

Türkiye'nin Nevşehir İlindeki Atlarda Kistik Ekinokokkoz Seroprevalansı*

Armağan Erdem Ütük¹, Selçuk Pekkaya², Fatih Kuzugüden³, İbrahim Balkaya⁴, Sami Şimşek⁵

¹Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

²Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye

³İl, Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Nevşehir, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁵Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.10.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 11.11.2017

Özet: Kistik ekinokokkoz (KE) son derece önemli bir paraziter zoonoz olup insan ve hayvanlarda ciddi ekonomik kayıplara neden olur. Türkiye'de hastalığın sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında oldukça yaygın olduğu tespit edilmiştir. Ancak atlarda KE konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı Nevşehir ilinde halk elinde yetiştirilen atlarda KE seroprevalansını belirlemektir. Bu amaçla yaşları 3-24 arasında değişen, farklı ırklardan, 105 dişi attan kan alınarak serumları çıkarıldı. Enfekte koyun kistlerinden Antijen-B bakımından zengin kısmı purüfye kist sıvısı antijeni hazırlanarak enzimle-linked immunosorbent assay testinde (ELISA) kullanıldı. Tarama sonucunda 7 yaş ve altı atlarda %4,54 (2/44), 7 yaş üstü atlarda %6,55 (4/61) oranında anti-*Echinococcus granulosus* antikorları tespit edildi. Ki-kare (X^2) testi ile yaş grupları ile seroprevalans arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). Genel seroprevalans ise %5,71 (6/105) olarak belirlendi. Elde edilen veriler bu bölgede atların da son konak köpekçiller için enfeksiyon kaynağı olabileceğini ve hastalığın epidemiyolojisi açısından önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Nevşehir ilindeki atlarda ilk defa KE seroprevalansı belirlenirken, ülkemizde konuyla ilgili çok sınırlı sayıda bulunan literatür bilgiye bir yenisi eklenmiştir.

Anahtar kelimeler: At, ELISA, Kistik Ekinokokkoz, Nevşehir.

Seroprevalance of Cystic Echinococcosis in Horses in Nevşehir Province of Turkey

Abstract: Cystic Echinococcosis (CE) is a highly significant parasitic zoonosis and can cause dramatic economic losses in humans and animals. In Turkey, the disease has been detected and highly prevalent in farm animals such as cattle, sheep and goat; however, there is very little research on CE in horses. The aim of this study is to detect the seroprevalance of CE in horses bred by the locals in Nevşehir province. For this purpose, blood samples were taken from 105 female horses of different races, aged from 3 to 24 and their sera were obtained. Partially purified cyst fluid antigen from sheep hydatid cysts was used as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the end of the screening, anti-*Echinococcus granulosus* antibodies were detected in %4,54 (2/44) of horses aged 7 and under, and in %6,55 (4/61) of horses above 7 years of age. With the use of Chi-Square Test (X^2), no statistically significant difference was found between age groups and seroprevalance ($p > 0,05$). The overall seroprevalance rate was detected as %5,71 (6/105). The data obtained indicate that the horses in this region may be a source of infection for the final host, the canidae and are significant for the disease epidemiology. This study detects for the first time the seraprevalance of cystic echinococcus in horses in Nevşehir province and contributes to the limited amount of literature related to this topic in Turkey.

Key words: Cystic Echinococcosis, ELISA, Horse, Nevşehir.

Giriş

Echinococcus granulosus son konakları köpek, tilki, çakal kurt gibi kanideler ara konakları ise insan, sığır, koyun, keçi, deve, geyik, domuz, at ve eşek gibi memeliler olan taenid bir sestodtur. Ara konaklardaki metasestodlar hidatik kist, bu metasestodların oluşturduğu hastalık ise kistik ekinokokkoz

(KE) adını alır. Kistik ekinokokkoz kozmopolit bir yayılışa sahiptir. Hastalık çiftlik hayvanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olur. İnsanlarda ise anaflaktik reaksiyonlar, çeşitli organ ve dokularda yapısal ve fonksiyonel bozukluklar ve bazen ölümler görülür. Bu nedenle önemli bir helmintik zoonoz ve halk sağlığı problemidir [4,7].

