

## **Antraksın Hızlı Tanısına Yönelik İmmunohistokimyasal Araştırmalar <sup>1</sup>**

Recai TUNCA\*

Mahmut SÖZMEN\*

Serpil DAĞ ERGİNSOY \*

Enver BEYTUT\*

Mithat ŞAHİN\*\*

Salih OTLU\*\*

Özgür ÇELEBİ\*\*

<sup>1</sup> Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2006-VF 013).

\* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/17-A

### **Özet**

Antraks şüpheli, 26 sığır ve bir koyun olmak üzere toplam 27 olguda, karaciğer ve dalaktan hazırlanan sürme frotiler immunoperoksidaz metodu ile incelendi. Bu frotiler aynı zamanda mikrobiyolojik olarak da incelendi ve doku örneklerinden mikrobiyolojik kültürler hazırlandı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Hastalığın tanısında immunoperoksidaz ve kültür sonuçları birbiri ile uyumlu bulundu. Ayrıca immunoperoksidaz metodu uygulanan frotilerde makrofajlarda da pozitif reaksiyona rastlandı. Sürme frotilerde immunoperoksidaz metodunun hastalığın tanısında kullanılabileceği ancak hastalık tanısında bu yöntemin güvenilirliğinin araştırılması amacıyla daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar sözcükler:** Antraks, *Bacillus anthracis*, hızlı tanı, immunoperoksidaz.

### **Immunohistochemical Investigations for the Rapid Diagnosis of the Anthrax**

#### **Summary**

A total of 27 anthrax suspected cases, 26 cattle and one sheep, were investigated. Frotis taken from liver and spleen stained with immunoperoxidase staining method. These frotis were also investigated microbiologically. Microbiological cultures were also prepared from tissue samples. Both results, microbiological culture and immunoperoxidase, were compared. Concordant results were obtained in both of the methods. Furthermore, positive reaction was present in immunoperoxidase stained frotis. Positive reaction in the macrophages was also present. These results showed that immunoperoxidase staining method could be used efficiently for the rapid diagnosis of the anthrax. However, it requires further detailed research for the determination of the efficiency of the method.

**Keywords:** Anthrax, *Bacillus anthracis*, immunoperoxidase, rapid diagnosis.

---

#### **İletişim (Correspondence)**

Phone: +90 474 2426800/1202

e-mail: rtunca26@hotmail.com

## GİRİŞ

Antraks, *Bacillus anthracis*'in yol açtığı zoonotik bir hastalıktır<sup>1,2</sup>. *Bacillus anthracis* çomak şekilli spor oluşturan bir bakteridir<sup>3,4</sup>. Hastalık genellikle septisemik seyirlidir ve hastalığın bir sürüdeki ilk göstergesi ani ölümlerin varlığıdır. Hastalık bulguları gösteren hayvanlar çoğunlukla birkaç saat içinde ölür<sup>1,5,8</sup>. Tüm hayvanlar hastalığa değişen oranda duyarlı olmakla beraber çoğunlukla otçulların bir hastalığıdır, yırtıcı kuşlar ve sürüngenler ise dirençlidir<sup>6,9</sup>.

Antraks hastalığının tanı protokolünde Giemsa ve Gram boyama yöntemleri ilk aşamayı oluşturmaktadır<sup>3,4</sup>. Ancak, kokuşmanın etkisiyle fazlaca ortaya çıkan antrakoidler tanıyı güçleştirmekte ya da imkansız hale getirebilmektedir<sup>3,5</sup>. İç organlardaki tüm basiller 48 saat içerisinde kokuşmayla yıkımlanmaktadır<sup>1,3</sup>. Hastalığın hızla ölüme yol açması sebebiyle antraks şüpheli hayvanlar genellikle evde kesilmekte ve patolojik incelemelerin bu hayvanlardan getirilen iç organlardan yapılması gerekmektedir. Buna karşın iç organlardan hazırlanan sürme preparatlarda hastalığın hızlı tanısı oldukça güç, çoğu zaman da mümkün olmamaktadır. Bu tür olgularda mikrobiyolojik ekim sonuçları beklenmektedir. Mikrobiyolojik kültürün geç sonuç vermesi ya da kontaminasyonun primer etkenin izolasyonunu zorlaştırması nedeniyle olası bir antraks durumunda alınması gereken tedbirler konusunda çok geç kalınmış olmaktadır. Ayrıca, iç organlarda kokuşmanın etkisiyle vejetatif formdaki etkenler ölmekte, bu da mikrobiyolojik yönden hatalı negatif olarak değerlendirilmektedir<sup>3,10</sup>.

