

757532

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRİCHİNELLOSİS TANISINDA
ELISA VE
WESTERN BLOT TESTLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Soykan ÖZKOÇ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Çiler AKISÜ

İZMİR – 2004

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aŐamalarında her türlü desteği sağlayan, yol gösteren Anabilim Dalı Başkanım ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Çiler Akısü'ye, tezimin laboratuvar çalıŐmaları esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzm. Dr. Songül Bayram DelibaŐ'a, testlerde gerekli antijenin sağlanması ve elde edilme prosedürleri konusunda yardımcı olan Sayın Prof. Edoardo Pozio'ya, tezimin istatistiklerinde yaptığı katkılardan dolayı Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Sayın Op. Dr. Mustafa DelibaŐ'a, yetişmemde emeği geçen eski Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Vedat Orhan'a, Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve manevi desteklerinden dolayı aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL, TABLO, GRAFİK LİSTESİ	i
GİRİŞ VE AMAÇ	ii
KAYNAK BİLGİLER	1
1. Tarihçe.....	1
2. Sistematikteki Yeri	2
3. Morfoloji.....	3
4. Evrim	5
5. Epidemiyoloji	8
6. Patogenez.....	17
7. Klinik	23
8. Tanı	29
9. Ayırıcı Tanı	38
10. Tedavi	38
11. Korunma	41

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Hasta ve Kontrol Serumları.....	44
2. Serolojik Testlerde Kullanılmak Üzere Antijen Hazırlanması	44
▫ <i>Trichinella Spiralis</i> Larvalarının Elde Edilmesi.....	45
▫ Eksretuar-Sekretuar(ES) Antijenin Elde Edilmesi	46
3. Serolojik Testler ve Uygulanması.....	47
▫ <i>Trichinella</i> Standart ELISA Testi	47
▫ SDS-PAGE ve Western Blotting (Wb) Testi	49
4. Kullanılan Malzemelerin Ticari Adları	61
5. İstatistiksel Analiz.....	62

BULGULAR.....	63
TARTIŞMA.....	74
SONUÇ	94
ÖZET	95
SUMMARY	96
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	111



ŞEKİLLER ve TABLOLAR

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: <i>Trichinella spp</i> 'in şematik görüntüsü	4
Şekil 2: <i>Trichinella spp</i> 'in hayat döngüsü	6
Şekil 3: Çizgili kasta enkiste <i>trichinella</i> larvası	7
Şekil 4a: <i>Trichinella</i> türlerinin dünyadaki dağılımı.....	10
Şekil 4b: <i>Trichinella</i> türlerinin dünyadaki dağılımı	10
Şekil 5: <i>Trichinella</i> larvalarının kan ve lenf yoluyla tüm vücuda yayılımı	19
Şekil 6: Kas hücresinde <i>Trichinella'nın</i> kapsülasyonu.....	21

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: <i>Trichinella</i> türlerinin ana biyolojik özellikleri, konakları ve coğrafik dağılımları	14
Tablo 2: İnsan trichinelosisinde ana klinik ve biyolojik özellikler	24
Tablo 3 : Akut trichinellosis şüpheli hastalarda kullanılan tanı algoritması	30
Tablo 4: Farklı tanı tekniklerinin bir gram dokuda saptayabildiği larva sayısı.....	37
Tablo 5: Çalışma ve kontrol grubundaki hastaların demografik özellikleri, standart ELISA, ticari ELISA ve Wb sonuçları	64
Tablo 6: Çalışma ve kontrol grubu hastalarının standart ELISA sonuçları ve Wb ile elde edilen bant paternleri	69
Tablo 7: Wb sonucu elde edilen tüm bantların hastalığı göstermedeki etkinlikleri	71

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Örnek 1-20'e ait Wb nitroselluloz şeritler	66
Resim 2: Örnek 21-40'a ait Wb nitroselluloz şeritler.....	67
Resim 3: Örnek 41-44'e ait Wb nitroselluloz şeritler.....	68

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Wb yöntemi ile en sık saptanan bantlar.....	73
---	----

GİRİŞ

Trichinellosis, memeliler başta olmak üzere geniş bir konak yelpazesine sahip paraziter bir zoonozdur. Tüm dünyada geniş bir coğrafik yayılıma sahip olan bu hastalığın etkeni *Trichinella spp*'dir. Yakın zamana kadar hastalığa neden olan tek türün *Trichinella spiralis* olduğu bilinirken bugün tanımlanmış sekiz ayrı tür ve buna ek olarak üç ayrı genotip, taksonomideki yerini almıştır.

Trichinella türü bu nematodlar, özellikle etçil ve leş yiyen hayvanlarda parazitlenmekte, insan ise bu infekte hayvanların etlerini çiğ veya az pişmiş şekilde yiyerek infekte olmaktadır. İnsanların beslenme alışkanlıklarının önemli olduğu bu hastalıkta başta domuz, at ve av hayvanı etlerinin çok olarak tüketildiği toplumlarda hastalık daha sık olarak gözlenmektedir. Bugün özellikle gelişmiş olan ülkelerde hastalığın kontrolü yapılabilmekte ve insanları da etkileyen geniş salgınları önleyebilmek amacıyla büyük fonlar ayrılmakta, bu amaçla yeni araştırma merkezleri kurulmaktadır.

Hastalık, hayvanlarda asemptomatik seyretmekle birlikte, insanlarda farklı klinik tablolara neden olabilmekte, immun sistemi baskılanmış kişilerde ve özgün tedavinin uygulanmadığı durumlarda ölümlere yol açabilmektedir. İnsan infeksiyonlarında klinik prognoz alınan larva sayısına, *Trichinella* türüne ve konak yanıtına bağlı olarak değişmekle beraber, ölümler daha çok kardiyolojik, nörolojik ve solunum sistemi komplikasyonlarına bağlı olarak meydana

gelmektedir. İnfeksiyonun erken dönemde tanınması ve ayırıcı tanısının yapılması, doğru ve etkin tedavinin uygulanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Trichinellosisin tanısında serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde en sık tercih edilen yöntemler arasında, hastalığa özgün antikorların ELISA tabanlı sistemlerle aranması gelmektedir. Özellikle parazitin eksretuar-sekretuar (ES) ürünlerinin kullanıldığı testler, uygulama kolaylığı yanında, sensitivite ve spesivite oranlarının yüksek olması nedeni ile tercih edilmektedir. Western blot (Wb) yöntemi ise tarama testleri ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amacıyla doğrulama testi olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, İzmir’de meydana gelen *Trichinella britovi* salgınında infekte olan hastalardan, diğer parazitozlu hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan serumlar, anti-*Trichinella* IgG antikorları yönünden incelenmiştir. *T. spiralis* larvalarından ES ürünleri elde edilerek, ELISA ve Wb tekniklerinde antijen olarak kullanılmış ve bu tekniklerin hastalığı tanımlamalarındaki etkinlikleri değerlendirilmiştir. Böylece meydana gelebilecek diğer olası salgınlarda, gerekli olacak antijenin elde edilmesi ve uygulanabilecek testlerin standardizasyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

KAYNAK BİLGİLER

Trichinellosis (Trichinosis, Trichiniasis, Trichinelliasis, Trichina infeksiyonu), *Trichinella* cinsine ait nematodlarla meydana gelen, tüm dünyada yaygın paraziter bir zoonozdur. Günümüzde hastalık oluşturan 11 genotip tanımlanmıştır. İnsanı da içeren geniş bir memeli ve vertebralı grubu, hastalıktan etkilenmektedir.

İnfekte etlerin az veya pişirilmeden tüketilmesi ile kazanılan parazit, konağın çizgili kaslarında “enkiste larva” şeklinde yıllarca kalabilir ve insanlarda trichinellosis infeksiyonun meydana gelmesine neden olur (Kumar ve ark., 1990). Bugün dünyadaki salgınlar dikkate alındığında, en az 11 milyon insanın *Trichinella* ile infekte olabileceği bildirilmektedir (Dupouy-Camet ve ark., 2000).

1. TARİHÇE

Trichinellosis ile domuzlar arasındaki ilişki, uzun zaman önce tanımlanmış olsa da kaslarda enkiste larvalar 1821 yılına kadar gösterilememiştir. İnsanda parazitin keşfi, 1835 yılında St. Bartholomew Hastanesi'nde tıp öğrencisi olan James Paget tarafından yapılmıştır. Buluş, Richard Owen tarafından yine aynı yıl içinde yayınlanmış, fakat insan kasındaki formun nematodun larva şekli olduğu anlaşılamamıştır. Erişkin formlar ise 1859 yılında Rudolf Virchow ve 1860 yılında Frieddrich Zenker tarafından tanımlanmıştır. Zenker, infeksiyonun insanlara az pişmiş domuz etiyle geçtiğini ortaya koymuştur (Virchow 1859; Zenker 1860; Cox, 2002).

Trichinella infeksiyonlarının, 1972 yılından sonra tek bir türle değil (*T. spiralis*), moleküler ve biyokimyasal olarak farklı 11 farklı türle oluştuğu ortaya konulmuştur (Owen, 1835; Britov ve ark.,1972; Pozio ve ark., 1992a; Pozio ve ark., 2000a; Garkavi, 1972; Pozio ve ark., 1999a).

2. SİSTEMATİKTEKİ YERİ

Trichinella'nın ilk defa 1835 yılında tanımlanmasından geçtiğimiz yüzyılın ortalarına kadar olan süre boyunca trichinellosisin tek bir tür tarafından meydana geldiği düşünülmüştür. Son yıllarda geliştirilen, özellikle DNA bazlı metodlar sayesinde *Trichinella*'nın taksonomik yeri daha belirgin hale gelmiştir.

Günümüzde *Trichinella* türlerinin sistematikteki yeri şu şekilde özetlenebilir (Dick, 1983; Pozio, 2000b; Murrell ve ark., 2000a).

- Subregnum: *Helminthes*
- Phylum: *Nemathelminthes*
- Classis: *Nematoda*
- Subclassis: *Aphasmida*
- Ordo: *Anoplida*
- Süperfamilia: *Trichuroidea*
- Familia: *Trichinellidae*
- Genus: *Trichinella*
- Species: *T. spiralis* (T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3), *T. pseudospiralis* (T4), *T. murrell* (T5), *T6 isolatı*, *T. nelsoni* (T7), *T8 isolatı*, *T9 isolatı*, *T. papuae* (T10), *T. zimbabwensis* (T11)

3. MORFOLOJİ

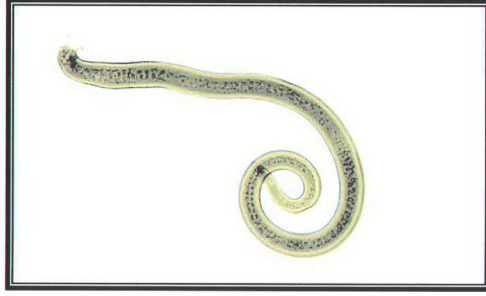
Trichinella'nın erişkin erkek ve dişisi morfolojik olarak birbirinden farklıdır (Şekil 1a, 1b).

Erişkin erkek parazit, 1.5 mm boyunda, 0.04 mm enindedir. Kıvrık olan arka ucunda spikül yoktur. Kloakın arkasında iki çift papilla bulunur. Üreme sistemi tek bir testis, vas deferens, vezika seminalis ve ejakülatör kanaldan meydana gelir.

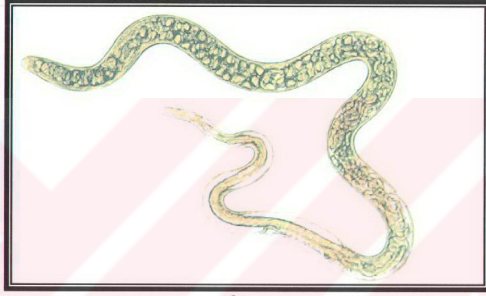
Erişkin dişi daha büyüktür (3.5mm x 0.06 mm) ve vivipardır. Arka ucu daha künttür ve vulva stichosom'un sonuna doğru lokalize olmuştur. Dişi üreme sistemi tek bir over, ovidukt ve uterus şeklinde devam eder. Yumurtalar uterus içinde olgunlaşır ve oluşan embriyo uterus içindeyken yumurtadan dışarı çıkar (Yaşarol, 1978; Bogitsh ve ark., 1998).

