldu. 2005 yılında açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak, 01.11.2005 tarihinde Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2006 yılı bahar döneminde Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde doktoraya başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda görev yapmaktadır.