Çalışmada, bölgemizde oldukça sık görüldüğü bildirilen<sup>6,8</sup> antraksın tanısının sürme frotilerde immunohistokimyasal olarak daha hızlı ve daha güvenilir bir şekilde yapılıp yapılamayacağını araştırılması ve hastalığın tanısında alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışma materyalini, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dallarına, 2002-2006 yılları arasında getirilen antraks şüpheli 26 adet sığır ve bir adet koyuna ait iç organlar oluşturdu. Immunohistokimyasal incelemeler için sürme frotiler karaciğer ve dalaktan alınan doku kazıntılarından hazırlandı. Mikrobiyolojik incelemeler için sürme frotilerin yanı sıra doku örnekleri de alındı. Avidin-biotin peroksidaz metodu immuno-

histokimyasal yöntem olarak kullanıldı. Immunohistokimyasal boyamalar için hazırlanan frotiler alkol ile fikse edildi. Daha sonra rehidrasyona tabi tutuldu ve endojen peroksid aktivitesi hidrojen peroksit'in distile sudaki %3.5'lük çözeltisinde 20 dakika bekletilerek durduruldu. Ardından, antijenik sitelerin açığa çıkması amacı ile, frotiler sitrat buffer solusyonuna alınarak (pH 6) mikrodalga fırında 600 watt'da 20 dakika süre ile işleme tabi tutuldu. Frotiler, PBS ile üç defa yıkandıktan sonra, %5'lik keçi serumunda 30 dakika süreyle inkube edildi. Ardından, PBS'de 1/100 oranında sulandırılmış rabbit anti *Bacillus anthracis* poliklonal antikoları ile bir saat süre ile oda ısısında inkube edildi. Bu aşamada negatif kontrol amacıyla birer örnek de yalnızca 1/100 oranında sulandırılmış normal tavşan serumu ile muamele edildi. PBS ile üç defa yıkanan dokular biotinlenmiş goat anti rabbit immunoglobuni (1/300) ile 60 dakika oda ısısında bekletildi. PBS ile yıkama işlemini takiben peroksidaz bağlanmış streptavidin (1/300) ile 30 dakika süreyle inkube edildi. Renk ortaya çıkarıcı substrat olarak, fosfatlı buffer solusyonunda %0.035 oranında hazırlanmış 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solusyonu frotilere 3 dakika süreyle uygulandı. Frotiler, Haematoxylin ile 5 saniye süre ile boyandı ve 5 dakika süreyle suda yıkandı. Alkol ksilol serilerinden geçirilen dokular kaplanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Pozitif kontrol amacıyla mikrobiyolojik ekimler sonucunda pozitif olduğu kesinleşen dokulardan hazırlanan frotiler ile mikrobiyolojik kültürlerden hazırlanan sürme frotiler aynı işlemlere tabi tutularak değerlendirildi.

Mikrobiyolojik olarak, şüpheli örneklerden öncelikle frotiler hazırlanarak Giemsa ve Gram boyama yöntemleri ile boyandı. Daha sonra, koyun kanı (%7) katılan agar (SBA)'a ekimleri yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bu kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyandı. Bu aşamadan sonra örneklerle hareket ve penisiline duyarlılık testleri uygulandı.

Çalışma sonunda enfekte materyal yakılarak imha edildi. Kontamine materyaller bir atmosfer basınç altında, 121°C otoklavda 15 dakika bekletilerek sterilize edildi.

## BULGULAR

Çalışma materyalini oluşturan antraks şüpheli örneklerin mikrobiyolojik ve immunohistokimyasal in-

celemeleri sonucu elde edilen bulgular Tablo 1'de ayrıntılı olarak gösterildi.