Yeni doğan larva 80 µm uzunluğunda, 7-8 µm enindedir (Şekil 1c). Mızrağa benzer yapıda olan ösefagus konak hücrelerine girişi sağlar. Parazitin vücuda alımından 19 gün sonra infektiv hale gelen kaslardaki larvaların, boyu 1 mm'ye, eni ise 36 µm'ye ulaşmaktadır (Yaşarol, 1978).

Erişkin parazit, ince bağırsak içinde aerobik olarak yaşar. Besinlerini konaktan nasıl sağladığı bilinmemektedir. Konak dokularının direkt olarak sindiremediği, muhtemelen küçük moleküler ağırlıklı besinlerin kutiküler yüzeyden veya hipodermal bez hücreleri tarafından alındığı düşünülmektedir (Despommier, 1998a).



a



b



c

Şekil 1: a. Erişkin erkek, b. Erişkin dişi, c. Yenidoğan larva

(<http://www.trichinella.org/clinical/enteral.htm>)

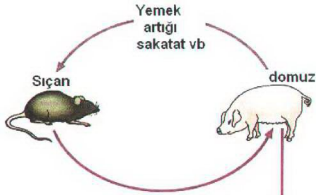
4. EVRİM

Parazit evrimini tek bir konakta tamamlayarak, monoksen tip parazitlik yapar (Kapel, 2000).

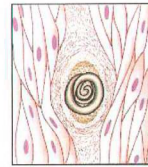
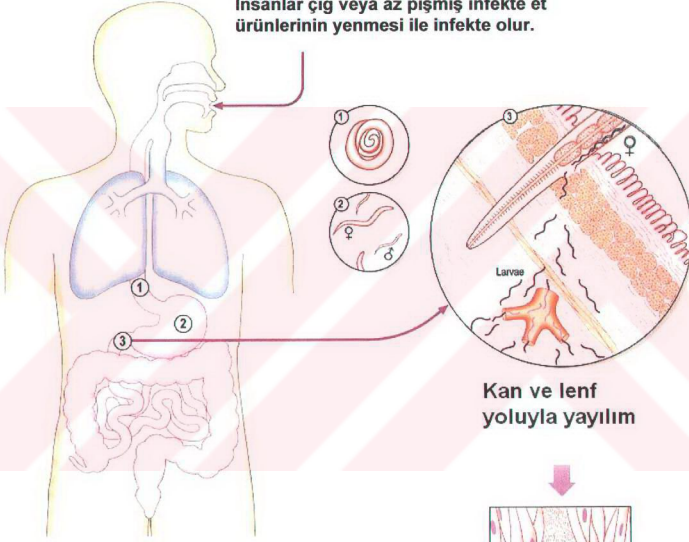
Konağa alınan parazit enteral, vasküler ve muskuler dönemlerden geçer.

Enkiste larva (Muskuler Larva, ML) içeren infekte etlerin yenmesiyle, insan, domuz, tilki, çakal, kurt, ayı, rakun, fare, rat gibi canlılar başta olmak üzere bir çok vertebralı canlıya geçen parazit, konağın midesine geldiği zaman gastrik koşullar altında kollajen kapsüllerinden dışarı çıkar. Serbestleşen larvalar ince barsağa ulaşır ince barsağın kolumnar epiteli içine doğru ilerleyerek buraya yerleşirler. Burada 24-30 saat içinde dört gömlek değiştirerek erişkin hale gelirler (Kozek, 1971). İnfekte etin alımından yaklaşık 30-40 saat sonra erkek ve dişi erişkin parazit çiftleşir. Daha sonra, erişkin erkek ölür ve dışkı ile konaktan dışarı atılır. Dişi erişkin ise, ince barsaklarda hatta yoğun infeksiyonlarda kolonda da mukoza içlerine doğru göç ederek, submukozaya bazen de lenfatik kanallara ve lenf nodlarına yerleşir. Fertilizasyondan sonraki 3 gün içinde larva oluşumu başlar ve 5 gün içinde larvalar olgunlaşarak 0.16 mm x 0.07 mm boyutlarına ulaşır (Yenidoğan Larva, YDL). Larvalar fertilizasyondan sonraki 5 ile 10. günler arası dişi parazitten ayrılarak barsak içinde depolanır. “Larval depolanma dönemi” denen bu dönem, erişkin dişi barsak içinde olduğu sürece devam eder. Dişiler yaşam süreleri boyunca ortalama 1000-2000 adet larva doğurur (Despommier, 1998a; Campell ve ark., 1994; Murray ve ark.,1998). Larva sayısı, konağın immun durumuna ve parazit genotipinin infektivitesine bağlıdır (Capo, 1996). Bu safha tamamlandıktan sonra erişkin dişiler konak barsağından dışarı atılırlar (Şekil 2).

İntestinal villusların içine göç eden larvalar, kan ve lenf damarları yoluyla kalbe ulaştıktan sonra tüm vücuda dağılırlar. Özellikle diyafram, çene, dil, göz, deltoid, gastroknemius olmak



İnsanlar çiğ veya az pişmiş infekte et ürünlerinin yemesi ile infekte olur.

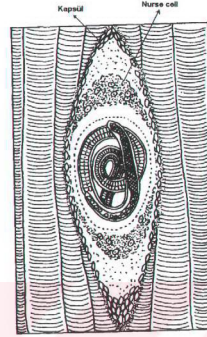


Kasta enkiste olmuş larva

Şekil 2: *Trichinella spp*'in hayat döngüsü
(Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. 2001)

üzere tüm vücuttaki çizgili kas hücrelerine yerleşirler. Ortalama enfeksiyonun 6. gününden itibaren kas hücresine penetrasyon ve hücre içine konumlanma meydana gelir.

Trichinella spp. zorunlu olarak hücre içi gelişim gösteren tek helminttir. Hücre içindeki gelişim; stichosomun formasyonu, cinsiyetlerin farklılaşması ve kutikülün kalınlaşması basamaklarından oluşur. Kaslarda yerleşen larvaya karşı gelişen konak reaksiyonu sonucunda larva çevresinde dejeneratif ve inflamatuvar değişiklikler meydana gelir. Böylece “nurse cell” olarak adlandırılan kist benzeri yapı oluşur (Despommier ve ark., 1993; Despommier, 1998b) (Şekil 3).



Şekil 3: Çizgili kasta enjekte *Trichinella* larvası, nurse cell (Bogitsh BJ, Cheng TC. 1998)

Larva kas içinde yavaşça büyümesine devam eder ve sonunda kendi üzerine kıvrılarak (17.gün) karakteristik spiral şeklini alır. Bu dönem larvanın en infektif olduğu dönemdir. Bu dönemi takiben larva, konak orjinli çift katlı elipsoidal kapsül (0.25-0.5mm uzunlukta) ile örtülmeye başlar (enkapsülasyon). Bu kapsülün dış katmanı sarkolemmadan köken alırken, iç katman dejeneratif miyofibril ve fibroblast gibi diğer hücrelerden ve glikoprotein, proteoglikan, laminin, fibronektin, kollojen yapılarından meydana gelir. Enfeksiyonun 21. gününde başlayan kapsül oluşumu yaklaşık 3 ayda tamamlanır. Eğer kalsifikasyon oluşmazsa larva bu oluşum içinde yıllarca canlı olarak kalabilir veya sonunda kalsifiye olarak ölür. Kalsifikasyon en erken 6. ayda başlar ve yaklaşık 18 ayda tamamlanır.

Çizgili kas dokusundan farklı dokulara giren larvalar, yaşamlarını destekleyecek özel hücreleri oluşturamadıkları için yeniden kan dolaşımına katılırlar ya da ölürler (Despommier, 1998a). İnfektif larvayı içeren etlerin tekrar başka bir konak tarafından yenmesi sonucunda döngü tekrarlanır.

5. EPİDEMİYOLOJİ

Kutuplardan tropikal bölgelere kadar kosmopolit bir dağılım gösteren *Trichinella*, birincil olarak et yiyen memelilerde yerleşir. At ve nadiren koyun gibi otçul memelilerin de; mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber infeksiyondan etkilenebildikleri bilinmektedir (Ancella, 1998). Memeli dışındaki omurgalılarda genel bir direnç bulunmaktadır, fakat bazı poikilotermik hayvanlar, vücut ısılarını yükseltmeleri halinde infekte olabilmektedir (Smirnov, 1963; Williams ve ark., 1976; Tomasovicova, 1981).

Trichinellosis epidemiyolojisinde iki ana yaşam döngüsü göze çarpmaktadır.

a) Evcil hayvan döngüsü (domestic cycclus, domestik siklus)

Evcil hayvanlar arasında devam eden bu tip yaşam döngüsü, en başta evcil domuz olmak üzere fare, sıçan, at gibi evcil hayvanlar arasında devamlılığını sürdürür. Bu döngü, temelde çiftlik domuzlarının, pişmemiş domuz etleri ve kalıntılarını içeren kontamine artıklarla beslenmesi sonucunda oluşur. Ayrıca sıçanların da bu artıklarla beslenmesi, infekte sıçanların domuzlar tarafından yenmesi, ya da domuzların birbirlerinin kuyruklarını, kulaklarını yemesi bu siklusun devamında önemlidir. İnsan bu döngüye, infekte domuz etlerini veya bu etlerle yapılmış ürünleri (salam, sosis) az pişmiş veya çiğ olarak yemeleri suretiyle katılmaktadır. (Leighty, 1983; Campbell ve ark., 1994).

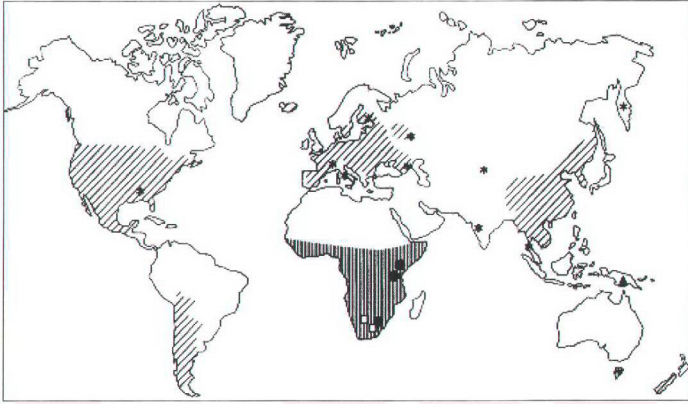
b) Yabani Hayvan Döngüsü (sylvatic cyclus, silvatik siklus)

Bu tip döngü leş yeme ve yamyamlık gibi besin alışkanlıklarına sahip başta yabani domuz, kırmızı tilki, kutup ayısı, kaplan, aslan, tilki, çakal, kurt, köpek, timsah, etçil kuşlar gibi vahşi hayattaki birçok memelide gözlenir. Silvatik siklus tüm dünyada çok geniş bir dağılım göstermektedir. İnsan tesadüfı olarak bu döngüye katılmaktadır (Pozio, 2000c).

