

KOYUN KİST HİDATİK PROTOSKOLEKSLERİNİN PROTEİN YAPISININ ANALİZİ VE SPESİFİK ANTİJENLERİN SAPTANMASI

Ahmet DOĞANAY¹
Bahadır GÖNENÇ²

Ayşe BURGU¹
H. Oğuz SARİMEHMETOĞLU²

*The analysis of protein structure of cyst hydatid protoscolices from sheep and
the determination of specific antigens*

Özet: Bu çalışmada SDS-PAGE+Western blot kombinasyonu kullanılarak, koyun karaciğer kist hidatik protoskolekslerinin protein bantları ortaya çıkarılmış, daha sonra da koyunlar için spesifik kist hidatik protein bantları belirlenmiştir.

Bu amaç için 20 pozitif koyun serumu, 10 negatif koyun serumu, 1 non-enfekte koyun serumu kullanılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre; koyunlarda kist hidatik hastalığı için spesifik protein bantlarının 68,24 ve 8 kDa olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kist hidatik, koyun, protoskoleks, SDS-PAGE, Western blot.

Summary: In this study, protein bands of hydatid protoscolices of sheep liver were determined by using SDS-PAGE+Western blot, and this was followed by determining the specific cyst hydatid protein bands for sheep.

For diagnosis purpose, 20 positive, 10 negative and 1 non-infected sheep sera were used in this experiment.

According to our results, specific protein band for cyst hydatid disease in sheep was determined as 68,24 and 8 kDa.

Key words: Hydatid cyst, protoscolex, SDS-PAGE, sheep, Western blot.

Giriş

Echinococcus granulosus'un olgunları başta köpekler olmak üzere kurt, çakal gibi çeşitli karnivorların ince bağırsaklarında, larvası olan kist hidatik ise koyun, keçi, sığır, domuz, geyik gibi birçok evcil ve yabani memelinin, ayrıca insanların daha çok karaciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularında bulunmaktadır (9,17).

Hidatidosis, dünyada özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (9). Türkiye'de de yaygın olarak görülen bu hastalık gerek sağlık, gerekse ekonomik açıdan sorun oluşturmaktadır (3,9).

Hayvanlarda ekonomik ve pratik olmaması nedeniyle hidatidosisin teşhisine başvurulmaktadır. İnsanlarda ise hastalığın tanısında klinik semptomlardan, Radyografi, Ult-

1. Prof. Dr., Ankara Üniv. Veteriner Fak. Parazitoloji AD, Helminoloji BD Dışkapı-Ankara
2. Dr., Ankara Üniv. Veteriner Fak. Parazitoloji AD, Helminoloji BD Dışkapı-Ankara

rasonografi ve ayrıca İmmundiffuzyon, İHAT, CİEP, DD, İFAT, ELİSA gibi çeşitli serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bunlardan özellikle Radyografi ve Ultrasonografi yöntemleri ile iyi sonuçlar alınmaktadır. Ancak doku içinde olan ve özellikle yeni oluşmakta olan kistlerin bu tekniklerle teşhisinde zorluklar yaşanmaktadır. Diğer taraftan başta *Taenia sp.* ve *Hymenolepis nana* olmak üzere çeşitli cestod enfeksiyonları ile çapraz reaksiyonlar verdiği için İHAT, CİEP, DD, İFAT, ELİSA gibi serolojik yöntemlerin de hastalığın teşhisinde fazla güvenilirliği bulunmamaktadır (1,10, 11,16,18).

Türkiye'de insanlarda hidatidosisin serolojik yöntemlerle teşhisi konusunda sınırlı sayıda da olsa çalışmalar (8,13,27,28) yapılmıştır. Hayvanlarda ise bu konuda yapılmış serolojik çalışma sayısı çok daha sınırlıdır (2,25).

Şenlik (25), yaptığı çalışmada, koyunlarda hidatik kistlerin teşhisinde İFAT'ın sensitivitesini %78.95, spesifitesini de %77.03 olarak tespit ettiğini ve İFAT'ın İHAT'a göre daha güvenilir test olduğunu bildirmiştir. Ancak *Cysticercus tenuicollis* ve *Moniezia sp.*'li koyun serumlarında her iki test ile de çapraz reaksiyonlar görüldüğünü kaydetmiştir (25). Hidatidosisli koyunlar üzerinde CİEP ve DD tekniklerinin kullanıldığı bir çalışmada (2), kist lokalizasyon yerlerinin elde edilen sonuçları önemli ölçüde etkileyebileceği belirtilmiştir.

