

FASCIÖLOSİSLİ HASTALARDA İMMÜNOGLOBULİN TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF IMMUNOGLOBULIN ISOTYPES IN PATIENTS WITH FASCIÖLOSIS

Mustafa DEMİRCİ¹, Tutku TAŞKINOĞLU TANYEL², Selçuk KAYA¹

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.
(demirci@med.sdu.edu.tr)

² Düzen Laboratuvarlar Grubu, Ankara.

ÖZET

İnsan fasciolosis olgularında, hastalığın süresi ile hümmoral immün yanıtın gelişimi arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, fasciolosisli hastalarda farklı immünnoglobulin izotiplerinin hastalığın süresi ile ilişkisinin araştırılması ve tanısal değerinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan 50 hasta (30 kadın, 20 erkek; yaş aralığı: 18-70 yıl), karın ağrısı, ateş, eozinofili, dışkıda yumurta saptanması ve radyolojik bulguların varlığı gibi belirti ve bulguların süresine göre 3-6 ay (1. grup), 7-12 ay (2. grup) ve ≥ 13 ay (3. grup) olmak üzere 3 gruba ayrılarak özgül IgG, IgM, IgA ve IgE pozitifliği açısından değerlendirilmiştir. İmmünnoglobulin tiplerinin araştırılmasında, *Fasciola hepatica* erişkinlerinden elde edilen ekskretuar-sekretuar (ES) antijenler ile hazırlanan "in-house" ELISA yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızda toplam pozitiflik oranları; IgG için %100, IgM için %50, IgA için %62 ve IgE için %42 olarak saptanmıştır. Birinci çalışma grubunda IgM, IgA ve IgE pozitifliği sırasıyla %90, %72 ve %54; 2. grupta ise sırasıyla %35, %35 ve %21 olarak bulunurken, 3. grupta hiç IgM pozitifliği saptanmamış, IgA pozitifliği %50, IgE pozitifliği ise %42 olarak belirlenmiştir. Bulgularımız, hastalığın erken döneminde yüksek oranda (%90) saptanan IgM antikorlarının giderek azaldığını (%35) ve ileri dönemdeki olgularda kaybolduğunu göstermiş; ancak IgA ve IgE düzeylerinde hastalık süresiyle ilişkili bir değişim gözlenmemiştir. Sonuç olarak, özgül IgM tespiti hastalığın akut-kronik döneminin ayırımında yararlı olabileceği düşünülmüş, buna karşın özgül IgA ve IgE tespiti tanısal amaçlı kullanımı konusunda daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Fasciolosis, serolojik tanı, IgG, IgM, IgE, IgA.

ABSTRACT

The relation between the duration of human fasciolosis and development of humoral immune response has not yet been clarified. This study was conducted to investigate the relation between different immunoglobulin isotypes and the period of disease in fasciolosis patients and also to evaluate the diagnostic value of immunoglobulin isotypes. The 50 patients (30 female, 20 male; age range:

* Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 03-TU-690 numaralı proje ile desteklenmiştir.

18-70 years) included to the study were evaluated in 3 groups (3-6 months, 7-12 months and > 12 months) according to the duration of their signs and symptoms such as abdominal pain, fever, eosinophilia, detection of eggs in stool and radiological findings. An in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on *Fasciola hepatica* excretory-secretory (ES) antigens was used for the determination of anti-*F.hepatica* specific IgG, IgM, IgA, IgE antibodies. The positivity rates were 100% for IgG, 50% for IgM, 62% for IgA and 42% for IgE. When the relation between disease period and immunoglobulin classes were evaluated, it was observed that in the 3-6 months period, patients IgM, IgA and IgE levels were; 90%, 72% and 54%, respectively; in the 7-12 months period patients IgM, IgA and IgE levels were 35%, 35% and 21%, respectively, in the > 12 months period patients IgA and IgE levels were 50% and 42%, respectively however, no positive IgM level were detected. In conclusion our data indicated that the specific IgM positivity rate was high (90%) in early stage in fasciolosis, gradually decreased (35%) and became negative in late stages of infection. However, IgA and IgE levels revealed no specific relation to the disease period. Specific IgM determination seems to be useful for the differentiation between acute and chronic period of fasciolosis. Further studies are necessary to prove the diagnostic value of specific IgA and IgE antibodies in setting of fasciolosis.