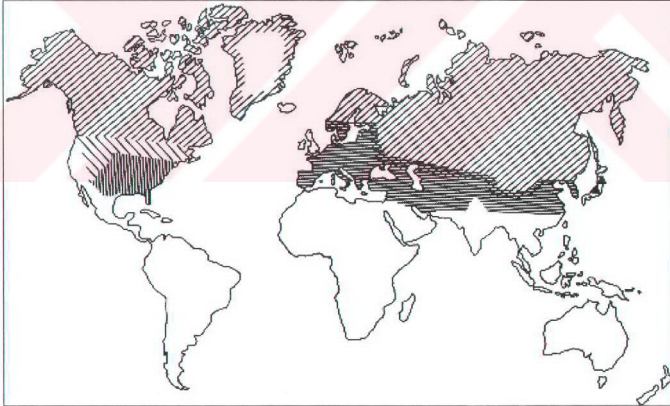
Trichinella Türleri

Tanımlanmış 11 *Trichinella* izolatından sadece *T. spiralis* domestik siklusta yer almaktadır (domestik genotip). Diğer 10 genotip (silvatik genotip) ise sadece silvatik siklusta evrimini devam ettirebilir. Silvatik siklustan kazanılan *Trichinella*'lar, domestik siklusta da infektivite oluşturmurlarsada, bu döngünün devamı mümkün değildir (Pozio, 2000c)(Tablo 1). *Trichinella*, türlere göre değişen farklı coğrafik dağılım gösterir (Şekil 4 ve Şekil 5).

***T. spiralis* (T1):** Ilıman bölgelerdeki evcil domuzların, vahşi domuzların ve sinantropik hayvanların (fare, sıçan vb.) tipik etiyolojik ajanıdır. Evcil domuz trichinellosisinin endemik olduğu bölgelerde (Eski Sovyet Cumhuriyetleri, Yugoslavya, Romanya, Meksika) vahşi hayata, insanlara ve hatta atlara geçişleri sık olarak gözlenir. *T. spiralis*, bildirilen insan infeksiyonlarının birçoğunun etiyolojik ajanı olduğu gibi, birçok otçul hayvanda da (at, sığır, koyun, keçi) yüksek infektivite sergilemektedir (Tomasovicova ve ark., 1991; Pozio ve ark., 1999b; Thodoropoulos ve ark., 2000). Bunun yanında sıcaklık değişimlerinden ve konak dokusundaki bozulmalardan diğer silvatik genotiplere oranla daha fazla etkileniyor olması vahşi hayvanlarda ve vahşi doğada diğer genotiplerden daha az görülmesine neden olmaktadır.



Şekil 4a : *Trichinella* genotipinin dünyadaki dağılımı. *Trichinella spiralis* T1 (☞). *Trichinella pseudospiralis* T4 (*). *Trichinella papuae* T10 (▲). *T. nelsoni* T7 isolates (●) ve (■). *Trichinella* T8 (□) (Pozio, 2000a)



Şekil 4b : *Trichinella* genotipinin dünyadaki dağılımı. *Trichinella nativa* T2 (☞) *Trichinella britovi* T3 (■) *Trichinella murrelli* T5 (■). *Trichinella* T6 (☞). *Trichinella* T9 (▲) (Pozio, 2000a)

T. nativa (T2): Soğuk iklimlere adapte olmuş bir türdür. İnfektif *T. nativa* larvalarının -18 °C 4 yıl boyunca canlı kalabildiği gösterilmiştir (Kapel ve ark.,1999). Domuzlarda infektivitesi sınırlı olmakla birlikte, kutup ayısı, kahverengi ayı, kurt, tilki, mors, mustelidler *T. nativa*'nın parazitlenmesinde önemli konaklardır.

T. britovi (T3): Asya ve Avrupa'nın ılıman iklimlerinde gözlenir. Birincil olarak vahşi hayvanlarda (tilki, raccoon dog, kurt, ayı, kanguru) parazitlenir. Farelerde, yabani ve evcil domuzlarda infeksiyon, sadece birkaç hafta ile sınırlanmaktadır (Pozio ve ark.,1992b). İtalya, Fransa ve Batı Avrupa'da (Dupuoy-Camet ve ark.,1999) atlarda görülen infeksiyonlara ilaveten diğer otçullar (koyun) için infektivitenin çok düşük olduğu bildirilmiştir. İnsan infeksiyonları daha çok yaban domuzu kaynaklıdır ve *T. spiralis*'e göre daha orta şiddette infeksiyonlar şeklinde seyretmektedir. *T. britovi* diğer türlerin ara karakteristik özelliklerini sergilemektedir. Bu özellikler arasında, yavaş kapsül oluşumu, domuzlarda düşük sayıda larva oluşumu ve donmaya dirençli olma (-20 °C 6 ay canlı kalabilme) sayılabilir.

T. pseudospiralis (T4): Kaslarda kapsül oluşturmayan bu tür, Asya, Kuzey Amerika ve Avustralya'da; kuşları, vahşi etçilleri, sıçanları, keseli hayvanları ve insanları infekte ederek, geniş bir konak dağılımı ve coğrafik yayılım sergiler (Garkavi,1972; Jongwutiwes ve ark.,1998)

T. murrelli (T5): Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinde silvatic trichinellosis etkenidir. Domuzlarda parazitlenmeyen bu *Trichinella* türü, kırmızı tilkide, kır kurdunda, rakunda, vaşakta ve siyah ayıda infeksiyon oluşturur (Pozio ve ark., 2000a).

T6 izolatu: Kuzey Amerika'da bulunan bu tür *T. nativa* ile benzer özellikler göstermektedir. Soğuğa direnci son derece fazladır. Domuzlar için düşük infektiviteye sahip olan bu *Trichinella* izolatu, vahşi hayvanlar (dağ aslanı, siyah ayı, gri kutup ayısı, kurt, gri tilki) ve insanlarda infeksiyon oluşturabilmektedir (Murrell ve ark., 2000a).

T. nelsoni (T7): Afrika'nın vahşi hayatında leş yiyen etçillerde dağılım gösterir. Doğal yolla infekte olan otçullarda infeksiyon gösterilememiştir. Diğer *Trichinella* genotiplerine oranla yüksek sıcaklıklara tolerasyon çok fazladır ve tamamen çürümüş etlerde bile canlı kalabilmektedir (Sokolava, 1979). Buna karşın donmaya karşı en duyarlı genotip olarak görülmektedir. İnsan infeksiyonları daha çok vahşi domuz kaynaklıdır

T8 izolatu: Güney Afrika ve Namibya'da elde edilen bu izolat, *T. britovi* ile ilişkilendirilmişse de farklı moleküler tekniklerle ayırt edici özellikleri ile tanımlanabilmektedir (Murrell ve ark 2000a).

T9 izolatu: Japonya'daki silvatic trichinellosisin etkenidir. *T. britovi* ile benzerlik göstermesine rağmen *T. britovi* için kullanılan moleküler yöntemler bu genotipi tanımlamada yetersiz kalmaktadır. Şimdiye kadar birisi siyah ayı ve diğeri raccoon dog olmak üzere sadece iki izolat gösterilmiştir (Murrell ve ark 2000a)..

T. papuae (T10): İnfekte hayvanın çizgili kaslarında kapsül oluşturmadan parazitlenen ikinci türdür. Bu türe ait vakalar sadece Papua Yeni Gine'de, evcil ve vahşi domuzlarda bildirilmiştir (Pozio ve ark.,1999a).

T11 genotipi: Afrika timsahlarında tanımlanmış olan bu genotipin taksonomideki yeri, henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (Murrell ve ark., 2000a; Pozio, 2001).

İnsan trichinellosis olguları dünyanın çeşitli bölgelerinde görülmekte ve toplumların diyet alışkanlıklarına bağlı olarak prevalansı bölgeden bölgeye değişmektedir (Campbell ve ark., 1994). İnsan infeksiyonları genelde az pişmiş veya pişmemiş evcil, yaban domuzlarının ve at etinin yenmesiyle meydana gelmektedir. İslami ve Yahudi toplumlarda domuz etinin yenmesi yasaklandığı için infeksiyon bu toplumlarda daha az gözlenmektedir.

Uluslararası Trichinellosis Komisyonu tarafından 1995-1997 yılları arasında 10.000 den fazla insan trichinellosis olgusu olduğu bildirilmiştir (Dupouy-Camet ve ark., 2000).

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra özellikle Batı Avrupa'daki endüstriyel domuz çiftliklerinde hastalık rapor edilmemiş, yalnızca Finlandiya'nın güneyi ve İspanya'nın bazı bölgelerindeki küçük domuz çiftliklerinde infeksiyona rastlanmıştır (Pozio, 1998). Son yıllarda veteriner kontrollerinin azalması, ekonomik problemler ve savaşlar nedeniyle Orta ve Batı Avrupa'da domuz sürüleri arasındaki salgın oranları giderek artmıştır. Avusturya, Belçika, Danimarka, Finlandiya, İngiltere, İrlanda, Lüksemburg, Portekiz, İsveç ve Hollanda gibi ülkelerde 1978-1998 yılları arasında o bölge kaynaklı insan trichinellosis vakaları gözlenmez iken, 1998 den sonra bu bölgelerden trichinellosis bildirimlerinde giderek artış olmuştur. Avrupa'daki at eti tüketiminin yaklaşık %70'inin gerçekleştiği Fransa ve İtalya'da son 25 yıl içinde, infekte at etinin yenilmesine sonucu 3000 kişinin infekte olduğu bildirilmektedir (Dupouy-Camet ve ark., 2000). Sadece 1999 yılı içerisinde Fransa ve İtalya'da meydana gelen 3 salgında 623 kişi at eti kaynaklı trichinellosisten etkilenmiştir (Dupouy-Camet, 1999).

Tablo1: *Trichinella* türlerinin ana biyolojik özellikleri , konakları ve coğrafik dağılımları (Capo, 1996; Pozio, 2000b; Pozio ve ark, 2003a)

Türler	Yayılış	Siklus	Konaklar	İnfectivite	Kollajen kapsül	Sogüga direnç	Klinik özellikler
<i>T. spiralis (T1)</i>	Kosmopolit	Domestik ve silvatic	Domuz, sıçan, etçiller	Yüksek	Var	Yok	Yüksek patojenik, ölümcül olabilir, "nurse cell" formasyonu 16. günde
<i>T. nativa (T2)</i>	Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'nın arktik ve subarktik bölgeleri	Silvatic	Ayı, at	Yüksek	Var	Yüksek	Orta derecede patojenik, uzun inkübasyon, belirgin semptomlar, nurse cell formasyonu 30. günde
<i>T. britovi (T3)</i>	Paleartik alanların ılıman bölgeleri	Silvatic, bazen domestik	Yaban domuzu, at	Orta	Var	Yok	Orta derecede patojenik, uzun inkübasyon, GIS semptomu pek yok, düşük kas larva invazyonu, "nurse cell" 42. günde
<i>T. pseudospiralis (T4)</i>	Kosmopolit	Silvatic, bazen domestik	Memeliler, kuşlar	Orta	Yok	Yok	Sadece 1 insan ögusu bildirilmiş, "nurse cell" formasyonu yok
<i>T. murrelli (T5)</i>	Nearktik alanların ılıman bölgeleri	Silvatic	Etçiller	Düşük	Var	Düşük	Rapor edilmiş insan infeksiyonu yok, "nurse cell" formasyonu 4 aydan önce gerçekleşmez
<i>T6 izolatı (T6)</i>	Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgeleri	Silvatic	Etçiller	Düşük	Var	Yüksek	İnsan infeksiyonu bilinmiyor, "nurse cell" formasyonu 32. günde
<i>T. nelsoni (T7)</i>	Tropikal bölgeler	Silvatic	Etçiller, bazen domuzlar	Yüksek	Var	Yok	Düşük patojenik, ölümcül değil, "nurse cell" formasyonu 40. günde
<i>T8 izolatı (T8)</i>	Güney Afrika	Silvatic	Etçil	Düşük	Var	Yok	İnsan infeksiyonu bilinmiyor, "nurse cell" nurse cell formasyonu 40. günde
<i>T9 izolatı (T9)</i>	Japonya	Silvatic	Etçil	-	Var	-	-
<i>T. papuae (T10)</i>	Papua Yeni Gine	Silvatic	Domuz	Düşük	Yok	Yok	Düşük-orta derece patojenik
<i>Trichinella (T11)</i>	Zimbabve	Domestik ?	Timsah	?	Yok	Yok	-

Avrupa Birliği'ne üye ÷lkelerde 1975-2000 yılları arasındaki vakalar incelendiğinde, insan trichinellosis olgularının %54.3'ünün at eti, %26.1'inin evcil domuz eti ve %19.6'sının ise yaban domuz eti ve et ürünlerinin tüketilmesi sonucu ortaya çıktığı bildirilmiştir (Pozio ve ark.,1998, Anonymous, 2000). At eti tüketimi ile meydana gelen infeksiyonların ana kaynağının özellikle Kanada, Meksika, Polonya, A.B.D ve Yugoslavya'dan ithal edilen at etleri olduğu belirtilmektedir (Boireau ve ark., 2000).

