

# Trichinellosis Tanısında Western Blot Tekniğinin Uygulanması

Soykan ÖZKOÇ<sup>1</sup>, Songül BAYRAM DELİBAŞ<sup>1</sup>, Çiler AKISÜ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir

**ÖZET:** Trichinellosis, enkiste larvaları taşıyan etlerin az pişmiş veya pişirilmeden tüketilmesiyle oluşan, tüm dünyada yaygın bir paraziter bir hastalıktır. Western blot (WB) tekniği trichinellosis serolojik tanısında doğrulayıcı test olması açısından önemli yer tutmaktadır. Bu çalışmamızda In-house ES ELISA ile sero-pozitif saptanmış 25 trichinellosis hasta serumunda ve 2'si toxocariasis pozitif, 2'si fasciolosis pozitif ve 6'sı sağlıklı olmak üzere 10 kontrol serumunda Wb tekniği ile *Trichinella* spesifik IgG antikorları araştırıldı. WB sonuçlarına göre trichinellosisli hasta serumlarında 14 kDa ile 123 kDa arasında bant profilleri gözlemlendi. Bu serum örneklerinde en önemli üç bantın; 45 kDa (%88), 55 kDa (%60), ve 88-90 kDa (%64) moleküler ağırlığındaki antijenik bantlar olduğu görüldü. Bu araştırma ile WB testi ile ortaya konan bu üç antijenik bantın insan trichinellosisi serolojik tanısında değerli olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar sözcükler:** *Trichinella britovi*, trichinellosis, western blot

## Use of the Western Blot Assay in the Diagnosis of Trichinosis

**SUMMARY:** Trichinosis is a worldwide parasitic disease acquired by the consumption of raw or uncooked meat containing encysted larva. The western blot (WB) technique has an important role in the serological diagnosis of trichinosis as a confirmatory test. In our study, IgG antibodies specific for *Trichinella* were found in the sera of 25 patients with trichinosis seropositivity by In house ES ELISA. Of 10 control individuals, 2 were found to be positive for toxocariasis, 2, positive for fascioliasis and 6 were found to be healthy by the WB test. In WB analysis, serum samples from the 25 persons suffering from trichinosis showed common profile bands with the band size ranging from 14 to 123 kDa. These serum samples showed the following important three antigenic bands with different sensitivities of 45 kDa (88.0%), 55 kDa (60%), and 88-90 kDa (64%). As a result of this study, these three antigenic bands in WB test are considered to be valuable in the diagnosis of human trichinosis.

**Key words:** *Trichinella britovi*, trichinosis, western blot

## GİRİŞ

*Trichinella* cinsine ait nematodlarla meydana gelen trichinellosis, enfekte etlerin çiğ veya az pişmiş olarak yenmesi sonucu oluşan önemli bir zoonoz hastalığıdır (9, 14). Bugün dünyadaki salgınlar dikkate alındığında, en az 11 milyon insanın *Trichinella* ile enfekte olabileceği bildirilmektedir (3).

Ülkemiz trichinellosis yönünden riskli bölgeler arasında yer almasına rağmen 1977 yılından 2004 yılına kadar ülkemiz kaynaklı kesin insan olguları rapor edilmemiştir (8, 13). Buna karşın İzmir'de 2004 Ocak ayında meydana gelen *T. britovi* salgını dünyadaki en büyük epidemiler arasında gösterilmekte ve yaklaşık 1166 kişinin hastalıktan etkilendiği belirtilmektedir.

Trichinellosisin tanısı özellikle infeksiyöz ve immunolojik hastalıklarla karışabilmektedir. Hastalığın erken tanısında ve seyirinin izlenmesinde, serolojik yöntemlerin son derece önemli olduğu bildirilmektedir (4, 6). Laboratuvarlarda en çok önerilen serolojik yöntemler, tarama testi olarak ELISA ve doğrulayıcı test olarak Wb teknikleridir (2).