Key words: Fasciolosis, serological diagnosis, IgG, IgM, IgE, IgA.

GİRİŞ

Fasciola hepatica'nın neden olduğu fasciolosis insanlara metaserkarya ile kontamine suların içilmesi veya su bitkilerinin yenmesi ile bulaşmaktadır. Son tahminlere göre dünyada 2.4 milyon olan hasta sayısının, tahmin edilenin çok daha üstünde olabileceği düşünülmektedir^{1,2}. Parazitin karaciğer parankimi içindeki göçü temel patolojik değişikliklerden sorumlu olmakla birlikte, immünolojik ve inflamatuvar yanıtın da patogeneizde rolü büyüktür³⁻⁴.

Fasciolosis tanısında, dışkıda parazit yumurtasının bulunması ve radyolojik olarak erişkin formunun tespiti ve/veya patolojik değişikliklerin saptanması dışında, serolojik testler de önemli bir yer tutmaktadır. Serolojik tanı için indirekt hemaglutinasyon, immünofloresans, Western blotting gibi yöntemler kullanılmakla birlikte sıkça kullanılan yöntem *F.hepatica* ekskretuar-sekretuar (ES) antijenine karşı IgG varlığının ELISA yöntemi ile araştırılmasıdır⁵⁻⁷. *F.hepatica*'nın ES ürünlerinin (Sistein proteaz (katepsin L ve katepsin B), CuZn süperoksit dismutaz, enolaz, glutatyon S-transferaz, lösin aminopeptidaz, tiyore-doksin peroksidaz vb.) immünojenik ve parazite özgü olması, serolojik yöntemlerin oldukça özgül ve duyarlı olmasını sağlamaktadır^{8,9}. Fasciolosis tanısında ES-ELISA IgG testinin duyarlılığı %93-100, özgüllüğü ise %95-100 gibi yüksek oranlarda bildirilmektedir⁵⁻¹⁰.

İnsanlarda fasciolosis sırasında gelişen IgG dışındaki antikorların tanıda kullanılıp kullanılamayacağı ve immün yanıtın gelişimi açısından antikor sınıflarının saptanması ve izlenmesi önemlidir. *F.hepatica* ile enfekte hastalarda IgM, IgA ve IgE düzeylerinin tanısal değeri ve hastalık süresince düzeylerinin değişimi konusunda hayvan çalışmaları bulunmasına karşın insan verileri sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, fasciolosisli hastalarda immünoglobulin tiplerinin hastalık süresiyle bağlantılı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Parazitoloji Laboratuvarına başvuran ve izlemleri yapılan fasciolosisli 50 hasta (30 kadın, 20 erkek; yaş aralığı: 18-70 yıl) dahil edildi. Tümü *F.hepatica* IgG pozitif olan hastaların tanısı dışkıda yumurta varlığı ve/veya radyolojik bulgular ile koyulmuştu. Hastalar karın ağrısı, ateş ve eozinofili triadından 3'ü veya 2'sinin ilk saptanma tarihine göre 3 grupta değerlendirildi. İmmünoglobulin sınıflarının araştırılması için, tüm olgulardan 5 ml venöz kan alınarak, serum örnekleri ayrıldı ve çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı.