Günümüzde trichinellosisin Balkanlarda, Baltık ÷lkelerinde ve Rusya'da sık olarak gör÷ldüğü bildirilmektedir. Örneğın Romanya'da 1993 yılında 3649 kişinin, 1998 yılında ise 1658 kişinin *Trichinella* ile infekte olduğu Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarında gör÷lmektedir (Dupouy-Camet ve ark., 2000).

A.B.D ve Kanada'da sporadik olgular dışında, domestik tip trichinellosisin gözlenmediği bildirilmiştir. Güney ve Orta Amerika'da ise trichinellosis halen (Arjantin, Şili, Bolivya, Meksika) endemik durumdadır. Arjantin'de 1990'dan 1999 yılına kadar evcil hayvan kaynaklı toplam 517 insan infeksiyonu bildirilmiştir. Amerika kıtasında 1.5 milyondan fazla Amerikalının kas dokusunda *Trichinella* kistlerinin bulunduğu ve her yıl 150.000-300.000 yeni infeksiyonun gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Murray ve ark., 1998). Amerika'da 1991-1996 yılları arasında 230 olgu saptanmış ve bunların üçü trichinellosise bağlı komplikasyonlar nedeniyle (yılda ortalama 38 olgu) kaybedilmiştir (Moorhead ve ark., 1999). Alaska ve Kanada'daki insan infeksiyonlarının ise özellikle infekte ayı etlerinin tüketilmesi ile oluştuğu bilinmektedir (Campbell ve ark., 1994).

Asya'da ve Pasifik Okyanusu'nun kenarındaki bölgelerde de insan trichinellosis infeksiyonlarına rastlanılmaktadır. Dünyada trichinellosisin en fazla gör÷ldüğü yerlerden biri

Çin'dir. 1964 ile 1998 yılları arasında Çin'de toplam 500 salgında 25.000 insanın infeksiyondan etkilendiği ve 200'ün üzerinde insanın hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 2000). Tayland' da ise son 27 yıl içinde rapor edilen 120 salgında 6700 kişi infekte olmuş ve 97 kişi bu infeksiyon nedeniyle ölmüştür (Takahashi ve ark., 2000). Japonya'da meydana gelen birkaç salgın ve sporadik vaka, infeksiyonun başka bölgelerden kaynaklandığı şeklinde açıklanmaktadır (Pozio ve ark., 2000d). Kore'de 1997 yılında *T. spiralis* ile infekte bir tek vaka bildirilmiştir (Sohn ve ark., 2000). Avusturalya'daki tek insan trichinellosis vakası ise 1994 yılında yeni Zellenda'da, Tazmania'ya yolculuk eden bir kişide tespit edilmiştir (Andrews ve ark., 1994).

Orta Doğu ve Afrika'da da insan trichinellosis infeksiyonları mevcuttur ve genellikle *T. spiralis* ve *T. nelsoni* kaynaklı vakalar gözlenmektedir. Lübnan'da 1992 ve 1997 yıllarında görülen iki domestik trichinellosis salgınında birçok insan infeksiyondan etkilenmiştir. Kuzey Afrika'da sadece Mısır'da evcil türlerle oluşan ve domuz ve köpeklerde rastlanan infeksiyonlar görülmektedir (Mikhail ve ark., 1994; Azab ve ark., 1988).

Türkiye'de trichinellosis :

Türkiye'de ilk insan trichinellosis salgını 1977 yılında Merdivenci ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Kastamonu ilinde avlanan bir yabani domuzun İstanbul Kumkapı'da oturan Ermeni ailelerine satılması ve bu etin az pişmiş olarak yenilmesi sonucu, 13 kişilik bir ailenin hastalandığı ve ağır klinik belirtileri olan bir kadın hastanın gastroknemius kasından yapılan biyopside *Trichinella* larvalarının saptandığı bildirilmiştir (Merdivenci ve ark., 1977).

İstanbul'da 1997 yılı şubat ayında, Bulgar göçmenlerinin Bulgaristan'dan getirdiği belirlenen ev yapımı sosis örneğinde *Trichinella* larvalarına rastlanılmıştır. Söz konusu mamullerin satın

alındığı ve daha çok Bulgaristan'dan gelen et ürünlerinin satıldığı açık hava pazarlarında incelemeler yapılmış, fakat alınan örneklerde larvalar belirlenememiştir (Bostan ve ark., 1999).

Güralp'e göre Türkiye'deki yaban domuzu popülasyonu yaklaşık 150.000 civarındadır. Yapılan çalışmalarda Toros dağlarından avlanan 76 yaban domuzundan birinde, Bolu, Kastamonu, Balıkesir ve Bursa bölgelerinden toplanan 1165 yaban domuzunun ikisinde *Trichinella* larvaları tespit edilmiştir (tür ayrımı yapılmamıştır). Ege bölgesinden toplanan 81 yaban domuzunun ve İstanbul'daki 535 çiftlik domuzunun hiçbirisinde *Trichinella* larvalarına rastlanmamıştır (Güralp, 1995). Merdivenci'nin bildirdiğine göre 1971 yılında Rommel tarafından, Ankara Polatlı' da yabani domuzlarda (*Sus scrofa lybicus*) *Trichinella* enfeksiyonu saptanmıştır (Unat, 1995).

6. PATOGENEZ

Trichinellosisdeki lezyonların patolojik mekanizmaları karışıktır; konaktaki *Trichinella*'nın evrimsel safhalarıyla (enteral, parenteral, muskuler) ve parazitten antijen salınımı sonucu tetiklenen immunopatolojik olaylarla ilişkilidir.

Akut evredeki semptomların temelini erken tip hipersensitivite reaksiyonu oluşturmaktadır. Bu reaksiyon metabolik bozukluklar ve organ patolojileri oluşmadan ortaya çıkar. Artan immunkompleksler, mast hücrelerini uyararak hücrel mediatörlerin (PG, trombosit kemotaktik faktör) ve diğer preforme mediatörlerin (histamin, kinaz proteaz, eosinofil kemotaktik faktör vb.) salınımını tetiklemektedir. Bu mediatörler özellikle bozulmuş mikrosirkülasyondan sorumludurlar. Histamin, serotonin, SRS-A, bradikinin ve prostaglandinlerin (PGE2, PGD2, PGJ2) salınımı ile, kapiller permeabilite artar. Böylece

doku çevresinde sıvı, elektrolit, albumin ve diğer hücre elementleri birikir. Bu durum özellikle göz çevresindeki doku ödeminin ana sebebi olarak gösterilmektedir (Kociecka, 2000).

İntravasküler trombüs oluşumu, muhtemelen eozinofili ile ilişkilendirilmiş hiperkoagülabilitenin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Medrano ve ark., 1988; Fourestie ve ark., 1993). Kendini vaskülit şeklinde gösteren bu durum özellikle göz sklerası, tırnak yatakları, miyokard, akciğer, beyin, barsak mukozası ve kaslarda görülen hemorajilerin ana oluşum mekanizmasıdır.

Ateş, immunkompleks oluşumunun bir sonucudur. Yüksek miktardaki serotonin nedeniyle nötrofil miktarı artmakta ve bu enflamatuvar hücrelerden açığa çıkan IL-1'in hipotalamusu uyarmasıyla ateş ortaya çıkmaktadır (Kociecka, 2000).

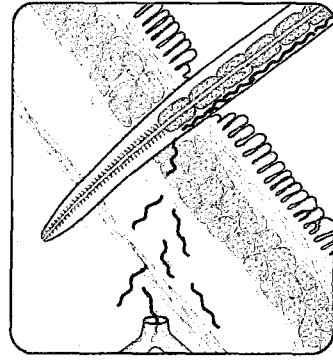
Kas ağrılarının, direkt olarak *Trichinella* larvalarının invazyonu sonucu ortaya çıktığı açıklanmıştır. Ayrıca indirekt olarak da, kinin aktiviteleri ve metabolik bozukluklar yoluyla mikrosirkülasyonda ve kas dokusunda oluşan patomorfolojik hasarlanmaların ağrı etiolojisinde rol alabileceği bildirilmektedir (Kociecka, 2000).

6. Organ patolojileri

Parazit, ağız yoluyla alınmayı takiben barsağa invaze olur ve oluşan larvalar kan yoluyla tüm vücuda yayılarak (Şekil 4) organlarda patolojik değişimleri başlatırlar.

Barsak patolojisi

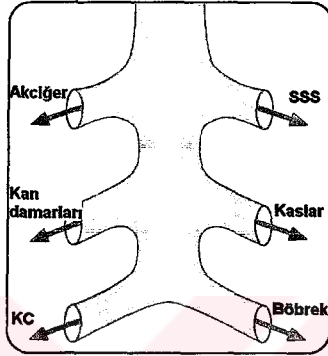
Erişkin *Trichinella* larvalarının hasarlanması ve barsak lümeninden temizlenmesi sistemik veya lokal konak reaksiyonlarıyla sağlanmaktadır. Barsak patolojileri invazyonun farklı safhalarında meydana gelir.



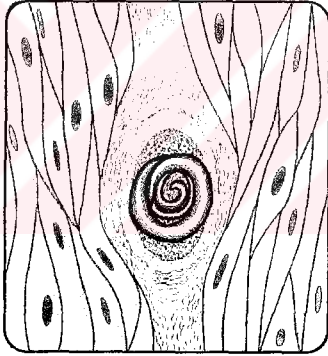
Invazyon



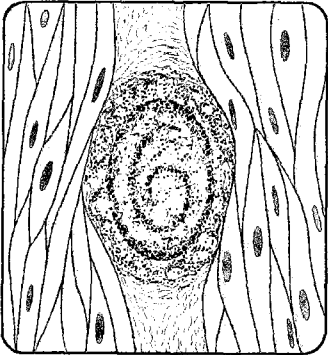
Yayılım



Lokalizasyon



Organizasyon



Şekil 5: *Trichinella* larvalarının kan ve lenf yoluyla tüm vücuda yayılımı
(Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. 2001)

1- Erken invazyon dönemi: İnfeksiyonun ilk birkaç gününde lamina propriada toplanan T ve B lenfositleri, mast hücreler gibi hücrelerin infiltrasyonu ile parazitin uzaklaştırılması amaçlanmaktadır.

2- Akut infeksiyon dönemi: Bu safhada görülen intestinal patoloji, immun yanıtta bağımsız olarak oluşan fizyopatolojik ve morfolojik lezyonlar şeklindedir.

a- Fizyopatolojik lezyonlar:

Barsak motilitesinde değişiklik (diyare, konstipasyon), absorpsiyon bozukluğu ve lamina propriada hücrel infiltrasyon oluşur. Burada özellikle liberkün kriptalarının tabanındaki enterochromaffin hücrelerce salınan intestinal enzimler ve hormonlar rol alırlar. Yapılan deneysel çalışmalarda vazointestinal peptit (VIP) ve sekretin salınımının azaldığı gösterilmiştir (Dembinski ve ark., 1979; Kociecka ve ark., 1985).

b- Morfolojik lezyonlar:

Özellikle jejunumun lamina propriasında villus kaybı, liberkün kriptalarında hiperplazi ve submukozada yoğun hücrel infiltrasyon (mononükleer, plazma hücreleri) oluşur. Çoğu hastada gözlenen bu değişikliklere infeksiyonun 65. gününde bile rastlanabilmektedir (Kociecka ve ark.,1981; Gustovska ve ark., 1983).