Son yıllarda immunodiagnoz alanına hızla giren sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)+Western blot yöntemleri, enfeksiyon etkenlerinin protein yapısındaki spesifik antijenlerini ortaya çıkararak, indirekt tanı yöntemlerinin değerini düşüren çapraz reaksiyon gibi olumsuzlukları ortadan kaldırmıştır (22). SDS-PAGE tekniğinde proteinler anyonik deterjan olan SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü kompleksler oluştururlar. Protein tarafından bağlanan SDS miktarı ve dolayısıyla kompleks üzerindeki yük, protein büyüklüğü ile orantılıdır. Her ne kadar istisnalar varsa da genellikle 1.4 gr. SDS 1 gr. proteine bağlanır. Proteinler genellikle SDS ye bağlanarak denatüre olur ve çözünürlük kazanarak şekillerini değiştirirler. Böylece, proteinler asidik yada bazik negatif

yüklenmiş kompleksler olarak temelde yüklerindeki ve büyüklüklerindeki farklılığa dayanarak polyacrylamide jelin kalbura benzer matriksinde elektroforez ile separasyona tabi tutulurlar (1).

Öncelikle viral ve bakteriyel hastalıkların tanısında doğrulama testi olarak kullanılmaya başlanılan ve teorik olarak kusursuz özelliklere sahip olan SDS-PAGE+Western blot tekniğinin parazitolojide kullanımı oldukça yenidir (1,26). Diğer birçok uygulamada da görüldüğü gibi bu test de standardize edilmeye muhtaçtır (26). Nitelik SDS-PAGE de proteinlerin fraksiyonunda aynı antijenle çalışılmasına rağmen farklı sonuçların alındığı rapor edilmiştir (13). Bu farklılıkların antijenin ekstraksiyonunda kullanılan metodların farklı olmasından, ayrıca çalışmanın çeşitli aşamalarında kullanılan aletlerden ve özellikle protein kesici ve jel polimerizasyonunda kullanılan kimyasal maddelerin kalite ve kantite değişikliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (13).

Bu tekniğin insanlarda paraziter hastalıkların tanısında da son derece hassas ve spesifik sonuçlar verdiği bildirilmektedir (23,26). Hidatidosisli insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda (6,7,12) immüno blotting testinin çapraz reaksiyon riskini önemli oranda azalttığı, erken teşhis için çok önemli bir basamak teşkil ettiği kaydedilmektedir.

Kanwar ve ark. (12), koyun, keçi, domuz ve insandan aldıkları hidatik kist sıvılarında molekül ağırlıkları 8-116 kDa arasında değişen en az 15 protein fraksiyonu saptadıklarını, hidatidosisli hastalarda koyun hidatik kist sıvı fraksiyonlarında bunlardan 12 sine karşı antikor yanıtın geliştiğini kaydetmişlerdir. Araştırmacılar (12), 16,24,38,45 ve 58 kDa'luk bantlara karşı hidatidosisli insan serumunda antikor yanıtın görüldüğünü, fakat bu bantların diğer bazı paraziter enfeksiyonlu insan serumlarıyla da çapraz reaksiyonlar verdiğini, bununla beraber 8 ve 116 kDa iki antijenik fraksiyona karşı hidatidosisli insan serumlarında spesifik antikor yanıtın bulunduğunu bildirmektedir. Maddison ve ark. (15), bu bantlardan 8 kDa'nun daha spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında 12,16,20,37,38,48 kDa bantlara karşı hi-

datidosisli hastalarda oluşan antikor yanıtın spesifik olduğunu bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (5,6,7,14,19,21).

SDS-PAGE+Western blot kombinasyonu kullanarak, kist hidatik sıvısı antijeni ile 30 pozitif, 20 negatif koyun serumu ve 10 pozitif, 10 negatif insan serumunun bakısını yapan Burgu ve ark. (4), koyunlarda kist hidatik hastalığı için spesifik protein bantının 116 kDa, insan kist hidatik hastalığı için de 68 ve 8 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Echinococcus granulosus yumurta onkosferlerinden SDS-PAGE ile elde ettikleri 23 ve 25 kDa'luk proteinleri dencysel olarak koyunlara veren Heath ve Lawrence (10), koyun serumlarında bu proteince karşı spesifik antikorların geliştiğini ve bu antikorların onkosferi eritici özelliğe sahip olduğunu belirlemiştir.