Bu çalışmamızda, rutin tarama testi olarak kullandığımız ELISA yönteminde karşılaşılan yalancı pozitiflikler ve erken tanı zorluklarına karşın Wb' ı, doğrulayıcı bir test olarak kullanabilmeyi; bu amaç için antijen-antikor profilini ortaya koymayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Hasta ve kontrol grubu serumları:** Çalışma grubu olarak, İzmir'de 2004 Ocak ayında meydana gelen trichinellosis salgını esnasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı'na trichinellosis şüphesiyle başvuran ve In-house ES ELISA ile pozitif olarak saptanan 25 kişinin serum örnek-leri alındı. ELISA ile ara pozitif olarak değerlendirilen 7 (%20) hasta, klinik bulgularının trichinellosis yönünde olması ve 1. aydan sonra tekrarlanan ELISA testi ile pozitif saptanmalarından dolayı pozitif hasta olarak değerlendirildi. Kontrol grubuna ise 2' si toxocariasis pozitif, 2'si fascioliasis pozitif ve 6' sı sağlıklı olmak üzere toplam 10 kişinin serumları dahil edildi. Toxocariasis hastaları ticari IBL Toxocara-IgG ELISA kiti ile, fascioliasis hastaları ise *F. hepatica* ES ürünlerinin kullanıldığı In-house ES ELISA ile, önceki rutin çalışmalar esnasında tespit edildi. Tüm serumlar çalışılincaya kadar -20 °C' de saklandı.

**Antijen :** Wb testinde kullanılan pürifiye *Trichinella* ES antijeni, Uluslararası *Trichinella* Referans Merkezi'nden sağlandı (*Trichinella* International Reference Centre, Istituto Superiore di Sanità, Roma).

**In-house ES ELISA:** In-house ELISA yöntemi Nöckler ve ark. (10) uyguladıkları yönteme göre çalışıldı. Plaklar spektrofotometre cihazında 405 nm dalga boyunda okutuldu. Kör odacıkların absorbans değerlerinin tüm odacıklardan çıkarılmasını takiben negatif kontrol serumlarını içeren çukurların absorbans değerlerinin üç katı ve üzeri değerler pozitif olarak değerlendirildi.

**Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot Testi:** SDS-PAGE yönteminde, pürifiye ES antijeninin ve markerın (Prestained SDS-PAGE standart low range), %10 SDS içeren poliakrilamid jel ve elektroforez sistemi yardımıyla protein fraksiyonlarına ayrılması sağlandı (7). SDS-PAGE yapılarak jel üzerinde antijenik protein fraksiyonları ayrıştırılan ES antijeni, daha sonra Bio-Rad Trans-Blot cell (Bio-Rad, 170-3930) sisteminde, 1 saat boyunca 300 mA akım uygulanmak suretiyle nitrosellüloz membrana (Bio-Rad, 162-0145) aktarıldı (17). Transfer işlemi sonrasında nitrosellüloz membran, Tris buffer salin (TBS) ile hazırlanmış %3 casein içinde, +4°C de bir gece bekletilerek bloking işlemi gerçekleştirildi. Bloking yapılan şerit membranlar, 3 kez Tris buffer salin-Tween 20 (TBS-T) ile yıkandıktan sonra yine TBS-T ile 1:100 dilüsyonu yapılmış serum örnekleriyle 1 saat inkübe edildi. Yıkamalar sonrasında her bir nitrosellüloz şerit üzerine TBS-T ile 1:5000 oranında sulandırılarak hazırlanan goat anti-human IgG konjugeden (Sigma, A-3187) 4 ml ilave edilerek bir saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Tekrarlanan yıkama işlemini takiben 10 ml distile su içinde 1 tane BCIP/NBT alkaline-phosphatase substrat tablet (Sigma, B-5655) eritilerek substrat buffer hazırlandı ve şeritler sıralarının bozulmamasına özen gösterilmek şartıyla, bu solüsyon içine konularak bantların görünür hale gelmesi için 1-5 dakika beklenildi. Şeritlerdeki bantlar mor renge dönene

kadar solüsyon içinde tutuldu ve daha sonra reaksiyonu durdurmak için şeritler distile sudan geçirildi.

**Testin değerlendirilmesi :** Şeritlerin üzerindeki belirgin bantlar, markerdaki bantlarla karşılaştırılarak bantların molekül ağırlıkları tespit edildi. Nitrosellüloz şeritlerin marker ile değerlendirilmesi sırasında, üzerinde *Trichinella*'lara özgü bantları içeren şeritlerin karşılaştığı serum örnekleri, *Trichinella* spesifik IgG antikorları yönünden pozitif olarak kabul edildi.

**İstatistiksel analiz:** Bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında Win Curve Fit bilgisayar programı kullanıldı. Sonuçların istatistiksel analizi SPSS 11.0 istatistik programı ile yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde parametrik ve nonparametrik testler kullanıldı. Saptanan protein bantlarının değerlendirilmesinde X<sup>2</sup> testi ve Discriminant analizi uygulandı. Saptanan protein bantlarının tanısal güvenilirliğini değerlendirmek için Roc Curve eğrileri çıkarıldı ve eğri altında kalan alan hesaplandı.