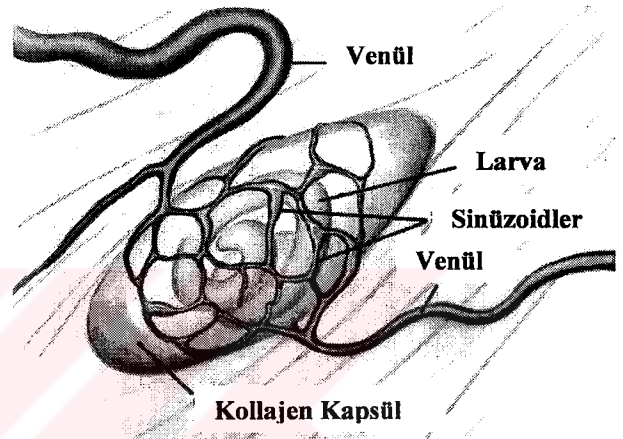
Kas patolojisi

Larvaların kas hücresi içine girmesiyle patolojik, ultrastrüktürel ve biyoelektriksel değişimler oluşur. Kas hücresinde üç önemli değişiklik meydana gelir. Bunlar bazofilik transformasyon, larvanın enkapsülasyonu ve kapiller ağ oluşumudur (Şekil 6).

Bazofilik transformasyon; sarkomer miyofibrillerinin görünmez hale gelmesi, sarkoplasmanın bazofilik dönüşümü ve nükleusun merkezi hal alması, nükleolusun irileşmesi gibi nükleer

değişimler olarak tanımlanmaktadır (Ko ve ark., 1992; Jasmer, 1993). Etkilenen hücrelerin bir kısmında gözlenen bu değişiklikler larvanın yuvalanmasını, gelişimini ve sonraki yaşamını kolaylaştıran zemini hazırlamaktadır. “Nurse cell” olarak da adlandırılan bu yeni tip hücre ve larva kompleksi konak dokular arasında ayrı bir kalıcı yapı olarak uzun yıllar canlı kalabilmektedir (Despommier, 1993).

Larvanın enkapsülasyonu ise infeksiyonun 18-20. günlerinde başlamaktadır. Kapsül, larva ve larvanın etrafını saran, bazofilik değişim sergileyen sarkoplasma fragmanlarından meydana gelir. Bu oluşumla paralel olarak da etkilenen kas hücresi etrafında kapiller ağ oluşumu gözlenmektedir (Baruch ve ark., 1991).



Şekil 6: Kas hücresinde *Trichinella*'nın kapsülasyonu

Ultrastrüktürel değişiklikler arasında, ribozom ve mitokondri sayısında artış, granülsüz endoplasmik retikulumun proliferasyonu, golgi cisimciklerinin stimülasyonu ve DNA-RNA miktarlarındaki artış sayılabilir (Gustowska ve ark., 1989; Jasmer, 1993). Kas hücresinde oluşan bu hasarlanmalar, biyoelektriksel değişimleri de beraberinde getirir. Buna bağlı olarak, etkilenen bölgelerde çoğu kez anormal elektromyografik (EMG) ve elektronörografik (ENG) bozukluklar ortaya çıkar (Kociecka ve ark., 1975; Cruz ve ark., 1989).

Kalp patolojisi

Trichinella larvaları kalp kas hücresi içinde kapsülasyonu oluşturmamaktadır. Morfolojik hasar, larvanın geçişi esnasında meydana gelir. Lezyonlarda çoğu zaman eozinofil ve mononükleer ağırlıklı fokal sellüler infiltrasyon gözlenmektedir. Bu değişiklikler erken

dönemde gözlenebilirse de genellikle infeksiyonun 4. ve 8. haftaları arasında oluşur. Eozinofilik myokardit gelişimi, granuloma oluşumu ve sık olarak da konnektif doku proliferasyonu ile birlikte seyreder (Kociecka, 2000).

Göz patolojisi

Oküler patoloji, değişik karakterlerde olmakla birlikte lezyonlar sıklıkla akut infeksiyon sırasında ve bozulan mikrosirkülasyon sonucu meydana gelmektedir. Retina lezyonlarının, göç eden larvaların retinanın silier arteriollerine ve santral arterlere penetre olmasına bağlı olduğu bildirilmektedir (Kociecka, 2000).

Yoğun invazyonlar esnasında oluşan anjiomiyozit tipi lezyonların bir sonucu olarak göz kaslarının fonksiyonlarında bozukluk oluşur. Ayrıca bu lezyonlara bağlı olarak, ağrılı göz hareketi, göz kaslarında paralizisi, diplopi ve akomodasyon bozuklukları da meydana gelmektedir (Kociecka, 2000).

Solunum sistemi patolojisi

İnfeksiyonun erken ve geç dönemlerinde solunum sisteminde bozukluklar gözlenebilmektedir. Erken dönem belirtileri larvanın göçü esnasındaki immunopatolojik olaylara bağlıdır. Perialveoler damarlar çevresinde hemorajik lezyonlar, vasküler trombozis ve hücrel infiltrasyon (eozinofil, lenfosit) gözlenir (Kociecka, 2000). Geç dönem belirtileri ise daha çok bakteriyel kaynaklı pnömoni, plörit gibi infeksiyonlar sonucu ortaya çıkar (Pawlowski, 1983).

Sinir sistemi patolojisi

Merkezi sinir sistemindeki bozukluklar, vaskülit ve perivaskülit tipi lezyonlarla ilişkilidir. Lezyonlar fokal veya diffüz olabilir. Çok şiddetli infeksiyonlarda, larvanın kan damarlarından doku içine penetre olabileceği bildirilmiştir (Kociecka ve ark., 1987).

Böbrek patolojisi

Böbrek hasarlanması genellikle çok şiddetli infeksiyonlar esnasında gözlenmektedir. İncelenen biyopsi materyallerinde proliferatif glomerulonefrit tipinde mezenşiyal lezyonlar görülür. Ölümle sonuçlanan çok şiddetli bir *Trichinella* infeksiyonunda, postmortem olarak böbrek loop epitelinde nekrozlara rastlanmıştır (Kociecka ve ark., 1987).

7. KLİNİK

Trichinellosis insanlarda farklı şiddette bulgularla seyreden, farklı klinik tabloların ortaya çıktığı bir sendromdur. Bu sendromun şiddeti invazyonun genişliğine, *Trichinella*'nın türüne, konağın yaşına, cinsiyetine ve immun yanıtına göre farklılık gösterir (Kociecka, 2000).

Temel olarak, ani gelişen yüksek ateş, yüzde ödem ve miyalji gözlenen hastalarda trichinellosis infeksiyonundan şüphelenilmelidir. Ancak bu belirtilerin gözlenmediği sporadik vakalarda tanıya gitmek daha zordur. Trichinellosiste görülen tüm klinik belirtiler Tablo 2' de gösterilmektedir.

Geleneksel olarak trichinellosisin 5 farklı klinik formu tanımlanmıştır

- 1- **Şiddetli form:** Tüm tipik semptomların yanında hipoalbuminemi, hipoproteinemi gibi belirtiler ve nörolojik- kardiyovasküler komplikasyonlar mevcuttur.
- 2- **Orta şiddetli form:** Tüm tipik semptomların bazılarının daha az şiddetli gözlendiği klinik tablodur. Komplikasyonlar daha nadir ve daha az şiddette gözlenir.
- 3- **Hafif seyirli form:** Orta şiddette semptomların görüldüğü ve komplikasyonların gözlenmediği formdur. Tanı için serolojik testler zorunludur.

Tablo 2: İnsan trichinelosisinde ana klinik ve biyolojik özellikler (Pozio ve ark., 2003b)

Klinik semptom ve belirtiler	Salgınlarda görülme sıklığı (%)	Görülme süresi
Diyare ve karında şişkinlik	0-40; <i>T. nativa</i> için %100	1-7 gün (<3 hafta)
Karın ağrısı	6-60	1-7 gün
İştah kaybı	70-85	2-4 hafta
Kusma	5-10	1-2 gün
Genel halsizlik	85-97	1-4 hafta
Miyalji	59-97;	2-3 hafta
Baş ağrısı	<i>T. nativa</i> için %25-60 80-90	2-3 hafta (<5hafta)
Ateş (>40 °C)	41-100	1-2 hafta
Aşırı terleme	45-60	1-2 hafta
Gözkapağı ödemi	80-90	5-7 gün
Perioküler ödem	17-100;	5-7 gün
Hareketle göz ağrısı	<i>T. nativa</i> için %0 77	5-7 gün
Yüz ödemi	43-88	5-7 gün
Ekstremitelerde ödem	6-8	5-7 gün
Kutenöz raş	4-51	3-5 gün
Peteşi	2-12	2-4 gün
İntrakonjuktival kanamalar	56-73	3-5 gün
Tırnak yatağı kanamaları	49-65	3-5 gün
Miyokardit	5-20	1-2 hafta
Nörolojik komplikasyonlar	3-60	2-4 hafta
Laboratuvar		
Eozinofili	99	1-10 hafta
Lökositoz	99	1-8 hafta
CPK yüksekliği	75-90	3-7 hafta
LDH yüksekliği	60-80	2-6 hafta
Serokonversiyon	100	2-8 hafta

- 4- Abortif form: Klinik bulgular bir sendrom şeklinde olmaksızın tek tek ortaya çıkar. Çoğu zaman birkaç günde gerileyen bu belirtilere, genellikle eosinofili eşlik eder. Tanı için spesifik serolojik testler zorunludur.
- 5- Asemptomatik form: Eosinofili varlığı ve infekte et yeme öyküsü dışında klinik bulgulara rastlanmaz. Tanı ancak spesifik serolojik testlerle konulur.

İnkübasyon periyodu

İnkübasyon periyodunun uzunluğu, *Trichinella*'nın türüne, alınan larva sayısına, etin yenme sıklığına, etin nasıl hazırlandığına (pişmemiş, az pişmiş) bağlı olarak değişkenlik gösterir. İnkübasyon periyodu çoğu zaman klinik semptomların şiddetiyle ilişkilidir. Şiddetli formlarda inkübasyon, bir hafta kadar kısa bir süre iken, orta şiddetli formlarda bu süre 2 haftaya, selim seyirli infeksiyonlarda 2-3 haftaya ve abortif formlarda ise yaklaşık 30 güne kadar uzayabilir. İnkübasyon periyodu boyunca görülen diyare ve karın ağrısı şikayetleri, klinik semptomlardan ve tipik şikayetlerden 4-5 gün önce başlar (Kociecka, 2000).

Akut trichinellosis

Klinik genellikle genel durumun bozulması, baş ağrısı, yüksek ateş, döküntü ve aşırı terleme gibi bulgularla ortaya çıkar. Akut trichinellosisde tipik semptomlar; yaygın ya da lokal kas ağrıları, yüzde yaygın ödem (fasiyal ödem), göz kapaklarında ödem ve kaşıntıdır. Geçici baş dönmeleri ve bulantılar olabilir. Diyare ve hemorajilere (konjunktival, subungal) daha az sıklıkta rastlanmaktadır.

Ateş, trichinellosisin en erken belirtisidir ve çoğu kez bulunur (%41-100). Vücut sıcaklığı hızlı bir şekilde 39-40°C ye yükselir ve şiddetli formlarda 3 hafta boyunca devam edebilir.

Periokuler ve fasiyal ödem trichinellosis için son derece tipiktir (%17-100). Fakat bu bulguların yoğunluğu infeksiyona yanıt olarak gelişen allerjik reaksiyonun şiddetine bağlıdır. Şiddetli infeksiyonlarda ödem, üst ve alt ekstremitelerde de gözlenebilir. Simetrikdir ve genellikle, glukokortikoid tedavisiyle 5-6 gün içinde hızlı bir gerileme gösterir (Kociecka, 2000).