Mikrobiyolojik olarak dokulardan hazırlanan frotiler Giemsa boyama yöntemi ile incelendi. 27 olgunun 10'unda etrafında ince bir hat şeklinde kırmızı renkli kapsül bulunan basiller görüldü (Şekil 1a). Gram boyamada ise 2-8 hücreden oluşan kısa zincirler şeklinde, 1-2 x 4-7 mikrometre ebatlarında, kenarları küt, Gram pozitif çomaklar dikkati çekti.

İmmunoperoksidaz metodu uygulanan frotilerin 10'unda 1-6 adet hücreden oluşan, çomak şeklindeki etkenlerin pozitif reaksiyon gösterdikleri dikkati çekti (Şekil 1b). Etkenlerin özellikle dalaktan hazırlanan frotilerde daha yoğun olduğu görüldü. Etkenlerin iç kısmında daha yoğun bir reaksiyon görüldü. Etkenlerin etrafında, çoğunlukla parlak, herhangi bir boyanma göstermeyen, ince hat halinde bir kapsül dikkati çekti. Frotilerde bulunan makrofajların bir kısmında kahverengi ve küçük granüller halinde pozitif reaksiyon görüldü.

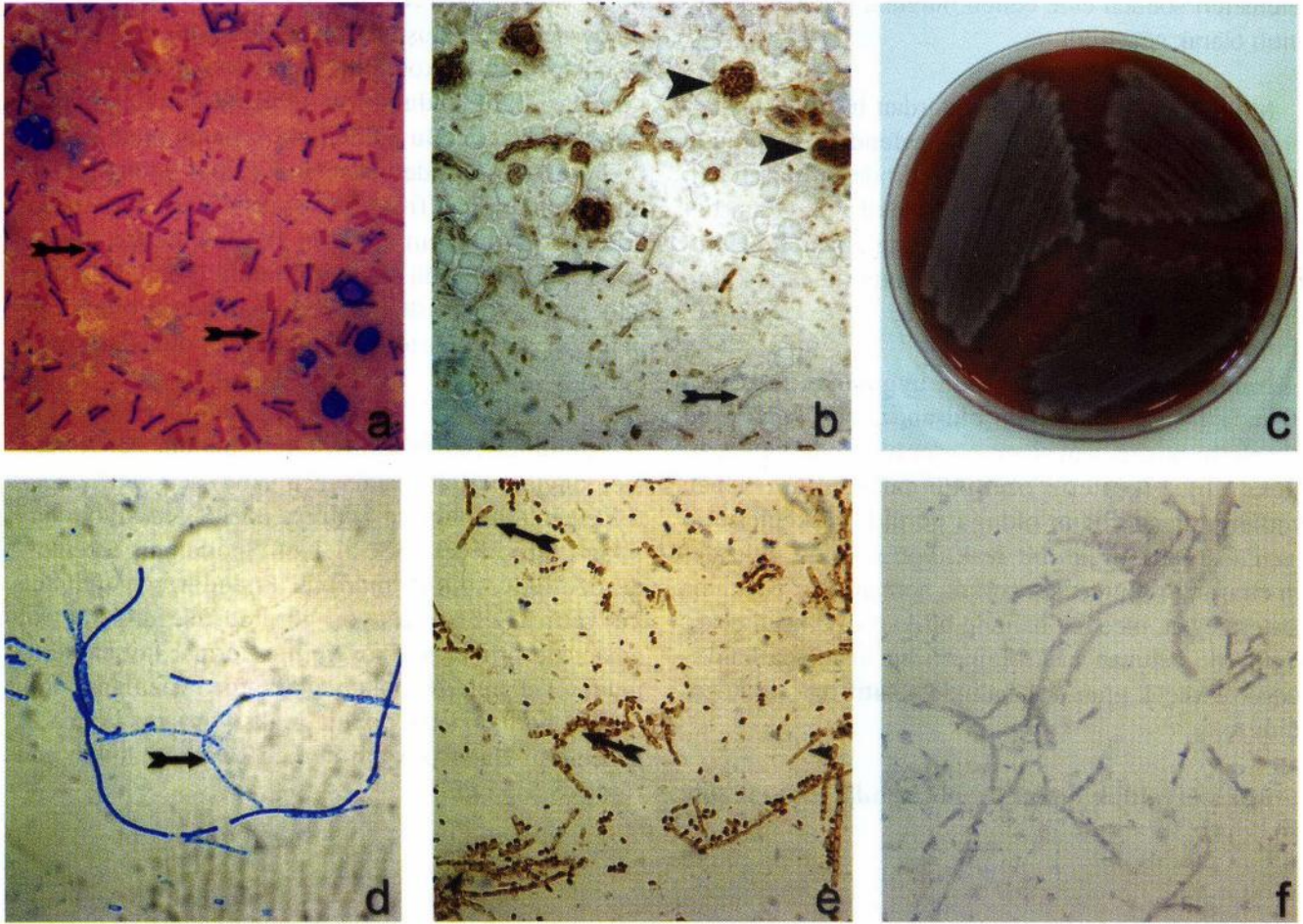
Mikrobiyolojik olarak, kanlı agarda, 24 saat süre