İnsan, koyun ve sığır kökenli hidatik kist sıvılarındaki proteinlerin SDS-PAGE ile analizlerinde 8-120 kDa arasında değişen 20 kadar bant bulan Köksal ve ark. (13), preoperatif hasta serumlarında hem insan, hem de sığır kökenli kist hidatik sıvılarında 116,98,68,57 ve 45 kDa'luk en az 5 banta karşı antikor yanıtın oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada (24), kist hidatiğin protoskoleks, kist sıvısı ve çimlenme zarı kullanılarak, bunlara ilişkin antijenik profilleri Western blot ile ortaya çıkarılmış ve 8,20,45,57,68 kDa'luk antijenik determinantların, cerrahi olarak hastalığı doğrulanmış kan serumu antikorları ile tanıdığı bildirilmiştir. Ayrıca sığır ve koyun kökenli kist sıvılarından da benzer sonuçlar alındığı kaydedilmiştir (24).

Hidatidosisli insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda (6,7,12,14), immunblot tekniğinin iyi bir konfirmasyon testi olduğu, fakat spesifik bantların belirlenmesi amacıyla başka çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Bu çalışma ile insan sağlığını ciddi tehlike içinde bırakan ve hayvansal ürün kaybına neden olan hidatidosisin varlığını ortaya koymada, son yıllarda uygulanmaya başlanan SDS-

PAGE+Western blot kombinasyonu kullanılarak hidatik kist protoskoleks antijenindeki protein bantlarından spesifik olanları belirlemek amaçlanmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre yapılacak daha sonraki çalışmalarla spesifik olduğu belirlenen bu bantların pürifikasyonu ile hidatidosisin erken dönemde teşhisini sağlayacak kitlerin Türkiye'de üretilebilmesi mümkün olacaktır.

Materyal ve Metot

Çalışma materyali için Kazan Belediyesi Mezbahasına gidilerek, kesimi yapılan koyunların kanları tüplere alınmış, daha sonra bu hayvanların kesimleri takip edilerek kist hidatikli olanlar ve olmayanlar belirlenerek serumları ayrılmıştır. Ayrıca, pozitif ve negatif kontrol olarak serumları ayrılan koyunların dışkı ve organları *Fasciola sp.*, *Dicrocoelium dentriticum*, *Paramphistomum sp.*, *Trichostrongylidae sp.*, *Cysticercus tenuicollis* gibi diğer helmint türleri bakımından da incelenerek hayvanların bu hastalıklar yönünden pozitif veya negatif oldukları belirlenmiştir. Bu serumların yanında negatif serumların doğrulamasının yapılması amacı ile piyasada hazır satılan non-enfekte koyun serumu (Sigma S-3772) temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan antijen aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır.

Koyun karaciğerinden toplanan kist hidatik sıvısı 10000xg de 30 dakika santrifüj edilerek protoskoleksler çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası dibe çöken protoskoleksler %10 SDS ile 30 dakika sallayıcıda bırakılarak parçalanmış ve elde edilen sıvı 0.45µm lik membran filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen solüsyon diyaliz torbasına konularak 36 saat distile suya karşı +4°C da diyaliz edilmiştir. Böylece hazır hale gelen antijen -20°C da saklanmıştır.

Çalışmada uygun antijen miktarını belirlemek için hazırlanan jelle (%12'lik separating+%5'lik staking) 10,20,30,40,50µl antijen yüklenerek boyamaları yapılmış ve en iyi bantların 40µl'de olduğu belirlenerek çalışmaya bu miktar ile devam edilmiştir. Protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde 2

ayrı protein standardı kullanılmıştır. Bu standartlar; molekül ağırlığı 36-205 kDa arasında olan High Range standart ile (Sigma M-3788), ile molekül ağırlığı 3.5-29 kDa arasında değişen, Low Range standart (Owl Unstained Standarts Kit ER-111-L) olmuştur.

Çalışmada kullanılan solusyonların hazırlanması ile Elektroforez ve Western blot prosedürleri Sambrook ve ark. (20)'a göre yapılmıştır.