## BULGULAR

Çalışmaya 25 trichinellosisli ve 10 kontrol olmak üzere toplam 35 birey dahil edildi. Bu bireylerin 18' i (%51.4) erkek, 17' si (%49,6) kadın ve yaş ortalamaları 28.72 (3-51 yaş) idi. Trichinellosisli hastalardan 4'ü asemptomatikti ve trichinellosis semptomlarına (ateş, myalji, perioküler ödem, intrakonjunktival kanamalar vb.) rastlanmadı. Hastaların serum örnekleri çiğ et yeme öykülerinin 15-33. günlerinde alındı. Trichinellosisli hastaların In-house ES ELISA ve Wb sonuçları **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

Wb testi sonucunda, hasta ve kontrol gruplarında 14-123 kDa arasında farklı sensitivitelere, tekli, ikili ve üçlü gruplar halinde toplam 46 bant saptandı. Trichinellosis için 45 kDa, 55 kDa ve 88-90 kDa bantlarının en değerli bantlar olması nedeniyle, bu bantlardan en az birinin 45 kDa olmak şartı ile, bir ya da daha fazlasının gözlemlendiği hasta serumları pozitif olarak değerlendirildi (**Şekil 1**). Bu üç bantın ROC curve eğrisi ve bu eğri altında kalan alanlar **Şekil 2**'de gösterilmektedir.

Trichinellosisli hastalarda rastlanan bu 3 önemli banttan 45kDa bant; 22 (%88) hastada, 55 kDa bant; 15 (%60) hastada, 88-90 kDa bant ise; 16 (%64) hastada pozitif olarak tespit edildi (**Tablo 2**). Bantlar birlikte değerlendirildiklerinde 45-55 kDa %96, 45-88 kDa %92, 55-88 kDa %84 ve 45-55-88 kDa %96 oranında sensitivite elde edildi.

Sağlıklı ve diğer parazit hastalarının oluşturduğu kontrol grubundaki bireylerinin tümünün In-house ELISA sonuçları negatif olarak bulunurken, yapılan Wb analizlerinde bu üç bantın hiçbirine rastlanmadı.

**Tablo 1.** Trichinellosisli hastaların demografik özellikleri, standart ELISA ve WB sonuçları

Hasta No	Cins	Yaş	Klinik	Serum örneğinin alınma tarihi	In house ELISA	WB
1.	K	49	+	19. gün	+	+
2.	K	31	+	30. gün	+	+
3.	K	32	+	26. gün	+	+
4.	K	36	+	33. gün	+	+
5.	K	49	+	31. gün	+	+
6.	E	16	+	27. gün	+	+
7.	K	24	+	26. gün	+	+
8.	E	5	+	21. gün	+	+
9.	K	14	+	28. gün	+	+
10.	K	21	+	18. gün	+	+
11.	K	51	+	25. gün	+	+
12.	E	50	+	32. gün	+	+
13.	E	14	+	15. gün	+	+
14.	E	42	+	19. gün	+	+
15.	E	25	+	21. gün	+	+
16.	K	11	-	31. gün	+	+
17.	E	28	-	19. gün	+	+
18.	K	8	-	29. gün	+	+
19.	K	35	+	15. gün	+*	+
20.	E	19	+	17. gün	+*	+
21.	K	41	+	26.gün	+*	+
22.	K	23	+	25. gün	+*	+
23.	E	33	+	17. gün	+*	+
24.	E	12	+	24. gün	+*	+
25.	E	49	-	22. gün	+*	+

\*In house ES ELISA ile ara pozitif olarak saptanan hastalar

**Tablo 2.** Trichinellosisli hastalarda en sık gözlenen 3 bantın (45 kDa, 55 kDa ve 88-90 kDa) sensitivite ve ROC curve analizinde kapladıkları alan.

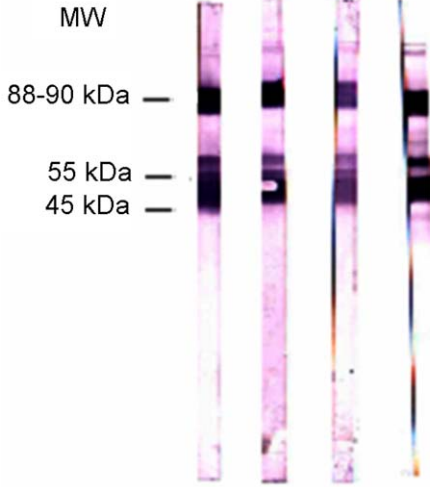
Bantların moleküler ağırlığı	Sensitivite (%)	ROC curve analizinde kapladığı alan (%)
<b>45kDa</b>	88	94
<b>55 kDa</b>	60	80
<b>88-90 kDa</b>	64	82