ile 37°C'de inkübe edilen örneklerin 2-5 milimetre çapında koloniler oluşturduğu görüldü. Düz ya da hafif dışbükey olan bu koloniler, buzlu cam görünümünde, kenarları hafif ondulasyon gösteren daireler şeklindeydi (Şekil 1 c). Bu kolonilerin kenarlarından çoğunlukla virgül şeklinde uzantıların çıktığı görüldü. Kültürden hazırlanan frotilere yapılan Gram boyamada, Gram pozitif, uzun saç gibi filamentöz ve santral sporlu, kenarları küt basiller görüldü (Şekil 1 d). Yarı katı besi yerinde ise etkenlerin hareketsiz olduğu ve penisilin duyarlılık testinde de duyarlı oldukları tespit edildi.

Kültürden hazırlanan frotilerin immunoperoksidaz metoduyla incelenmesi sonucu uzun saç gibi filamentöz etkenlerin oldukça belirgin pozitif reaksiyon verdikleri dikkati çekti (Şekil 1 e). Sporlanmış etkenlerde özellikle sporun marjinal kısımlarında oldukça kuvvetli pozitif reaksiyon görüldü. Negatif kontrol amacı ile primer antikor yerine normal tavşan serumunun kullanıldığı, doku ve kültürden hazırlanan frotilerde herhangi bir pozitif reaksiyona rastlanmadı. Etkenlerin Haematoxylin ile hafifçe boyandıkları görüldü (Şekil 1 f).

**Tablo 1.** Antraks şüpheli örneklerin mikrobiyolojik ve immunohistokimyasal inceleme sonuçları.  
**Table 1.** Immunohistochemical and microbiological results of the anthrax suspected cases.

Hayvan Türü	Menşei	Numune Sayısı	Mikrobiyoloji		İmmunoperoksidaz	
			Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Siğir	Akyaka-Büyükdurduran	1	1	-	1	-
Siğir	arpaçay-Tomarlı	1	1	-	1	-
Siğir	Kars-Karakale	1	1	-	1	-
Siğir	Kars-Cumhuriyet	1	1	-	1	-
Siğir	Kars-Esenyazı	2	1	1	1	1
Siğir	Diğor-Türkmeşen	1	-	1	-	1
Siğir	Kars Tuygun	2	1	1	1	1
Siğir	Ardahan-Çamlıca	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Alçılı	1	1	-	1	-
Siğir	Kars-Çakmak	1	-	1	-	1
Siğir	Yukarıdamla-Merkez	1	-	1	-	1
Siğir	Selim-Merkez	3	1	2	1	2
Siğir	Kars-Halefoğlu	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Ölçülü	1	1	-	1	-
Siğir	Arpaçay-Karakale	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Akdere	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Güdeli	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Derecik	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Merkez	1	-	1	-	1
Siğir	Kars-Kardeştepe	2	-	2	-	2
Siğir	Susuz-Porsuklu	1	-	1	-	1
Koyun	Akyaka-Merkez	1	1	-	1	-
<b>TOPLAM</b>	<b>22</b>	<b>27</b>	<b>10</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>17</b>