Spesifik protein bantlarının belirlenmesi amacıyla, separating+staking jel kombinasyonu ile protoskoleklerden hazırlanan antijenin SDS-PAGE yöntemi ile elektroforezi yapılmış ve proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Proteinlerin bulunduğu jel elektrofrezden alınarak (Proteinlerin nitrosellüloz membrana aktarılıp Western blot yönteminin uygulanabilmesi için) transfer blot aygıtına aktarılmıştır. 13-25V ve 3mA/cm² hesabı ile ayarlanan güç kaynağı ile 40-45 dakikada transfer işlemi tamamlanmıştır. Birinci sıraya protein standartı yüklenerek elektrofrez yapılmış Polyacrilamide jel nitrosellüloz membrana aktarıldıktan sonra Ponceau S ile boyanarak standart proteinlerin molekül ağırlıkları membran üzerinde belirlenmiştir. Nitrosellüloz membran daha sonra, Anti-sheep IgG Peroxidase Conjugate (Sigma A-3415) ve substratla (OPD Peroxidase Substrate Sigma P-8287) karşılaştırılarak sonuçlar okunmuştur. Çalışmada kullanılan antijenin protein yapısı SDS-PAGE yöntemi ile separe edildikten sonra, jel Silver Stain Tekniği ile boyanıp protein bantları standartla karşılaştırılarak, molekül ağırlıkları belirlenip, fotoğrafları çekilmiştir.

Bulgular

Çalışmada SDS-PAGE yöntemi ile büyüklükleri 116-3.5 arasında değişen 34 protein bantı belirlenmiştir (Şekil 1).

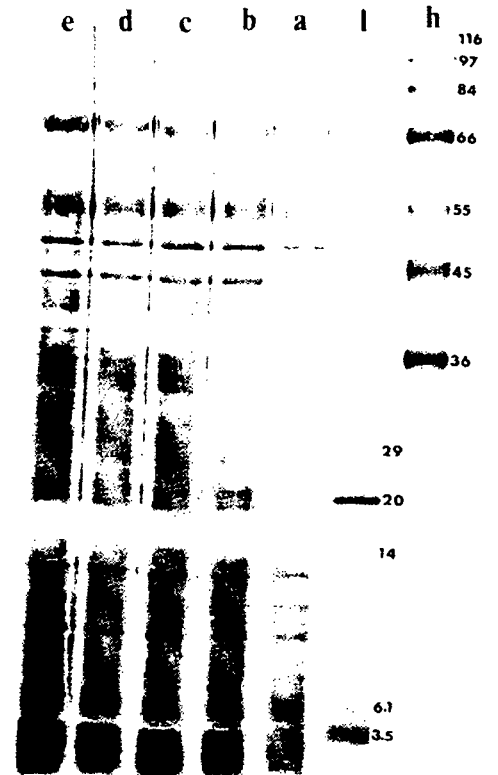
İşlenen 20 pozitif koyun serumunda nitrosellüloz membranda 68,58,48,38,24 ve 8 kDa olmak üzere en fazla 6 bant görülmüştür (Şekil 2).

İşlenen 10 negatif koyun serumunda en fazla 4, en az 3 bant görülmüştür (Şekil 3).

Bunlardan 58,48,38 kDa luk bantlar tüm negatif serumlarda görülürken, 68 kDa'luk protein bantı 2 negatif serumda belirlenmiştir (Tablo 2).

Non-enfekte koyun serumunun Western blot işlemi sonucunda ise nitrosellüloz membranda 58,48 ve 38 kDa molekül ağırlıklarında 3 banta rastlanmıştır.

Pozitif kontrol olarak ayrılan 20 koyunun karkas ve organ muayenesinde, 15'inde hem karaciğer, hem de akciğerlerde kist hidatiğe rastlanırken, 5'inde sadece karaciğerde kist hidatik görülmüştür. Ayrıca yapılan karkas ve organ muayenesinde 4 koyunda *Cysticercus tenicollis* tespit edilmiştir.



Şekil 1. Koyun kist sıvısı antijenindeki proteinlerin SDS-PAGE yöntemi ile separasyonu sonucu elde edilen protein bantları. (h:high range protein standart. l:low range protein standart. a:antijen 10µl. b:antijen 20µl. c:antijen 30µl. d:antijen 40µl. e:antijen 50µl)
Figure 1. Protein bands separated by SDS-PAGE in cyst hydatid protoscolices of sheep. (h:high range protein standart. l:low range protein standart. a:antigen 10µl. b:antigen 20µl. c:antigen 30µl. d:antigen 40µl. e:antigen 50µl)

Pozitif ve negatif kontrol olarak ayrılan koyunların dışkı muayeneleri sedimentasyon ve flotasyon yöntemleri ile yapılmıştır. Bu muayene sonuçlarına göre pozitif kontrol olarak ayrılan 20 koyunun 16'sında *Trichostrongylidae* sp., 3 koyunda *Dicrocoelium dendriticum*, 2 koyunda *Paramphistomum* sp. ve 1 koyunda *Fasciola* sp. yumurtasına rastlanmıştır (Tablo 1).