## TARTIŞMA

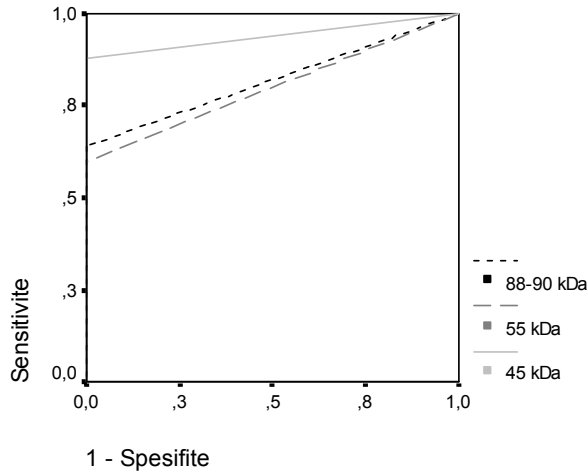
Trichinellosis, akut ve kronik dönem semptomlarının spesifik olmaması nedeniyle, özellikle infeksiyöz ve immunolojik hastalıklarla karışabilen paraziter bir hastalıktır. Hastalığa geç dönemde tanı konması tedavi başarısını azaltmakta, dolayısıyla dirençli, uzun süreli ve komplikasyonlu hastalık tablosuna yol açmaktadır. Diğer taraftan tanının konulamaması veya gecikmesi sporadik vakaların belirlenememesine, hastalığın kaynağının ortaya konulamaması yada geç kalınmasına ve bu şekilde salgınların büyük boyutlara ulaşmasına neden

olmaktadır. Tüm bu sonuçların önlenmesi için hastalığın erken tanısında ve ilaç tedavisi sonrasında hastalığın seyrinin izlenmesinde, serolojik yöntemler son derece önemlidir (4, 6).

Wb, genellikle, önceden elde edilmiş serolojik sonuçları konfirme etmek amacıyla kullanılan bir test olarak kullanılmaktadır. Özellikle ELISA ile elde edilen gerçek pozitif ve yalancı pozitif sonuçları, teyit etme veya ekarte etmede oldukça başarılı bir teknik olarak gösterilmektedir (16, 18).



Şekil 1: Trichinellosisli dört hastanın bant profilleri.



Şekil 2. Trichinellosisli hastalarda en sık gözlenen 3 bantın (45 kDa, 55 kDa ve 88-90 kDa) ROC curve analizi

Yapılan çalışmalarda Wb testinin özellikle hastalığın başlangıç döneminde, ELISA dahil diğer testlerden daha fazla değerli olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda klinik semptomlar açısından kuvvetle trichinellosis olduğu düşünülen fakat ELISA ile, şüpheli düzeylerde kalan 7 hastanın Wb ile pozitif bulunduğunu gördük. Bu sonuç özellikle hastalığın erken döneminde ELISA ile yaşanabilecek ara pozitif sonuçların, kesin tanı açısından Wb ile değerlendirilmesi gerektiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Yera ve ark., yaptıkları çalışmada erken dönem trichinellosisli 9 hastanın hiçbirisinde ELISA ile antikor yanıtının gösterilemediğini buna karşın Wb ile 4 hastada 43-44 ve 64 kDa luk bantların saptandığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar 43-44

kDa ve 64 kDa bantlarını %100 sensitif olarak bulmalarının yanısıra, %98,8 ile en spesifik bantlar (sadece bir kontrolde, anisakiyas) olarak değerlendirilmiştir (18). Benzer şekilde çalışmamızda 40-45 kDa bantlarını birlikte değerlendirdiğimizde %97,8 oranında sensitivite elde ettik.

Bu konuda yapılan diğer çalışmalara bakıldığında 45 kDa ve 55 kDa bantları trichinellosis tanısı için önemli bantlar olarak görülmektedir (1, 5, 11, 12, 15). Bizim çalışmamızda da, 45 kDa ağırlığındaki bant, standart ELISA ile pozitif olarak değerlendirilmiş hastaların %88' inde gözlenmiş ve bu bant, çalışmamızda *Trichinella* tanısı için en sensitif bant olarak değerlendirilmiştir. Saptadığımız 55 kDa ağırlığındaki bant ise, %60 sensitivite oranıyla yine *Trichinella* için en değerli bantlar arasında değerlendirilmiştir.

Robert ve ark., 47, 55 ve 90 kDa bantlarını trichinella için spesifik bantlar olarak tanımlamışlardır (15). Robert ve ark.'nın bulgularına paralel olarak, biz de 88-90 kDa ağırlığındaki bantları %64 sensitivite ile trichinellosis tanısında en değerli bantlar arasında sıraladık.