**Şekil 1. a-** Dalaktan hazırlanan frotide *Bacillus anthracis*'in (oklar) görünümü. Giemsa boyama, x650. **b-** Dalaktan hazırlanan frotide immunoperoksidaz pozitif *Bacillus anthracis* (oklar) etkenleri ve makrofajlarda (ok başı) granüler pozitif reaksiyon. ABC x650. **c-** *Bacillus anthracis*'in SBA'daki koloni morfolojisi. **d-** *Bacillus anthracis*'in SBA'da 24 saatlik kültüründen hazırlanan frotide saçak şeklindeki görünümü. Bazılarında santral sporlar (ok). Gram boyama x650. **e-** SBA'dan hazırlanan frotide *Bacillus anthracis*'in spor (oklar) ve vejetatif (ok başları) formları. ABC x650. **f-** SBA'dan hazırlanan ve primer antikor yerine normal tavşan serumu ile muamele edilen frotide immunoperoksidaz negatif etkenler. ABC x650.

**Figure 1. a-** *Bacillus anthracis* (arrows) in a smear prepared from spleen. Giemsa stain, x650. **b-** Immunoperoxidase positive reaction of *Bacillus anthracis* (arrows) and granular type positive reaction in the macrophages (arrow head). Spleen. ABC x650. **c-** Colony morphology type of *Bacillus anthracis* in the SBA. **d-** Eaves shaped appearance of *Bacillus anthracis* in the SBA culture after 24 hours. Central spores are present in some bacteria (arrow). Gram stain x650. **e-** Smear of *Bacillus anthracis* prepared from SBA culture. Spor (arrows) and vegetative forms (arrow heads) are visible. ABC x650. **f-** Smear of immunoperoxidase negative staining of the bacterium of which primer antibody was replaced by normal rabbit serum. ABC x650.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Antraks, Gram pozitif ve sporlu bir etken olan *Bacillus anthracis* tarafından oluşturulan, akut seyirli, septisemik bir hastalıktır<sup>1,3,10-12</sup>. Otçullar ve insanlar için oldukça patojen olan mikroorganizmaya bazı hayvan türleri dirençlidir<sup>9,12</sup>. Hastalıktan ölen hayvanlarda, vejetatif formda bulunan etkenler oksijenle temasta spor şeklini alırlar. Hastalığın son döneminde bütün doğal salgılarda ve patolojik eksudatlarda bol miktarda etken bulunur ve bu etkenler sporlanarak doğada yıllarca canlı kalabilir<sup>6,10</sup>. Sığır ve koyunlardaki enfeksiyonun kontamine su ve yem-

lerle şekillendiği kabul edilir<sup>2,5,8</sup>. Erken tanı, çevrenin hasta ve ölen hayvanlardan kaynaklanan kontaminasyonunun önüne geçilmesi bakımından hayati önem taşımakla beraber oldukça güçlüdür<sup>10</sup>. Hastalığın klinik bulguları pek çok septisemik hastalıkla benzerlik taşımaktadır. Marazi maddelerden hazırlanan frotiller Gram ve Giemsa boyama yöntemleri ile boyanarak incelenir<sup>3,4,10</sup>. Bu frotillerde, 1-5 etkenden oluşan, Gram pozitif (Gram boyama) ve kapsüllü (Giemsa), büyük çomakçıkların görülmesi hastalıktan şüphe ettirmek ile beraber kesin tanı için yeterli değildir<sup>5,10</sup>. Ayrıca, hızla çoğalan antrakoidler ve vejetatif formdaki etkenlerin kokuşmayla yıkımlan-

ması ayırıcı tanıyı imkansız hale getirebilmektedir<sup>4,10</sup>. Antraks şüpheli hayvanlar genellikle ölümlerin ani ortaya çıkması sebebiyle evde kesilmekte ve bu hayvanlardan getirilen iç organlardan patolojik incelemelerin yapılması istenmektedir. Fakat antraks şüpheli hayvanların organların patolojik incelenmesi sakıncalıdır. Mikrobiyolojik ekimlerin ise hızlı sonuç vermemesi olası bir antraks durumunda alınması gereken tedbirler konusunda geç kalınmasına neden olmaktadır. Antraksın serolojik tanısında etkenin toksinlerine spesifik mikrohemaglutinasyon testi kullanılmaktadır<sup>3,4</sup>. Ancak, bu testlerin yapılabilmesi oldukça zaman alıcı ve ancak belirli merkezlerde yapılabilmektedir. Çalışmada, karaciğer ve dalaktan hazırlanan frotilerin immunoperoksidaz metoduyla incelenmesi sonucu antraks basillerinin oldukça belirgin pozitif reaksiyon gösterdiği görüldü. Bu yöntemde, örnekler doku yürütmede olduğu gibi, rutin patolojik takipten geçirilmediği için zaman kaybı olmaksızın direkt tespit-rehidrasyon ve immunoperoksidaz sırası takip edilerek birkaç saat gibi oldukça kısa bir sürede yüksek güvenilirlikli bir tanıya ulaşmak mümkün olmaktadır.