Negatif kontrol olarak ayrılan 10 koyun dışkısının muayenesi sonucunda ise, 7 koyunda *Trichostrongylidae* sp., 2 koyunda *Fasciola* sp., 1 koyunda *Paramphistomum* sp., 1 koyunda *Trichuris* sp. ve 1 koyunda *Dicrocoelium dendriticum* yumurtasına rastlanmıştır (Tablo 2).

Negatif kontrol olarak ayrılan koyunların karkas ve organ muayenelerinde ise, 1 koyunda *Cysticercus tenuicollis*'e rastlanmıştır.

Bu çalışmaya göre, koyunda kist hidatik hastalığı için spesifik olduğu kabul edilen 68

kDa'luk bant, mezbaha muayenelerine göre kist hidatik bakımından negatif olan 2 koyun serumunda da görülmüştür. Bu bantın görüldüğü koyunların dışkı muayenesinde; koyunlardan birinin de *Trichostrongylidae* sp. ve *Paramphistomum* sp.'ye, diğerinde ise *Trichostrongylidae* sp. ve *Fasciola* sp.'ye rastlanmıştır (Tablo 2).

Elde edilen bulgulara göre, koyun karaciğer kist protoskolekslerinin antijen olarak kullanıldığı Western blot yönteminde, koyunlarda kist hidatik hastalığının tanısında, spesifik bantların 68,24 ve 8 kDa olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuca, hidatidosisli koyun serumları ile, negatif kontrol ve non-enfekte koyun serumlarının nitrosellüloz membranda vermiş oldukları bantların karşılaştırılması ile varılmıştır. Nitekim, 68,58,38,24 ve 8 kDa'luk protein bantlarının 20 pozitif koyun serumunun hepsinde görülmesi (Şekil 2), 24 ve 8 kDa'luk protein bantlarının 10 negatif koyun se-

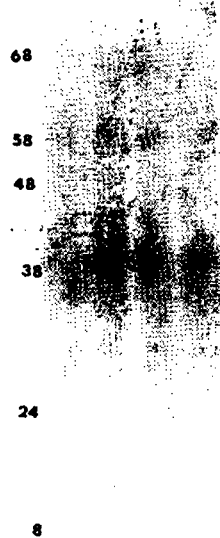
kDa

58
48
38



kDa

68
58
48
38
24
8



Şekil 2. Western blot yöntemi ile pozitif koyun serumlarında görülen bantlar.

Figure 2. Bands detected by Western blot in positive sheep sera.

Şekil 3. Western blot yöntemi ile negatif koyun serumlarında görülen bantlar

Figure 3. Bands detected by Western blot in negative sheep sera.

rumundan hiçbirisinde görülmemesi (Şekil 3), 68 kDa'luk protein bantının ise yalnızca 2 negatif koyun serumunda görülmesi ve piyasadan hazır satın alınan non-enfekte koyun serumunda bu bantlardan 68,24 ve 8 kDa olanlarına rastlanmaması spesifik protein bantlarının 68,24 ve 8 kDa olduğu sonucunu desteklemiştir. Ancak, 68 kDa'luk bant 10 negatif kontrol kan serumundan ikisinde de görülmüştür. Bu sonuç, kanın alındığı koyunda mezbaha kontrollerinde gözden kaçmış çok küçük çaplı kistin varlığını akla getirdiği gibi, 68 kDa'luk proteinin %100 spesifik olmayıp kros reaksiyon vermesine de

ilgili olabilir. Çünkü, non-enfekte koyun serumunda 68 kDa'luk bant görülmemiş ve bu bantın görüldüğü negatif hayvanlarda ise *Trichostrongylidae* sp., *Paramphistomum* sp. ve *Fasciola* sp.'ye rastlanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda immunodiagnoz alanına hızla giren sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)+Western blot yöntemleri, bazı parazitler hastalıkların teşhisinde de denenmeye başlanmıştır (1).

Tablo 1. Kist hidatik ile enfekte koyun serumlarında Western blot tekniği ile saptanan protein bantları.
Table 1. Protein bands detected by using Western blot in the sera of sheep with hydatidosis.