Kas ağrıları, birçok kas grubunda gözlenebilmektedir (%74-97). Ağrının şiddeti infeksiyonun şiddetine bağlıdır. Kas tutulumu, en sık olarak çiğneme kasları, servikal kaslar, deltoit ve gastroknemius gibi üst ve alt ekstremitte kaslarında görülür. Çiğneme kaslarındaki ağrı daha azdır. Normalde kas ağrısı egzersizle oluşurken, flebit komplikasyonu gelişmiş hastalarda ve ağır trichinellosis olgularında, dinlenme anında bile ağrı mevcuttur. Bazı şiddetli vakalarda, nöromusküler hasarlanmalar ve anjiomyozit tipi lezyonlar sonucunda hareket kısıtlılığı meydana gelebilmektedir. Hareket kısıtlılığı özellikle diz ve dirsek eklemlerinde kontraksiyonlara neden olabilir. Ayrıca nadir rastlanan, çiğneme kaslarındaki pseudorijiditeye bağlı olarak oluşan trismus, trichinellosis için tanı koydurucudur (European Commission, 2001).

Barsak semptomları olarak karın ağrısı ve ishal görülür. İshal günde 10-15 kez olabilen kansız-mukuslu dışkılama şeklindedir. Sürekli ishale bağlı olarak elektrolit, protein ve albumin kaybı hastaların genel durumlarında bozulmalara yol açabilmektedir. Diyare hastaların %6-60'ında gözlenmektedir.

Hemoraji, hastalıktaki patolojik süreçler sonrası meydana gelen vaskulitin bir sonucudur. Kanın damar dışına kaçışı sonucunda özellikle konjunktivalarda ve tırnak yataklarında gözlenir. Hastaların yaklaşık %25'inde bu bulgulara rastlanmaktadır.

Komplikasyonlar

T. spiralis, *T. nativa*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli* ve *T. nelsoni* türleriyle oluşan insan infeksiyonlarında komplikasyonlara bağlı ölümlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Owen ve ark., 2001). Komplikasyonlar genellikle şiddetli infeksiyonlarda gözlenir. İleri yaşlarda veya uygunsuz tedavi almış kişilerde görülen orta şiddetli infeksiyonlarda da meydana gelebilir ve bu komplikasyonlar ölümlerle sonuçlanabilir.

• Kardiyovasküler komplikasyonlar

Kardiyovasküler komplikasyonlar, genellikle şiddetli ve orta derece infeksiyonlarda; infeksiyonun 3. ve 4. haftaları esnasında meydana gelir. En sık miyokardit şeklinde olan bu komplikasyonlar, hastaların %5-20'sinde gözlenebilmektedir. Göğüs bölgesinde ağrı, taşikardi ve EKG değişiklikleri (T düzleşmesi, QRS ve ST çökmeleri, AV-İV iletkenliklerinde bozulmalar) sık gözlenen bulgulardır. EKG değişiklikleri, özellikle başlangıç safhasındaki yoğun diyareler sonucu oluşan hipoproteinemi ve hipokalemi nedeniyle meydana gelmektedir. Potasyum açığının kapatılması ile çoğunlukla EKG'deki bozukluklar düzeltilebilmektedir (Pozio ve ark., 2003b).

Kardiyovasküler komplikasyonların en ciddi olanı derin ven trombozu, intraventriküler tromboz ve pulmoner emboli gibi klinik semptomlara yol açan tromboembolik hastalıktır. Pulmoner arter embolizasyonu ve şiddetli taşikardi sonucu ani ölümler bildirilmiştir.

Nörolojik komplikasyonlar

Baş ağrısı, hemen hemen tüm hastalarda mevcuttur. Baş dönmesi, bulantı, kulak çınlaması geçicidir. Şiddetli infeksiyonlarda, apati, uyku hali, somnolans, anisokoria, fasiyal sinir paralizisi ve Babinski pozitifliği de gözlenebilir.

Bazı hastalarda menenjit ve ansefalopati belirtileri bulunabilir. Ansefalopati, ateşin başlangıcından sonraki birkaç gün içinde, dezoryantasyon, hafıza fonksiyonlarında kayıp, frontal sendrom, davranış bozuklukları, geçici hemiparezi-hemipleji, okülomotor disfonksiyon ve afazi gibi belirtilerle kendini gösterir. Ansefalopati gözlenen hastaların MRI ve CT grafilinde, küçük hipodens alanların mevcut olduğu gösterilmiştir (Pozio ve ark., 2003b).

Kas gücünde azalma, yutma güçlüğü, tendon reflekslerinde azalma, trismus gibi nöromuskuler bozukluklar, genellikle hastalığın başlangıç döneminde gözlenmekte ve uzun süre devam edebilmektedir. Nörolojik bulgular ve semptomlar, hastaların %3-46'nda gözlenmektedir. Erken dönemde antihelmintik ve glukokortikoid tedavisi alan hastalarda nadir olarak rastlanır (Pozio ve ark., 2003b).

İyileşme dönemi

İnfeksiyonun iyileşme dönemi 5-7. haftalarda başlar. Bu döneme geçiş tipik semptomların kaybolması ve laboratuvar değerlerinin normale dönmesi ile olur. Bu dönem sıklıkla kronik yorgunluk ve kalıcı kas ağrıları şeklinde devam eder. Nörolojik komplikasyonların gözlendiği hastalarda 4.ve 8. haftalar arasında CT ve MRI da gözlenen anormallikler kaybolur, fakat konfüzyon, depresyon ve motor problemler devam edebilir (Kociecka, 2000; Pozio ve ark., 2003b).

Kronik trichinellosis

Kronik trichinellosis, çok iyi tanımlanmış olmasa da genel olarak akut infeksiyon sonrası 6. ayı ve ileriki dönemi belirtmektedir. Kronik trichinellosisli hastalarda kronik miyalji, aşırı terleme, depresyon, paranoya gibi semptomlar akut safhadan sonra aylarca ve hatta yıllarca devam edebilmektedir. Özellikle şiddetli infeksiyonlardan sonra görülen bu semptomlar daha

çok, erken dönemde tedavi almayan veya hiç tedavi uygulanmamış hastalarda gözlenmektedir. Akut infeksiyondan 10 yıl sonra bile devam eden kas güçsüzlüğü, konjunktivit, bozulmuş koordinasyon ve IgG yükseklikleri bildirilmektedir. Klinik semptom ve belirtiler vermeyen bir hastanın kasında, infeksiyondan 39 yıl sonra canlı larvaların bulunduğu ve kasta yaşayan bu larvalara bağlı olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu, biyoelektrik bozuklukların gözlendiği bildirilmiştir (Harms ve ark., 1993; Froscher ve ark., 1988).

8. TANI

Trichinellosis tanısında aşağıdaki kriterler göz önüne alınmalıdır.

- 1- Epidemiyolojik anamnez (infeksiyonun kaynağı, yenilen infekte etin miktarı, infekte etteki larva sayısı, epidemik bölgedeki hasta sayısının belirlenmesi)
- 2- Klinik değerlendirme (akut dönem bulgu ve semptomlarının var olup olmadığının belirlenmesi, tedavi seçimi için önemli olan hastalık sınıflandırmasının yapılması)
- 3- Laboratuvar testleri
 - a- Periferik kanda lökosit, eozinofil varlığı
 - b- Konfirmasyon (lökosit ve eozinofilden başka)
 - c- Serolojik tanı
- 4- Kas biyopsisi gösterilmektedir.

Gerek salgın, gerekse sporadik vakalar şeklinde gözlenen insan akut trichinellosis olgularının tanısında ve değerlendirilmesinde; algoritma, değerli bir rehber olarak kullanılır (Tablo 3).

Tablo 3 : Akut trichinellosis şüpheli bir hastada kullanılan tanı algoritması (Pozio ve ark., 2003b).

Grup	Karakteristik özellikler
A	Ateş, Yüz ve/veya göz ödemi, Miyalji
B	Nörolojik bulgular, Kardiyolojik bulgular, Konjuktivit, Subungal hemorajiler, Kutenöz raş, Diyare
C	Eozinofili (>1000/mm ³) Total IgE düzeylerinde yükseklik, Kas enzimlerinde yükselme
D	Pozitif seroloji (yüksek spesifiteli bir testle belirlenmiş), Serokonversiyon, Pozitif kas biyopsisi

Değerlendirme:

Çok az olası	: Bir A veya bir B veya bir C
Şüpheli Olgu	: Bir A + bir C veya İki B + bir C
Olası Olgu	: Üç A + bir C
Kuvvetle Olası Olgu	: Üç A + iki C
Kesin Olgu	: Üç A + iki C + bir D veya Bir A + bir C + bir D veya Bir B + bir C + bir D

TRİCHİNELLOSİSDE LABORATUVAR

Biyokimyasal Testler

Lökositoz ve eozinofili:

Trichinellosisde tipik olarak lökositoz görülür. Lökosit sayısı 15.000-30.000/mm³ düzeylerine ulaşabilmektedir. Lökositoz hastalığın erken döneminde ortaya çıkar ve 2.-5. haftalar arasında hızlı bir yükselme gösterir. Klinik semptomların kaybolmasıyla birlikte eosinofil oranlarında düşme olmaksızın lökosit sayısında bir gerileme gözlenir (Capo, 1996; Kociecka, 2000).

Eosinofili, hemen hemen tüm trichinellosis infeksiyonlarında gözlenen bir bulgudur. Genellikle hastalık belirtileri ve klinik tablo ortaya çıkmadan kendini gösterir. Hastalığın 2.-5. haftaları arasında yükseliş göstererek, 1000-19000/mm³ düzeylerine ulaşır. Kan eozinofil düzeylerindeki düşmeler yavaş bir şekilde olur ve 3 aya kadar yüksek kalabilir. Eozinofil düzeyleri ile hastalığın kliniği arasında bir korelasyon gösterilememekle birlikte çok şiddetli infeksiyonlarda eozinopeni görülebildiği bildirilmiştir. Bunun mekanizması tam olarak açıklanamasa da kan düzeylerinde değişim gözlenen GM-CSF ve IL-3 gibi bazı sitokinlerin eozinopeni mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir (Kociecka, 2000).

Kas enzimleri

Trichinellosis esnasında başta kreatin fosfokinaz (CPK), laktat dehidrogenaz (LDH), aldolaz ve aspartat aminotransferaz (AST) olmak üzere, tüm kas enzim aktivitelerinde yükselme görülür. Hastaların yaklaşık %75-90'ında infeksiyonun 2. ve 5. haftaları arasında serum CPK aktivitesinde yükselme (1-10kat) gözlenir. Serum CPK düzeyleriyle, infeksiyonun klinik şiddeti arasında bir ilişki bulunamamıştır, fakat kas ağrılarının yoğunluğuyla CPK düzeyleri arasında bir korelasyon olduğu düşünülmektedir (Pozio ve ark., 2003b).

Hastalığın 1. ve 6. haftaları arasında serum LDH düzeylerinde yükselme görülür. Fakat bu yükselmeler CPK oranlarıyla kıyaslandığında daha düşüktür ve infeksiyonun şiddetiyle bir korelasyon göstermemektedir. Serum AST düzeylerinde yükselme her trichinellosis infeksiyonunda gözlenmese de, tanıda diğer enzimlerle birlikte kullanılabilir (Kociecka, 2000).

Serolojik tanı

Testlerin performansını etkileyen faktörler

a- Antijenin doğası

Trichinella antijenleri köken aldıkları yerlere göre surface (yüzey), somatik ve ekskretuar/sekretuar (ES) antijenler olarak sınıflandırılırlar. Yüzey antijenleri, esas olarak dış kutikül kaynaklıdır. Somatik antijenler ise, parazitin iç ve dış yapısal organelleriyle ilişkili olup ortaya çıkabilmesi için parazitin ölmüş olması gerekmektedir. ES antijenleri stichosomun ekskretuar granüllerinden salınırlar (Dea-Ayuela ve ark., 1999).