Marazi maddelerden hazırlanan sürme frotilerde etkenlerin görülmemesi, antraksın klasik tanısının ilk basamağını oluşturan bakteriyoskopinin en önemli dezavantajlarından birisidir<sup>10</sup>. Buna karşın yapılan çalışmada dokulardan hazırlanan frotilerde, yalnızca etkenlerde değil aynı zamanda makrofajlardaki antijenik yapıların da pozitif reaksiyon gösterdiği görüldü. Bu durum, immunoperoksidaz metodunun, etkenlerin frotilerde bulunmaması halinde bile, hastalığın tanısında etkili olabileceğini göstermektedir. Çalışmada 27 adet antraks şüpheli hayvanın karaciğer ve dalağından hazırlanan sürme frotilerde immunohistokimyasal boyamalar yapılmış ve sonuç olarak bunların 10'unda pozitif reaksiyon görüldü. Bu verilerin ve bakteriyolojik kültür sonuçlarının paralellik taşıdığı görüldü. Bu verilerin ışığında antraksın hızlı tanısında immunohistokimyasal yöntemlerin de etkili olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Çalışmada, antraksın tanısının sürme frotilerde immunohistokimyasal olarak daha hızlı bir şekilde yapılabileceği sonucuna varılmakla beraber, ortaya çıkan verilerin güvenilirliğinin araştırılması amacı ile daha kapsamlı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

- 1 **Haziroğlu R, Milli ÜH:** Veteriner Patoloji . II cilt. 375-348, Medipres, 2001.
- 2 **Parlak M, Taştan R, Özkurt Z, Sağlam YS:** Şarbon'un epizootiyolojisi, epidemiyolojisi. Kuzey Anadolu Bölgesi'ne ait altı yıllık değerlendirme. Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 33, 8-10 Temmuz, Kars1999.
- 3 **Baron EJ, Finagold SM:** Diagnostic Microbiology. 8th ed. 251-257, MO: Mosby Year Book, St. Lois, 1986.
- 4 **Koneman EW:** Color atlas and text-book of diagnostic microbiology. 2nd ed. PA: JB Lippincott, Philadelphia, 1983.
- 5 **Akay Ö:** Anthrax'ın patogenezi, moleküler biyolojisi ve tanısı. Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 6, 8-10 Temmuz, Kars1999.
- 6 **Genç O, Aydın F:** Antraks sporlarının ekolojisi. Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 32, 8-10 Temmuz, Kars1999.
- 7 **Özcan K, Beytut E, Sözmen M, Dağ S:** Çiftlik hayvanlarında anaerob enfeksiyonlar ve anthrax . Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 36, 8-10 Temmuz, Kars1999.
- 8 **Şahin M, Aydın F:** Kars ilinde Şarbon'un epizootiyolojisi ve epidemiyolojisi 1993-1998 yıllarının değerlendirilmesi. Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 36, 8-10 Temmuz, Kars1999.
- 9 **Titball RW, Manchel RJ:** Factors affecting the germination of spores *Bacillus anthracis*. *J Appl Bacteriol*, 62,269-273,1987.
- 10 **Şhafazand S:** Inhalational Anthrax: Epidemiology, diagnosis, and management. *Chest*, 116, 1369-1376, 1999.
- 11 **İzgür M, İlhan Z:** *Bacillus anthracis*'in toksin ve plazmidleri. Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 31, 8-10 Temmuz, Kars1999.
- 12 **Leloğlu N:** Anthrax'ın epizootiyolojisi. Anaerob Enfeksiyonlar ve Antraks Sempozyumu. Özet Kitabı. 19, 8-10 Temmuz, Kars1999.