Enfekte Hayvan no	Kist lokalizasyon Yeri	Diğer helmint Enfeksiyonları	Nitrosellüloz membranda görülen bantlar (kDa)					
			68	58	48	38	24	8
1	Karaciğer,Akciğer	Trc.	+	+	+	+	+	+
2	Karaciğer,Akciğer	Trc.	+	+	+	+	+	+
3	Karaciğer,Akciğer	Trc.Dic	+	+	+	+	+	+
4	Karaciğer,Akciğer	-	+	+	+	+	+	+
5	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Paramph.	+	+	+	+	+	+
6	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Cyst.	+	+	+	+	+	+
7	Karaciğer,Akciğer	Trc.	+	+	+	+	+	+
8	Karaciğer,Akciğer	-	+	+	+	+	+	+
9	Karaciğer,Akciğer	Trc.	+	+	+	+	+	+
10	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Cyst.	+	+	+	+	+	+
11	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Cyst.	+	+	+	+	+	+
12	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Cyst.	+	+	+	+	+	+
13	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Fasc.	+	+	+	+	+	+
14	Karaciğer,Akciğer	-	+	+	+	+	+	+
15	Karaciğer,Akciğer	Trc.,Paramph.	+	+	+	+	+	+
16	Karaciğer	Trc.,Dic.	+	+	+	+	+	+
17	Karaciğer	-	+	+	+	+	+	+
18	Karaciğer	Trc.	+	+	+	+	+	+
19	Karaciğer	Trc.,Dic.	+	+	+	+	+	+
20	Karaciğer	Trc.	+	+	+	+	+	+
Pozitif bant sayısı			20	20	20	20	20	20
Pozitif bant %'si			100	100	100	100	100	100

*Diğer helmint enfeksiyonları; Trc.:Trichostrongylidae sp., Paramph.: Paramphistomum sp.,Fasc.: Fasciola sp., Dic.: Dicrocoelium dendriticum, Cyst.: Cysticercus tenuicollis

Tablo 2. Negatif kontrol grubu koyun serumlarında Western blot tekniği ile saptanan protein bantları.
Table 2. Protein bands detected by using Western blot in the sera of sheep of negative control group.

Enfekte Hayvan no	Diğer helmint Enfeksiyonları*	Nitrosellüloz membranda görülen bantlar (kDa)					
		68	58	48	38	24	8
1	Trc.	-	+	+	+	-	-
2	-	-	+	+	+	-	-
3	Trc.,Trich.,Dic.	-	+	+	+	-	-
4	Tric.,Fasc.	-	+	+	+	-	-
5	Trc.	-	+	+	+	-	-
6	-	-	+	+	+	-	-
7	Trc.Paramph.	+	+	+	+	-	-
8	Tric.	-	+	+	+	-	-
9	Cyst.	-	+	+	+	-	-
10	Trc.,Fasc.	+	+	+	+	-	-
Pozitif bant sayısı		2	10	10	10	0	0
Pozitif bant %'si		20	100	100	100	0	0

*Diğer helmint enfeksiyonları; Trc.:Trichostrongylidae sp., Paramph.: Paramphistomum sp.,Fasc.: Fasciola sp., Dic.: Dicrocoelium dendriticum, Cyst.: Cysticercus tenuicollis

Kanwar ve ark. (12), koyun, keçi, domuz ve insandan aldıkları hidatik kist sıvılarında molekül ağırlıkları 8-116 kDa arasında değişen en az 15 protein bandı bulunduğunu bildirmişler ve bu protein bantları içerisinde 8-116 kDa'luk 2 antijenik banta karşı opere edilerek hastalıkları teyit edilmiş hasta serumlarında antikor cevabı bulunduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise antijende, 3.5-116 kDa arasında değişen 34 protein bandı bulunmuş ve bu bantlar arasından koyunlarda kist hidatik hastalığı için spesifik bantların 68,24 ve 8 kDa olduğu belirlenmiştir.

Maddison ve ark. (15), insanlarda kist hidatik hastalığı için 8 kDa'nun en spesifik bant olduğunu kaydetmiştir. Bu çalışma sonucuna göre de, koyunlarda %100 spesifik diyebileceğimiz protein bantları 24 ve 8 kDa'luk bantlar olarak dikkati çekmektedir.