Testlerde kullanılan antijenleri elde etmek için genellikle kaslardaki larvalar (ML) kullanılmaktadır. Diğer iki parazit şekli (erişkin, yeni doğan larva) ise pürifiye edilmelerindeki zorluklar nedeniyle daha az tercih edilmektedir.

Kas larva antijenleri, günümüzde TSL-1 den TSL-8 kadar olmak üzere sekiz ana grupta toplanmaktadır. TSL-1 antijenleri, yapılarında bulunan karbonhidrat epitopu (tyvelose) nedeniyle immun sistem tarafından oldukça iyi tanımlandıkları için son derece önemlidirler (Ortega ve ark.,1996). Bu yüzden TSL-1 antijen ailesini içeren ES ve larva yüzey antijenleri, serolojik tanı testlerinde daha sık tercih edilmektedir (Gamble ve ark.,1983).

Solubl antijenler (surface-somatik):

Pürifiye edilmiş kas larvalarını direkt olarak birçok kez dondurup-çözme ve homojenize etme işlemi sonrasında elde edilirler. Ağır partiküllerin 100.000 g' de 10 dakika santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatant, krut solubl antijenleri içermektedir. Bu gibi antijenler, ELISA testi için çok spesifik sonuçlar vermemesine rağmen Wb veya

hemaglutinasyon testlerinde kullanılabileceği bildirilmektedir (Dea-Ayuela ve ark., 1999; Patrascu ve ark., 2001).

Ekskretuar -sekretuar (ES) antijenler:

Canlı pürifiye kas larvalarının antibiyotikli kültür besiyerleri içinde bekletilmesi esnasında, larvalar tarafından ES ürünler ortama salınır. ES antijeni krut solubl antijenlere oranla daha az duyarlılıkta olmakla birlikte daha spesifiktir. Türler arasında çok düşük çapraz reaksiyon göstermesi, ES antijeninin kullanımını artıran diğer bir faktördür (Gamble ve ark., 1996).

b- Antikor yanıtı oluşum süresi

Trichinella invazyonunun erken evresinde antikor yanıtının gösterilemediği bir “pencere dönemi” bulunmaktadır (Nöckler ve ark., 1995; Nöckler ve ark., 2000). *Trichinella*'ya karşı oluşan antikor yanıtı, genellikle duyarlılığı yüksek testlerle enfeksiyonun 1. haftasında ortaya konabilmektedir.

Konağın düşük virülanstaki *Trichinella* suşlarıyla (*T. britovi*) veya düşük sayıda larva ile enfekte olduğu durumlarda, serolojik testlerle yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir (Gamble, 1996; 1998).

• Antikor aranması ile ilgili testler:

Trichinella antijenlerine karşı oluşmuş antikorları aramaya yönelik testler başarıyla kullanılmaktadır. Bu testler arasında Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Competitive Inhibition Test (CIA), Immunoblotting (IB) veya Western Blotting (Wb), Complement Fixation Test (CFT), Counterimmunoelectrophoresis (CIE) ve Latex Agglutination gibi teknikler yer almaktadır (Kociecka, 2000).

Günümüzde yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olan ELISA ve İmmunoblotting testleri sık olarak kullanılmaktadırlar. IFAT, CFT ve hemaglutinasyon testleri gibi indirekt tanı testleri, gerek özel ekipman ve özellikli personel gerektirmeleri, gerekse standartizasyon zorluğu nedenleriyle çok tercih edilmeyen testlerdir (European Commission, 2001).

ELISA testi, günümüzde ELISA-IgG ve ELISA-IgM testleri trichinellosisin serolojik tanısında en çok kullanılan serolojik testler konumundadır. Özellikle ELISA ve IFAT'lerinin birlikte kullanımı, gerek klinikte, gerekse epidemiyolojik araştırmalarda oldukça güvenilir sonuçlar verebilmektedir (Feldmeier ve ark., 1987; Dupuoy-Camet ve ark.,1988).

ELISA testi kullanılarak kandaki *Trichinella* spesifik IgG, IgM ve IgE tipi antikorları son derece hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Bu şekilde 100 gram dokuda birden daha z larvanın olduğu infeksiyonların bile tanımlanabildiği belirtilmektedir (Nöckler ve ark., 2000). ES antijeni kullanarak hazırlanan IgG-ELISA testinin duyarlılığının %100, IgM-ELISA testinin duyarlılığının %93.33 ve IgE-ELISA duyarlılığının ise %100 olduğu bildirilmektedir. İnsan trichinellosisinde infeksiyondan 1 ay sonra maksimum duyarlılık elde edilebileceği belirtilmiştir (Morakote ve ark., 1991).

Capture ELISA, yöntemi ile dolaşımdaki antijenler de saptanabilir. Fakat yöntemin bu amaçla kullanımı birkaç konak türü (insan, fare) için sınırlanmış olması nedeni ile sık olarak kullanılmamaktadır (Dubenski ve ark., 1994).

CIA ve immunoblotting yöntemleri ise spesifik antikorları tanımlayabilen oldukça spesifik ve sensitif serolojik teknikler olmalarına karşın teknik zorluklar nedeni ile yalnızca doğrulama testleri olarak kullanılırlar. Bu yöntemler, en çok diğer parazitik infeksiyonlarda ve otoimmün

hastalıklarda oluşan ve ayrıca fosforilkolin antijenlerinin varlığında gözlenebilen yalancı pozitif ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde yararlanılan alternatif yöntemler olarak kullanılmaktadır (Kociecka, 2000).

Bugün birçok laboratuvarında doğrulama testi olarak kullanılan Wb testinde antijen olarak ES ve surface antijenlerinin kullanılabilir olması testin değerliliğini daha da artırmaktadır. Yapılan çalışmalarda enfeksiyonun erken dönemlerinde ELISA testinin çok duyarlı olmadığı, bu dönemde Wb yönteminin ise başarıyla kullanılabilirliği bildirilmektedir. Mohannop ve ark.,

ES antijenini kullanarak spesifik antikor yanıtlarını enfeksiyonun 2. haftasından itibaren Wb yöntemiyle gösterebilmişlerdir (Mahannop ve ark., 1992).

CIE ve latex agglutination testleri, 1 saatten daha kısa zamanda sonuç verebilmelerinden dolayı hızlı tanımlama gerektiren enfeksiyon durumlarında tavsiye edilen yöntemlerdir.

Polymerase chain reaction (PCR), ilk kez Bandii ve ark., tarafından 1993 yılında, tek bir *Trichinella* larvasını tanımlayabilen bir teknik olarak kullanıma girmiştir (Bandi ve ark., 1983). Son 10 yıldır PCR bağlantılı metodlar insan ve hayvanlardan elde edilen larvaların genotip tayininde, ayrıca nadiren tanı amacıyla vücut sıvılarında ve dokularda *Trichinella* DNA'sını tespit eden bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Tanı amacıyla PCR'dan, özellikle immünsüpresif hastalarda, diğer tekniklerin yetersiz kaldığı erken dönemdeki hastalarda ve forilkolin antijenlerine bağlı olarak konvensiyonel antikor tarama testleri ile sonuç alınamayan durumlarda, yararlanılmaktadır (Pozio ve ark., 2003a).

• **Dolaşımdaki antijenlerin aranması:**

Kaslardaki *Trichinella* larvalarının stichocytlerinden kaynaklanan 49 ve 53 kDa moleküler ağırlığındaki antijenler, spesifik monoklonal antikorlar ve Radioimmun Assay (RIA) kullanılarak tanımlanabilmektedir (Gamble ve ark., 1984). Dolaşımdaki antijenlerin saptanması parazitin varlığını direkt olarak ispatlaması açısından oldukça önemli olmakla birlikte hastalık ve konak reaksiyonu hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Düşük miktardaki antijenin saptanmasındaki zorluklar ve yoğun antikor varlığında immun komplekslerin oluşması, yöntemin dezavantajları olarak sayılmaktadır. Son zamanlarda bazı araştırmacıların (Dubenski ve ark.,1994) geliştirdikleri dot-ELISA tekniği ile duyarlılık artırılmaya çalışılmışsa da bu teknik, trichinellosis tanısında rutin olarak kullanılmamaktadır. Fakat özellikle standart serolojik testlerin spesifik antikorları saptayamadığı parenteral fazın başlangıcında yararlı olabileceği bildirilmektedir (Nishiyama ve ark., 1992).

Kas biyopsisi:

Kas biyopsisi gerek parazitin kendisini, gerekse parazite bağlı oluşmuş histokimyasal değişiklikleri göstermesi bakımından son derece önemli bir direkt tanı aracıdır. Biyopsi materyalinin ağırlı kastan alınması tercih edilmelidir. Çoğu zaman hastanın deltoid kasından alınan 0.2-0.5 gr kas dokusunun, inceleme yapılıncaya kadar hiçbir fiksatif kullanmadan sadece serum fizyolojik içinde bekletilmesi önerilmektedir (Pozio ve ark., 2003b).

- Direkt Parazitolojik İnceleme :

Alınan kesitsel doku örneklerinin, trişinoskop altında (trişinoskopi) veya lam-lamel arasında direk mikroskop altında incelenmesi şeklindedir. Larva sayısının az olduğu veya larvanın kendi etrafına kıvrılmasının gerçekleşmediği erken dönemde ve ayrıca kapsüle olmayan

türlerin tanısında, kas fibrilleriyle larvanın ayırt edilememesi nedeniyle trişinoskopi önerilmemektedir (European Commission, 2001).

Aktif digestion tekniği ile larvaların serbest kalması ve daha kolay tanımlanması sağlanmaktadır. Bu tekniğin mikroskopik incelemeye göre daha duyarlı olduğu, ancak immatür larvaların yüksek parçalanma riski taşımasından dolayı dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir.

- Histolojik inceleme :

İnfekte kas dokusu, Hematoksilen-Eosin boyası ile boyanarak histolojik olarak incelenir. Çeşitli gelişim evresindeki larva fragmanlarını, kapsül ve onun destrüksiyon bulgularını, kas hücreesindeki bazofilik transformasyonu ve hücreyel infiltrasyon kompozisyonunu tanımlaması yöntemin önemini artırmaktadır. Bazofilik transformasyon özellikle larvanın gösterilemediği durumlarda bile tanı kriteri olarak kullanılmaktadır (Gabryel ve ark., 1995). Tüm bunların yanında histolojik kesitlerin yüksek kalitede olması gerekmektedir.

Direkt tanı metodu olan kas biyopsisi ile en çok kullanılan diğer indirek metodların infeksiyonu saptama açısından karşılaştırmaları aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4 Farklı tanı tekniklerinin bir gram dokuda saptayabildiği larva sayısı (European Commission, 2001)

Larva sayısı/gram	Kullanılan teknik
3	Trişinoskopi (Sadece kapsülasyon gösteren türler için)
1	Digestion metodu
0.1	IFAT
0.01	ELISA antijen arama
0.01	ELISA antikor arama
0.001	PCR

9. AYIRICI TANI

Özellikle trichinellosisli sporadik vakalarda ve atipik olgularda, tanının doğru olarak konulması, erken ve uygun tedavinin uygulanması açısından oldukça önemlidir.

Periokuler ödem, fasiyal ödem ve ateş gibi semptomların görüldüğü akut glomerulonefrit, serum hastalığı, dermatomyozit gibi hastalıklarla ve ilaçlara, allerjenlere karşı gelişen toksiko-allerjik reaksiyonlarla trichinellosisin ayırıcı tanısını yapmak önemlidir. Şiddetli baş ağrısı, çene kilitlenmesi, trismus, konfüzyon, ansefalopati ve ateşle seyreden diğer nörolojik infeksiyonlar yine trichinellosis ile karıştırılmaması gereken klinik bulgulardır. Kaşıntı ve eosinofiliden başka bulgunun olmadığı vakalarda, trichinellosisin toxocariasis ve fascioliasis gibi paraziter hastalıklardan ayırt edilmesi gerekir (Kociecka, 2000).