Serolojik yöntemler, Özkan ve arkadaşları¹⁰ ile Carnevale ve arkadaşları⁷ kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulandı. Kısaca, koyun karaciğerinden elde edilen *F.hepatica* erişkinleri 3 kez 0.01 M PBS (phosphate-buffered saline) ile yıkandı. İçerisinde proteaz inhibitörü olarak 0.8 mol/l fenilmetilsülfonil florid, 400 U/ml aprotinin ve 0.1 mM di-tiotreitol (Sigma Chemicals, ABD) bulunan (1 erişkin/5 ml) PBS solüsyonu içinde 37°C'de 3 saat bekletildi. Buradan alınan ve içinde *F.hepatica* ES antijenleri bulunan süspansiyon 4°C'de 2 saat santrifüj (13.000 g) edildi. Üstteki süspansiyon 0.2 µm por çaplı filtreden geçirildi ve ES antijeni olarak kullanıldı. ES antijeni 12.8 µg/ml yoğunlukta ELISA pleytlerine (Nunc-MaxiSorp Immunoplate, Danimarka) kaplandı. Pozitif ve negatif kontrol serumlar ve test edilecek serum örnekleri IgG için 1/100, IgA için 1/40, IgM için 1/40 ve IgE için 1/20 oranında kazein buffer ile sulandırıldı ve çift kuyucuk olarak çalışıldı. Konjugat sulandırımı (alkaline phosphatase conjugate, Sigma Immunochemicals) yapılan denemeler sonunda IgE için 1/500, IgG için 1/12.000, IgM için 1/10.000 ve IgA için 1/12.000 olarak belirlendi. Substrat olarak, 4-nitrofenil fosfat disodyum tuzu (pnPP; Fluka) 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Antijen, serum ve konjugat titrasyonu her immünoglobulin izotipi için ayrı ayrı denendi (chequerboard titration) ve en uygun sulandırımalar seçilerek uygulandı. ELISA pleytleri (Bio-Tek Instruments, Ultramicroplate Reader ELX 808, ABD) okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutuldu. Negatif serumların ortalamasının 3 standart sapma üstü pozitif olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, hastaların hepsinde (%100) IgG pozitif, %50'sinde IgM pozitif, %62'sinde IgA pozitif ve %42'sinde IgE pozitif olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların 22'sinde hastalığın belirti ve bulgularının başlangıç süresinin 3-6 ay (1. grup), 14'ünde 7 ay-1 yıl (2. grup) ve 14'ünde de 1 yıldan fazla (3. grup) olduğu tespit edilmiştir. Birinci grupta IgM, IgA ve IgE pozitifliği sırasıyla %90, %72 ve %54; 2. grupta ise sırasıyla %35, %35 ve %21 olarak bulunurken, 3. grupta hiç IgM pozitifliği saptanmamış, IgA pozitifliği %50, IgE pozitifliği ise %42 olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Fasciolosis kliniğinin özgül olmayan bulgular içermesi tanıdaki zorluklardan birisidir. Klasik hastalık triadı olarak bilinen karın ağrısı, ateş ve eozinofili hastalarda değişkenlik gösterebilmektedir. Bunların dışında hastalarda ürtiker, kilo kaybı ve akciğer belirti ve bulguları da sıklıkla bildirilmiştir^{4,11,12}. Özgül IgG tespiti tanıda oldukça duyarlı sonuçlar

vermesine rağmen akut ve kronik olguların ayırımını yapamamaktadır. Hastalığın tanısında ve döneminin belirlenmesinde, diğer immünoglobulin tiplerinin kullanıp kullanılmayacağı tartışmalıdır. Karın ağrısı ve ateş gibi akut dönem semptomlarının olduğu hastalarda IgM, IgG ve IgE düzeylerinin yüksek olduğu vurgulanmaktadır^{4,13}. Bizim çalışmamızın temelini oluşturan Özkan ve arkadaşlarının¹⁰ çalışmasında, ES-ELISA yöntemi ile fasciolosisli olguların tümünde pozitiflik saptanmış, ELISA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %95.3 olarak bildirilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da, klinik bulguları olan hastalarda ES-ELISA testinin uygulanmasının tanı zorluklarını ortadan kaldıracığı ifade edilmektedir^{7,14}.