Nunez ve ark., insan trichinellosisinin akut ve kronik döneminde, ES antijenini kullanarak Wb yöntemini uygulamışlardır. Araştırmacılar yaklaşık 55, 36, 29 ve 14 kDa ağırlığındaki bantları *T. spiralis* için spesifik bulurken, 55 kDa'nun tüm hasta serumlarında gözlendiğini bildirmişlerdir (11). Çalışmamızda 55 kDa ağırlığındaki bant %60 oranıyla *Trichinella* için en değerli bantlar arasında değerlendirilmiştir.

Wb çalışmalarında farklı antijen-antikor reaksiyonlarının saptanması, muskuler larva ES ürünlerinin elde edilme prosedürlerindeki farklılıklardan, elektroforetik ayırtımadaki farklı koşullardan, bantların spesifitelerini değerlendirmede seçilen diğer parazitöz hastalıklarının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Biz bu çalışmada kontrol serumları arasına toxocariasisli ve fascioliasisli hasta serumlarını da aldık. Wb sonucunda trichinella için sensitif olarak değerlendirdiğimiz bantlardan hiçbirini bu hastalarda gözlemedik. Fakat özellikle bantların spesifitelerini belirleyebilmek için bu grupların daha geniş tutulması gerektiğine inanıyoruz.

Sonuç olarak, ES antijenini kullanarak Wb tekniğini trichinellosis tanısında başarıyla uyguladık. Yurdumuzda meydana gelebilecek bundan sonraki olası *Trichinella* salgınlarında, özellikle şüpheli olgularda ya da hastalığın erken dönemlerinde diğer testlerin henüz negatif olduğu durumlarda Wb tekniğinin kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna vardık.

#### KAYNAKLAR

1. Alcantara P, Correa D, 1993. Human humoral immune responses against *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol*, 23: 657-660.
2. De-la-Rosa JL, Alcantara P, Correa D, 1995. Investigation of cross-reactions against *Trichinella spiralis* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay in patients with various diseases. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2: 122-124.

3. **Dupouy-Camet J**, 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol*, 93:191-200.
4. **European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General**. 21-22 November 2001. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary measure relating to Public Health on trichinellosis, epidemiology, methods of detection *Trichinella*- free pig production. p: 27-30.
5. **Hassanain MA, Hassanain NA, El-Mogazy FM**, 2004. Identification of immunoreactive proteins of *Trichinella spiralis* adult and adult excretory/secretory (E/S) antigens in sera of human and animals. *J Egypt Soc Parasitol*, 34: 281-295.
6. **Kociecka W**, 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol*, 93: 365-383.
7. **Laemmli UK**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
8. **Merdivenci A, Aleksanyan V, Giriskan G, Perk M**, 1977. An outbreak of *Trichinella spiralis* infection in man and wild pig in Turkey. *Istanbul Univ Vet Fak Derg*, 3: 46-71.
9. **Murrell KD, Pozio E**, 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *Int J Parasitol*, 30: 1339-1349.
10. **Nockler K, Pozio E, Voigt WP, Heidrich J**, 2000. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet Parasitol*. 93: 335-350.
11. **Nunez GG, Malmassari SL, Costantino SN, Venturiello SM**, 2000. Immuno-electrotransfer blot assay in acute and chronic human trichinellosis. *J Parasitol*, 86: 1121-1124.
12. **Pinelli E, Mommers M, Homan W, Van Maanen T, Kortbeek LM**, 2004 Imported human trichinellosis: sequential IgG4 antibody response to *Trichinella spiralis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23: 57-60.
13. **Pozio E, La Rosa G**, 2000. *Trichinella murrelli* sp. etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *J Parasitol*, 86: 134-139.
14. **Pozio E**, 2000. New patterns of *Trichinella* infection. *Vet Parasitol*, 98: 33-48.
15. **Robert F, Weil B, Kassis N, Dupouy-Camet J**, 1996. Investigation of immunofluorescence cross-reactions against *Trichinella spiralis* by western blot (immunoblot) analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3: 575-577.
16. **Rodriguez-Osorio M, Gomez-Garcia V, Benito R, Gil J**, 2003. *Trichinella britovi* human infection in Spain: antibody response to surface, excretory/secretory and somatic antigens. *Parasite*, 10: 159-164.
17. **Towbin HT, Staehelin T, Gordon J**, 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci*, 76: 4350-4354.
18. **Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J**, 2003. Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10: 793-796.