*: Bu çalışma 18-21 Ekim 2017 tarihleri arasında Alanya'da düzenlenen II. International Academic Research Congress'de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi / Correspondence: Armağan Erdem Ütük, Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, Adana, Türkiye E posta: autuk@cu.edu.tr

Hidatidozun ara konaklardaki yaygınlığı kesimhane kontrolleri ve serolojik testler ile belirlenmektedir. Türkiye'de hastalığın sığır, koyun ve keçilerdeki yaygınlığı üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen, at hidatidozu ile ilgili sınırlı sayıda veri bulunmaktadır [2,6]. Ekinokokkozun belirli bir bölgede ara konaklardaki yaygınlığının belirlenmesi hastalığın epidemiyolojisi ve etkin kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem arz eder. Bu çalışmanın amacı Nevşehir ilindeki atlarda kistik ekinokokkozun prevalansını indirekt ELISA yöntemi ile belirlemektir.

Materyal ve Metod

Çalışmanın materyalini halk elinde bulunan ve turistik amaçlarla yetiştirilen, yaşları 3-24 arasında değişen, farklı ırklardan 105 dişi at oluşturdu. Atlar 7 yaş ve altı (≤ 7) ile 7 yaş üstü (>7) olarak iki gruba ayrıldı. Yaş grupları ile seropozitiflik arasında istatistiksel açıdan ilişki bulunup bulunmadığını belirlemek için Ki-kare testi (X^2) yapıldı.

Çalışma için Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yerel Etik Kurulundan 21.11.2015 tarih ve 2015/07 sayılı yazı ile izin alındı. Kan örnekleri atların *Vena jugularis*'inden vakumlu serum tüplerine alındı ve oda ısısında 2-3 saat pıhtılaşması beklendi. Pıhtılaşan kan 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Serumlar mikrosantrifüj tüplerine ayrıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi [16].

Mezbahada kesimler takip edilerek ağır enfekte olduğu tespit edilen bir koyundan elde edilen karaciğer laboratuara getirildi ve hidatik kist sıvısından antijen B (AgB) bakımından zengin kist sıvısı antijeni hazırlandı. Bu amaçla kist sıvısı steril koşullarda aspire edildi ve mikroskopta protoskoleklerin varlığı yönünden incelendi. Fertil olduğu belirlenen kistlerin sıvısı 2000 g'de 15 dk santrifüj edilerek protoskolekler ve diğer katı materyal çöktürüldü. 100 ml süpernatant bir gece $+4^\circ\text{C}$ 'de 0.005 M asetat buffer (pH 5) içerisinde diyaliz edildi. Diyaliz sonucunda elde edilen kist sıvısı $+4^\circ\text{C}$ 'de 15,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Pelet toplanarak 10 ml 0.2 M fosfat tamponunda (pH 8) çözdürüldü ve 15 dk kaynatılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de 20,000 g'de 1 saat santrifüj edildi. AgB bakımından zengin süpernatant porsiyon-

lanarak kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi. Protein konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülerek (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi [6,10].

Test küçük modifikasyonlarla Şimsek ve ark. [14]'a göre yapıldı. ELISA plaklarının (Dynatech Laboratories, IA, USA) her bir kuyucuğuna 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antijeni ihtiva eden 0.1 M karnonat/bikarbonat tamponundan (pH 9.6) 100 μl eklendi ve $+4^\circ\text{C}$ 'de bir gece inkube edildi. İnkubasyondan sonra plaklar 2 kere içerisinde 0.01% Tween-20 bulunan 130 μl PBS (yıkama solüsyonu) ile yıkandı. Her kuyucuğa 5% oranında yağsız süt tozu ihtiva eden 0.01 M PBS (pH 7.4)'den 130 μl eklendi ve 37°C 'de 1.5 saat inkube edilerek bloklama işlemi yapıldı. Bloklamadan sonra 3 kere yıkama işlemi yapıldı. Serum örnekleri 0.05% Tween-20 ihtiva eden PBS ile 1:200 sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 μl eklenerek 37°C 'de 1.5 saat inkube edildi. Plaklar 5 kere PBS/Tween ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 μl konjugat eklendi [1:5000'lik goat antihorse IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc2906, Lot: B212)] ve pleytler 37°C 'de 2 saat inkube edildi. İnkubasyon sonucunda pleytler 5 kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 μl substrat eklendi (sitrat/fosfat tamponu içerisinde O-fenilen diamin ve hidrojen peroksit) ve oda ısısında 15 dk inkube edildi. İnkubasyon sonucunda her kuyucuğa 50 μl durdurma solüsyonu (1 N sülfürik asit) eklendi. Plaklar ELISA okuyucuda (Bio-Tek instruments, USA) 450 nm dalga boyunda okutuldu. Her örnek çift olarak çalışıldı. Her örnek için sonuçlar örneklerin optik dansitelerinin ortalaması alınarak değerlendirildi. Aralarında %10'dan fazla optik dansite farkı olan örnekler tekrar çalışıldı. Negatif kontrollerin absorbans değerinin aritmetik ortalaması + 3 standart sapma ($X+3\text{SD}$) değerinin (cut-off) üstü pozitif olarak kabul edildi [6,14].