İnsan, koyun ve sığır kökenli kist hidatik sıvılarında proteinlerin SDS-PAGE ile analizlerinde 8-120 kDa arasında değişen 20 kadar bant bulan Köksal ve ark. (13), preoperatif hasta serumlarında hem insan, hem de sığır kökenli hidatik sıvılarında 116,98,68,57 ve 45

kDa'luk en az 5 banta karşı antikor cevabı tespit etmiştir. Araştırmacılar (13), 8 kDa'luk proteini nitrosellüloz membranda gösterememelerini elektrik akımının etkisi ile küçük olan bu proteinin membran porlarından geçmiş olabileceğine bağlamıştır. Yaptığımız çalışmada 68 kDa'nun 20 koyun serumunun hepsinde bulunması bu çalışma sonucu ile benzerlik göstermektedir.

Burgu ve ark. (4) kist hidatik sıvı antijeni kullanarak yaptıkları çalışmada, kist hidatik hastalığı için koyunlarda spesifik bantın 116 kDa, insanlarda ise, 68 ve 8 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da, insan kist hidatik hastalığı için spesifik olduğu bildirilen 68 ve 8 kDa'luk protein bantlarına koyunlarda rastlanmıştır.

Şaşmaz ve ark. (24), hidatidosisin teşhisinde antijen olarak protoskoleks, kist sıvısı ve çimlenme kapsülü kullanarak, bunlara ait spesifik bantları Western blot ile ortaya çıkarmışlar, ayrıca 8,20,45,57,68 kDa'luk antijenik determinantları cerrahi olarak hastalığı doğrulanmış hastaların kan serumu antikorları ile saptamışlardır. Bu çalışmada, koyun kist hi-

datik hastalığı için spesifik bulunan bantlardan 68 ve 8 kDa'luk bantlar Şaşmaz ve ark. (24)'nin çalışmasıyla benzerlik göstermektedir.

Diğer taraftan hidatidosisli hastalarda 12,16,20,37,38,48 kDa'luk bantlara karşı oluşan antikor yanıtın spesifik olduğunu bildiren araştırmalarda bulunmaktadır (5,6,7,19,21). Ancak, SDS-PAGE de proteinlerin ayrıştırılmasında aynı antijenle çalışılmasına rağmen farklı sonuçlar alınabilmekte, bu farklı sonuçların antijenin ekstraksiyonunda kullanılan metod farklılıklarının yanı sıra çalışmanın çeşitli aşamalarında kullanılan özellikle protein kesici ve jel polimerizasyonunda kullanılan kimyasalların kalite ve kantite farklılıklarından kaynaklanabileceğine işaret edilmektedir (13). Bizde bu görüşü paylaşmaktayız.

Sonuç olarak, kist hidatik protoskoleks antijeni kullanılarak Western blot metodu ile koyunlarda spesifik protein bantlarının araştırıldığı bu çalışmada, spesifik protein bantlarının 68, 24 ve 8 kDa büyüklüğündeki proteinlerin olduğu belirlenmiştir. Ancak, 68 kDa'luk bantın 10 negatif kontrol kan serumundan ikisinde görülmesi ve piyasadan hazır satın alınan non-enfekte koyun serumunda bu banta rastlanmaması, kanların alındığı koyunlarda mezbahe kontrollerinde gözden kaçmış çok küçük çaplı kistin varlığını akla getirdiği gibi, 68 kDa'luk proteinin %100 spesifik olmayıp kros reaksiyon vermesiyle ilgili olabilir. Ayrıca hem pozitif kontrol, hemde negatif kontrol koyunlarda görülen diğer 58,48 ve 38 kDa'luk bantların ise antijenik bir spesifitesinin olmadığı bu proteinlerin koyuna ait bünye proteinleri veya diğer bakteriyel, viral veya paraziter hastalıklara ait proteinler olabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