Enfeksiyon sırasında ilk 1 yılda IgG antikorlarının pozitif olduğu ve IgM antikorlarının ona eşlik ettiği görülmektedir. Genellikle fasciolosis semptomlarının ortaya çıktığı dönemlerde, ayırıcı tanısının öncelikle düşünülmemiş olması nedeniyle hastaların çoğu akut dönem geçtikten sonra tespit edilebilmektedir^{4,12}. Bu nedenle IgG'nin negatif, IgM'nin pozitif olduğu başlangıç evresine rastlanması zor olmaktadır. Bu çalışmada IgM yanıtının süre ile ilişkisinin değerlendirilmesi sonucunda, 3-6 aylık akut dönemde yüksek IgM pozitiflik oranı (%90) saptanmış, hatta 7 ay-1 yıl döneminde de pozitif olgular (%35) görülmüştür. Hastalık bulgularının 1 yıldan uzun süre (2-7 yıl) devam ettiği hastalarda ise IgM pozitifliği gözlenmemiştir. Buna karşın, parazit yumurtasının saptandığı hastalarda da IgM pozitifliği mevcut değildir. Osman ve arkadaşları¹⁵, insan akut fasciolosis enfeksiyonlarında "erişkin antijeni fraksiyon-I" kullanıldığı ELISA-IgM testinin duyarlılığını %80, özgüllüğünü %100 olarak bildirmişlerdir. Bütün bunlar değerlendirildiğinde özgül IgM saptanması hastalığın akut veya kronik olduğunun ayırımının yapılmasında yardımcı olabilir, ancak bu konuda daha fazla insan çalışmasına gereksinim vardır.

Sheldrake ve arkadaşları¹⁶, *F. hepatica* ile enfekte olan ve safra kesesi hastalığı olan koyunlarda normal koyunlara göre işaretli IgA'nın safra yollarına atılımının azaldığını bulmuşlardır. Buna karşın fasciolosisli hastalarda IgA düzeylerinin genellikle normal olduğunu bildiren çalışmalar da vardır⁹. Bizim çalışmamızda IgA düzeyleri özellikle safra yollarında patolojik radyolojik bulguları olan hastalarda yüksek bulunmuştur. Parazit antijenleri vücut boşluklarına salındığı zaman IgA yanıtını tetikleyebilir. Bu yüzden safra yollarında patoloji saptanan hastalarda artmış IgA yanıtı saptanmış olabilir. Bu çalışmada yumurta bulunan ya da karın ağrısı olan hastalarda IgA düzeylerinde bir fark gözlenmemiştir. Hastalarda yumurta saptanmasını etkileyen birçok faktör vardır. Bu nedenle yumurta saptanması veya saptanmaması kesin yargıya varmak için iyi bir belirleyici olmayabilir.