Bulgular

Çalışma sonucunda 7 yaş ve altı atlarda %4,54 (2/44), 7 yaş üstü atlarda %6,55 (4/61) oranında anti-*Echinococcus granulosus* antikorları tespit edildi. Ki-kare testi ile yaş grupları ile seropozitiflik arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Genel seroprevalans ise %5,71 (6/105) olarak belirlendi.

Tartışma ve Sonuç

Postmortem incelemeye dayalı kontrollerde İtalya'nın Sicilya bölgesinde kesilen 360 atın %1,7'sinde [11] Şili'de 9391 atın %9'unda [1] Çin'in Xinjiang bölgesinde kesilen 352 atın %4,3'ünde [12] ve Fas'ta incelenen 455 tek tırnaklının %17,18'inde [5] hidatidoz tespit edilmiştir. Seroprevalans çalışmalarında ise Yunanistan'da 753 atın %0,1'inde ve İran'da 193 atın %3,11'inde anti-*E.granulosus* antikorları tespit edilmiştir [8,13].

Ülkemizde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1933-1961 yılları arasında nekropsisi yapılan 1352 atın %0,15'inde [3] ve Atatürk Orman çiftliğinde karnivorların beslenmesi amacıyla kesilen 80 tek tırnaklının %2,5'inde hidatidoz tespit edilmiştir [9]. Erzurum'da hidatidozun tek tırnaklılardaki seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada 250 hayvanın %31,2'sinde, atların %20,4, eşeklerin ise %33,5'inde seropozitiflik belirlenmiştir [6].

Bu çalışmada incelenen 105 dişi atın %5,71'inde, 7 yaş ve altı atların %4,54'ünde, 7 yaş üstü atların ise %6,55 'inde anti-*E. granulosus* antikorları tespit edildi. Yaş grupları ve seropozitiflik arasında ise istatistiki açıdan bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

Dünyadaki postmortem incelemeye dayalı çalışmalar ile karşılaştırıldığında ülkemizde tek tırnaklılarda hidatidoz prevalansı dünya ortalamasından daha yüksek değildir. Ancak serolojik çalışmalara bakıldığında ülkemizdeki atlardaki hidatidoz seroprevalansının Yunanistan ve İran'dan daha yüksek olduğu görülmektedir [6,8,13]. Hidatidoz seroprevalansını belirlemek amacıyla Yunanistan'da ELISA, İran'da ise Lateks Aglutinasyon Testi (LAT) kullanılmıştır [8,13]. Serolojik çalışmalarda kullanılan testlerin duyarlılıklarının farklı olması, aynı test kullanılsa dahi cut-off değerlerindeki farklılıkların sonuçları değiştirebileceği bilinmektedir [17]. Dolayısı ile Yunanistan, İran ve Türkiye'deki seroprevalans farklılıkları kullanılan test metodları ve cut-off değerlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi hastalığın Türkiye'de daha endemik olmasından ya da bu çalışma kullanılan hayvanların yetiştirme ve beslenme özelliklerinden de kaynaklanabilir. Ancak bu çalışmalarda kullanılan antijen, test ve cut-off değerlerinin Balkaya ve Şimşek [6]'in

çalışması ile aynı olduğu göz önüne alındığında hidatidozunun Erzurum yöresinde Nevşehir'den daha endemik olduğu söylenebilir. Bu seroprevalans farkı atların beslenme özelliklerine bağlı olabilir nitekim Balkaya ve Şimşek [6], atların en az bir dönem merada otladığını belirtmiştir. Bu çalışmada kullanılan atlar daha çok turistik amaçlarla kullanılmakta ve merada otlama imkânı bulamamaktadır. Bu da parazit konak temasının azalmasına bağlı olarak prevalansın düşmesine neden olmuş olabilir.