- Altıntaş N (1991) SDS-Polyacrylamide gel elektroforezi ile proteinlerin seperasyonu. T Parazitol Derg, 2, 119-129.
- Aykol F (1986) Tabii Enfekte Koyunlarda Kist Hidatid'in Counterimmuno-Elektroforesis (CIEP) ve Çift Diffüzyon Testlerle Karşılaştırmalı Teşhisi. Doktora Tezi. Ankara Üniv Sağlık Bilim Enst.
- Bariş İ, Şahin A, Bilir N, Kalyoncu AF, Emri AS, Akhan O, Barış B, Çopur AS, Selçuk ZT (1989) Hidatik Kist Hastalığı ve Türkiye'deki Konumu. Türkiye Akciğer Hastalıkları Vakfı Yayını No:1, Ankara.
- Burgu A, Doğanay A, Gönenç B, Sarımeahmetoğlu HO, Kalınbacak F (2000) The analysis of hydatid cysts from sheep by using SDS-PAGE method, and the determination of specific antigens in protein structure by using Western blot. (Baskıda, Tr J Vet Anim Sci).
- Chamekh M, Facon B, Dissous C, Haque A, Capron A (1990) Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. J Immunol Methods, 134, 129-137.
- Facon B, Chamekh M, Dissous C, Capron A (1991) Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. Mol Biochem Parasitol, 45, 233-240.
- Fadwa MA, Knobloch J (1989) Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. Mol Biochem Parasitol, 37, 101-108.
- Genç S (1976) İnsan hidatidosisin tanısında pasif hemaglutinasyon ve Weinberg reaksiyonlarının değeri. Mikrobiyol. Bült, 10, 215-231.
- Güralp N (1981) *Helmintoloji*. Ankara Üniv Vet Fak Yayın, 368. İkinci baskı.
- Heath DD, Lawrence SB, (1996) Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. Parasite Immunol, 18, 347-357.
- Hira PR, Hahr GM, Shweiki HM, Behbehani K (1990) An enzyme-linked immunosorbent assay using an arc 5 antigen for the diagnosis of cystic hidatid disease. Ann Trop Med Parasitol, 2, 157-162.
- Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IMS, Kamboj MS, Mehta SK, Vınayak VK (1992) Specific antibodies in serum of patients with hidatidosis recognised by immunoblotting. J Med Microbiol, 36, 46-51.
- Köksal F, Serin MS, Kekeç Y, Sadr YE (1995) İnsan ve hayvan kökenli kist hidatik sıvılarının SDS-PAGE metoduyla analizi ve Westernblot metodunun klinik önemi. T Parazitol Derg, 19, 221-229.
- Leggatt GR, McManus DP (1994) Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hidatid disease) cyst fluid. Parasite Immunol, 16, 87-96.
- Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang V (1989) A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. Am J Med Hyg, 40, 377-383.
- March F, Enrich C, Mercader M, Sanchez F, Munoz C, Coll P, Prats G (1991) *Echinococcus gra-*

- nulosus*: Antigen characterization by chemical treatment and enzymatic deglycosylation. *Exp Parasitol*, **73**, 433-439.
17. **Morris DL, Richards KS** (1992) *Hydatid Disease*. Butterworth-Heinemann Ltd. Linacre House, Jordan Hill. Oxford OX2 8DP.
18. **Njeruh FM, Okela GBA, Gathuma JM** (1989) Usefulness of indirect haemagglutination (IHA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of human hydatidosis. *E Afr Med J*, **66**, 310-314.
19. **Profumo E, Ortana E, Rignano R, Gioia I, Nottarigiacomo S, Ioppolo S, Siracusano A** (1994) Cellular and humoral responses to antigenic subunits of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol*, **16**, 393-398.
20. **Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 15 section, p. 18.47-18.76. Cold. Spring Harbor, New York.
21. **Sanchez F, March F, Mercader M, Coll P, Munoz C, Prats G** (1991) Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscolices and cyst of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunol*, **13**, 583-592.
22. **Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG** (1987) Westernblott analysis of the antigens of *T. gondii* recognized by human IgM antibodies. *J Immunol*, **131**, 977-978.
23. **Su X, Prestwood AK** (1991) Dot Elisa mimicry westernblott test for the detection of swine trichinellosis. *J Parasitol*, **77**, 76-82.
24. **Şaşmaz E, Hashempoor GR, Bahiar İH, Yuluğ N** (1995) *Echinococcus granulosus*'un karşılaştırmalı antijenik analizi. *T Parazitoloj Derg*, **19**, 83-87.
25. **Şenlik B** (1998) *Bursa Yöresi Koyunlarında İndirekt Floresan Antikor (IFA) ve İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) Testleriyle Hidatidoz'un Sero-Prevalansı Üzerine Araştırmalar*. Doktora Tezi. Uludağ Üniv Sağlık Bilim Enst.
26. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350.
27. **Yalçıntaş İ, Çolakoğlu S** (1973) Kist hidatik teşhisinde indirekt hemaglutinasyon testinin değeri. *Çukurova Üniv Tıp Fak Derg*, **3**, 152-155.
28. **Yazıcıoğlu A, Dinçer H** (1971) Kist hidatik ve Weinberg reaksiyonu. *Mikrobiyol Bült*, **5**, 273-281.

Yazışma adresi

Prof. Dr. Ahmet Doğanay
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Helmintoloji Bilim Dalı
06110 Dışkapı-Ankara