IgE yanıtı, helmint enfeksiyonlarına karşı temel konak savunmasını oluşturmaktadır. Ratlarda yapılan bir çalışmada, fasciolosiste IgE düzeylerinin bifazik olduğu ve 4 ve 8 haftalarda yükseldiği bildirilmiştir¹⁷. Chen ve arkadaşları¹⁸ da, karaciğer patolojisi olan fasciolosisli hastalarda IgE pozitifliğini %48 olarak bulmuşlardır. Sampaio Silva ve arkadaşları⁹, total ve özgül IgE düzeylerini %76 ve %48 olarak rapor etmişler; eozinofilisi olan ve parazit yumurtasının görüldüğü hastalarda IgE düzeylerinin doğru orantılı olarak yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda IgE pozitifliği akut dönemde %54, ileri dönemde %42 olarak saptanırken, eozinofilisi olan hastalarda olmayanlara oranla daha yüksek IgE düzeyleri gözlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, erken dönemde yüksek oranda tespit edilen IgM antikorlarının hastalığın süresi ile ilişkili olarak azalma göstermesinin akut-kronik dönem ayrımında yararlı olabileceği düşünülmüş, ancak IgA ve IgE düzeylerinde hastalık süresiyle ilişkili bir değişim gözlenmemiştir. *F.hepatica* IgM, IgA ve IgE düzeylerinin hastalığın tanı ve takibinde kullanımı ile ilişkili olarak daha geniş ve özgül antijenlerin kullanıldığı ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Korkmaz M. Fasciolosis: dünü, bugünü, yarını, s: 1-8. 11. Ulusal Parazitoloji Kongresi Kitabı. 1999, İzmir.
2. Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull World Health Organ 1999; 77: 340-6.
3. Kaya S, Demirci M, Demirel R, Aridogan BC, Ozturk M, Korkmaz M. Seroprevalence of fasciolosis and the difference of fasciolosis between rural area and city center in Isparta, Turkey. Saudi Med J 2006; 27: 1152-6.
4. Arjona R, Riancho JA, Aguado JM, Salesa R, Gonzalez-Macias J. Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the diseases. Medicine 1995; 74: 13-23.
5. Arafa MS, Abaza SM, El-Shewy KA, Mohareb EW, El-Moamly AA. Detection of *Fasciola*-specific excretory/secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of early fascioliasis using different diagnostic techniques. J Egypt Soc Parasitol 1999; 29: 911-26.
6. Abdul-Fattah MM, Yousef SM, Nasr ME, Fouad MA, Abdul-Wahab EA. Indirect fluorescent antibody test in diagnosis of acute fasciolitic syndrome. J Egypt Soc Parasitol 1992; 22: 261-4.
7. Carnevale S, Rodriguez MI, Santillán G, et al. Immunodiagnosis of human fascioliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a micro-ELISA. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 174 -7.
8. Marcilla A, De la Rubia JE, Sotillo J, et al. Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. Clin Vaccine Immunol 2008; 15: 95-100.
9. Sampaio Silva ML, Da Costa JM, Da Costa AM, et al. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. Am J Trop Med Hyg 1996; 54: 146-8.
10. Özkan AT, Korkmaz M, Kuman A, Ayçiçek H, Tanyüksel M. Fascioliasis tanısında erişkin antijeni ile PBS ve RPMI 1640'da elde edilen eksresyon/sekresyon antijenlerinin ELISA yöntemiyle karşılaştırılması. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg 2005; 62: 17-26.
11. Demirci M, Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Korkmaz M. Eosinophil cationic protein in patients with fascioliasis: its probable effects on symptoms and signs. Scand J Infect Dis 2006; 38: 346-9.
12. Demirci M, Korkmaz M, Kaya S, Kuman A. Fascioliasis in eosinophilic patients in the Isparta region of Turkey. Infection 2003; 31: 15-8.
13. El-Shabrawi M, El-Karakasy H, Okasha S, El-Hennawy. Human fascioliasis: clinical features and diagnostic difficulties in Egyptian children. J Trop Pediatr 1997; 43: 162-6.
14. Demirci M, Korkmaz M, Sakru N, Kaya S, Kuman A. Diagnostic importance of serological methods and eosinophilia in tissue parasites. J Health Popul Nutr 2002; 20: 352-5.
15. Osman MM, Zaki A, Abu Samra L, Farag HF, Youssef MM. Evaluation of *Fasciola* somatic antigenic fractions in the diagnosis of human fascioliasis. J Egypt Soc Parasitol 1992; 22: 27-35.
16. Sheldrake RF, Husband AJ, Watson DL. Transport of serum IgA into bile of sheep infected with *Fasciola hepatica*. Vet Immunol Immunopathol 1988; 18: 29-39.
17. Pfister K, Turner K, Currie A, Hall E, Jarrett EE. IgE production in rat fascioliasis. Parasite Immunol 1983; 5: 587-93.
18. Chen MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica*: a review of recent literature. Tropical Disease Bulletin (Suppl) 87: R2-R38.