Atlarda hidatidozun genellikle asemptomatik seyretmesi, modern görüntüleme tekniklerinin hayvanlarda çok sık kullanılmaması ve kesimhane kontrollerine dayalı monitöring çalışmalarının yapılamaması atlarda hidatidozun yaygınlığı konusundaki verilerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda serolojik testler hastalığın atlardaki yaygınlığını belirleme noktasında ön plana çıkmaktadır [15]. Bu çalışmadan elde edilen veriler Nevşehir yöresinde diğer çiftlik hayvanları gibi atların da son konak köpekgiller için enfeksiyon kaynağı olabileceğini ve hastalığın epidemiyolojisi açısından önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Nevşehir ilindeki atlarda ilk defa kistik ekinokokkoz seroprevalansı belirlenirken, ülkemizde konuyla ilgili çok sınırlı sayıda bulunan literatür bilgiye bir yenisi daha eklenmiştir.

Kaynaklar

1. Acosta-Jamett G, Cleaveland S, Cunningham AA, Bronsvort BM, Craig PS, (2010). *Echinococcus granulosus* infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile. Vet Parasitol. 169, 102-110.
2. Akyol ÇV, (2004). *Echinococ Türlerinin Epidemiyolojisi*. Altuntaş N, Tınar R, Çoker A. Eds. Echinococcosis. Hidatidoz Derneği, Yayın No:1, Bornova, İzmir.
3. Alibasoglu A, Yalciner S, (1965). 1933-1961 yılları arasında Ankara ve yöresinde atlarda görülen hastalıklara toplu bir bakış. Ankara Univ Vet Fak Derg. 12, 98-111.
4. Amman RW, Eckert J, (1995). *Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans*. Thompson RCA, Lymbery AJ. Eds. Echinococcus and Hydatid Disease. Wallingford, Oxon: CAB International. p. 411-463.
5. Azlaf R, Dakkak A, (2006). *Epidemiological study of the cystic echinococcosis in Morocco*. Vet Parasitol. 137, 83-93.
6. Balkaya I, Simsek S, (2011). *A Serological Survey of Cystic Echinococcosis in Equids in East of Turkey*. Iranian J Parasitol. 6, 46-50.
7. Güralp N, 1981. *Helmintholoji*. İkinci baskı. Ank. Üniv. Vet. Fak. Yayın. No:368. Ankara

8. Kouam MK, Diakou A, Kanzoura V, Papadopoulos E, Gajadhar AA, Theodoropoulos G, (2010). *A seroepidemiological study of exposure to Toxoplasma, Leishmania, Echinococcus and Trichinella in equids in Greece and analysis of risk factors*. Vet Parasitol. 170, 170–175.
9. Oge S, Kircali F, Yildirim A, Oge H, (2004). *Hydatidosis (Hydatid cyst) in equines*. Ankara Univ Vet Fak Derg. 51, 75-76.
10. Oriol R, Williams JF, Perez-Esandi MV, Oriol C (1971). *Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid*. Am J Trop Med Hyg. 20, 569-574.
11. Pierotti P, (1954). *Echinococcosis in equine liver*. Ann Fac Med Vet Pisa. 7, 37-42.
12. Qingling M, Guanglei W Jun Q, Xinquan Z, Tianli L, Xuemei S, Jinsheng Z, Huisheng W, Kuojun C, Chuangfu C, (2014). *Prevalence of Hydatid Cysts in Livestock Animals in Xinjiang, China*. Korean J Parasitol. 52, 331-334.
13. Sakhaee E, Golchin M, Amir H, Fayed MR, Eydi J, (2016). *First serological study of equine hydatidosis in Iran*. J Parasit Dis. 40, 1567–1570.
14. Simsek S, Risvanli A, Utuk AE, Yuksel M, Saat N, Koroglu E (2007). *Evaluation of relationship between repeat breeding and Fasciola hepatica and hydatid cyst infections in cows in Elazig district of eastern Turkey*. Res Vet Sci. 83, 102-104.
15. Şimşek S, (2016). *Hidatidosis*. Özcel MA. Ed. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, No: 24, Cilt:2, İzmir.
15. Şenlik B, (2011). *Teşhis yöntemleri*. Tınar R. Ed. Veteriner Helminoloji. 1.Baskı. Dora Yayınları, Bursa.
16. Utuk AE, Eski F, (2017). *Detection of Anti-Neospora caninum Antibodies in a Goat Flock in Kilis Province of Turkey*. Inter J Vet Sci. 6, 114-117.