Perioküler ödemin bulunmadığı, nörolojik bozukluklarla, lökopeni ve eozinopeni ile seyreden ve immunsüpresyondan dolayı antikor yanıtının da oluşmadığı şiddetli infeksiyonlarda yanlış tanı konulabilmektedir. Bu şekildeki infeksiyonlarda kas biyopsisi en değerli tanı aracı konumundadır. Kas dokusunda *Trichinella* larvalarının veya bazofilik değişikliklerin tanımlanması kesin tanı için çok değerlidir (Kociecka, 2000).

10. TEDAVİ

Trichinellosisin etkin tedavisinde antihelmintik, glukokortikoid, immunomodülatör ve protein-elektrolit içeren ilaçlar kullanılmaktadır.

Antihelmintik tedavinin erken dönemde başlanması son derece önemlidir. İnfeksiyonun özellikle ilk 3 gününde kullanılması gastrointestinal lümeninden *Trichinellanın* erken ve etkin bir şekilde elimine edilmesini sağlamakta ve bu şekilde muskuler invazyonun gelişmesi,

hastalığın ilerlemesi önlenmektedir. En tercih edilen antihelmintik ilaçlar arasında benzimidazol türevleri (albendazol, mebendazol, tiabendazol), pirantel ve bu ilaçların kombinasyonları bulunmaktadır (Kociecka, 2000). Akut trichinellosis tedavisinde mebendazol 400mg/gün, 10 gün süreyle veya albendazol 15kg/gün, 10-15 gün süreyle kullanılabilir. Mebendazol ve albendazol erişkinlerde ve 2 yaş üstü çocuklarda kullanılabilirken, hamilelerde kontrendikedir (Kociecka, 2000).

Tiabendazolün 5 gün süre ile 50 mg/kg/G olacak şekilde uygulandığında en etkin ilaç olarak değerlendirildiği çalışmalara rastlanmaktadır. Ancak tolere edilemeyen yan etkileri (başağrısı, bulantı, vertigo) nedeniyle pek fazla tercih edilmemektedir. Hamile kadınlar, çocuklar, böbrek ve karaciğer hastalığı olanlarda kontrendikedir (European Commission 2001; Kociecka, 2000).

Pyrantel, parazitin sinir uçlarındaki iletiyi bloke ederek ve parazit kaslarında paralizasyonu yaratarak etki eden bir ilaçtır. 10-20mg/kg tek doz tedavi 2-3 gün sonra tekrarlanarak uygulanır. Pyrantel, hamilelerde ve çocuklarda güvenle kullanılabilir (Kociecka, 2000).

Glukokortikoidler, infeksiyonun akut döneminde diğer antihelmintik ilaçlarla birlikte kullanılmaktadırlar. Glukokortikoidlerin, dokularda larva invazyonu sonucu gelişen enflamasyonun yan etkilerini azaltması yanında vaskülit, myosit ve hipereosinofili kaynaklı zararlı etkileri ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı özellikle kardiyovasküler ve nörolojik komplikasyonların önlenmesine yönelik olarak, hastalığın akut döneminde sıkça tercih edilmektedirler. Glukokortikoidler 30-60mg/G, bölünmüş dozlar şeklinde 10-14 gün süreyle uygulanır. Tedavi kesildikten sonra nüksler görülebilir. Uzun süreli tedavi önerilmemektedir (Pozio ve ark., 2003b).

Özellikle şiddetli trichinellosis infeksiyonlarında ve immünsüpresyon durumlarında tedaviye immounomodülatör ilaçların eklenmesi tavsiye edilmektedir. Bu amaçla timus faktör-X, levamisol ve L- tetramisol HCL en sık kullanılan farmakolojik ajanlar arasında yer almaktadır (Kociecka ve ark., 1989).

• Akut trichinellosisin tedavi ve izlemi

Akut trichinellosisin tedavi ve izlemi hastalığın şiddetine göre değişmekte olup, şu şekilde düzenlenir (Kociecka, 2000);

Asemptomatik hastalar

- 1- Yalnızca antihelmintik tedavi,
- 2- Periferik kanda lökosit ve eosinofil izlemi,

Hafif seyirli veya abortif hastalar

- 1- Antihelmintik tedavi,
- 2- Endikasyona göre salisilat eklenmesi (glukokortikoid kullanılmaz),
- 3- Gerekirse hospitalizasyon,

Orta derece ve şiddetli infeksiyonu olan hastalar

- 1- Zorunlu hospitalizasyon,
- 2- Antihelmintik tedavi,
- 3- Glukokortikoid uygulanması,
- 4- Sıvı-elektrolit açığının kapatılması,
- 5- Analjezik ilaç kullanımı,
- 6- İmmünsüpresyon ve şiddetli infeksiyon halinde immunomodulatör ilaçların uygulanması.

Hamilelerde

- 1- Hastalık şekli ve şiddeti ne olursa olsun hospitalizasyon,
- 2- İntestinal lümenen emilmeyen antihelmintiklerin (Pirantel, 10mg/kg/1-3 gün) kullanımı

11. KORUNMA

Trichinellosisten korunma yolları, infekte etlerdeki *Trichinellaların* eradike edilmesi , tüketici ve avcılarının eğitimi ve özellikle domuz çiftliklerinin kontrolü başlıkları altında genellendirilebilir.

İnfekte etlerde *Trichinella* eradikasyonu

İnfekte etlerdeki larvaların mikrodalga fırında pişirme, tütüleme ve kurutma ile tamamen ortadan kaldırılamadığı belirlenmiştir (Murray ve ark., 1998; Gamble ve ark., 2000). Bu enfeksiyonu önleyebilmek için *Trichinella* ile infekte et ürünlerinin dondurulması ve en az 71°C'de (160°F) pişirilmesi önerilmektedir (Gamble ve ark., 2000).

Dondurma işleminin;

- kalınlığı 15 cm e kadar olan et parçaları için; -15 °C de 20 gün, -23 °C de 10 gün, -29 °C de 6 gün,

- kalınlığı 15-70 cm olan et parçaları için ise: -15 °C de 30 gün, -25 °C de 20 gün ve -29 °C de 12 gün olarak yapılması tavsiye edilmektedir (European Commission, 2003; European Commission, 2001).

Çiftliklerin kontrolü

Trichinellosisin evcil çiftlik hayvanlarına geçişinin önlenmesi ve bu hayvanların kontrolü oldukça önemli görünmektedir. Uluslararası *Trichinella* Komisyonu (International *Trichinella* Comission, (ITC)) tarafından uygulanması önerilen önlemler aşağıda bildirilmiştir.

1. Çiftlik hayvanları (domuz, at vb.) ile vahşi hayvanlar ve ev hayvanları temasını önleyecek etkili bariyerlerin oluşturulması,
2. Domuz vb. çiftlik hayvanlarının çığ ölü hayvan artıkları ile beslenmesinin önlenmesi
3. Konak olabileceği bilinen kemiricilerin kontrolü,
4. Ölmüş çiftlik hayvanlarının yakma, gömme gibi uygulamalarla ortamdan uzaklaştırılması,
5. Çiftlikteki hayvanların rutin olarak; yeni gelen hayvanların ise *Trichinella* için endemik olmayan bölgelerden gelmeleri halinde bile en az 3 hafta boyunca serolojik izlemlerinin yapılması.

Tüketici ve avcıların eğitimi

Uluslararası *Trichinella* Komisyonu her ne koşulda olursa olsun çığ ya da az pişmiş domuz, at ve diğer av hayvanlarının tüketilmesi önermemektedir. Burada alınacak önlemler şunlardır;

1. Bu infeksiyondan korunma yollarının insanlara öğretilmesi amacıyla eğitim çalışmalarının yapılması (Murray ve ark., 1998),
2. Hıfzısıhha kanunlarının kontrolsüz av hayvanlarının avlanması, kesilmesi ve satılması konusunda düzenlenmesi,
3. Avcıların bilgilendirilmesi ve özellikle av hayvanlarında bulunan *Trichinella* türlerinin donmaya dirençli olduğu konusunun vurgulanarak anlatılması (Despommier, 1998; Murrell ve ark., 2000),
4. Vahşi hayatta avlanan av hayvanlarında araştırma yapacak enstitülerin kurulması teşvik edilmelidir. Özellikle yaban domuzu gibi av hayvanlarının, insanlara ve evcil domuzlara infeksiyon etkenlerini bulaştırmada çok önemli rol oynaması, Almanya,

İtalya ve Rusya gibi ülkelerde vahşi hayatta avlanan av hayvanlarında araştırma yapacak enstitülerin kurulmasını zorunlu hale getirmiştir.

5. Çiğ et ve mamüllerinin açıkta ve kontrolsüz olarak satılmasının engellenmesi ve buna dair gerekli kanunların yürürlüğe sokulması

Türkiye’de saptanan *Trichinella* türünün *T. britovi* olması ve bu türün yabani hayvan etlerinden kaynaklanması nedeni ile, bu enfeksiyonun önlenmesi için özellikle yabani hayvan etlerinin tüketilmesine yönelik çalışmaların yapılması ülkemiz açısından oldukça önemlidir.



GEREÇ VE YÖNTEM

1. 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 39 kişinin serum örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak ise 3’ü toxocariasis pozitif, 2’si fascioliasis pozitif ve 6’sı sağlıklı olmak üzere toplam 11 kişinin serumları dahil edildi. Toxocariasis hastaları ticari IBL *Toxocara*-IgG ELISA kiti ile, fascioliasis hastaları ise *F. hepatica* ES ürünlerinin kullanıldığı in-house ELISA ile, önceki rutin çalışmalar esnasında tespit edildi. Tüm serumlar çalışılncaya kadar -20 °C’de saklandı.

2. Kullanılan Testler

Serum örnekleri, Enzim Linked Immunsorbent Assay (ELISA), Western Blotting (Wb) serolojik yöntemleri ve ticari Cypress IgG-ELISA kiti ile anti-*Trichinella* IgG antikorları yönünden incelendi.

3. Serolojik Testlerde Kullanılmak Üzere Antijen Hazırlanması

Serolojik testlerde kullanılacak *T. spiralis* larvaları ve ekskretuar/sekretuar (ES) antijenleri, Uluslararası Trichinella Komisyonu tarafından öngörülen yöntem (European Commission, 2002; Pozio ve ark., 2002; Gamble ve ark., 1983) uygulanarak elde edildi. Ancak antijen

konsantre etme düzeneği, laboratuvarımızda bulunmadığı için Wb ve ELISA testlerinde kullanılan pürifiye *Trichinella* ES antijeni, Uluslararası *Trichinella* Referans Merkezi'nden sağlandı (*Trichinella* International Reference Centre, Istituto Superiore di Sanità, Roma). Kendi laboratuvarımızda *T. spiralis* larvalarından elde ettiğimiz ES antijeni konsantre edilmeden ELISA testinde kullanıldığında pürifiye antijen ile benzer sonuçlar tespit edildi.

***T. spiralis* larvalarının elde edilmesi**

Kas Eritici Solusyon (Digestion Solüsyonu ; %1 Pepsin-HCL Solüsyonu)

Pepsin	5 gr
HCL (%37 lik stok)	27 ml
Çeşme suyu	2 lt

karıştırılarak hazırlandı.

- a- Sıçanlara (*Rattus norvegicus*, Wistar albino) *T. spiralis* larvaları içeren etler, gavaj yoluyla veya yedirmek suretiyle verilerek, sıçanların enfekte olmaları sağlandı. Yaklaşık 3 hafta sonra sıçanlar sakrifiye edildikten sonra açılarak, iç organları, derisi ve başı uzaklaştırıldı.
- b- Hayvanın kalan kısmı makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Bu parçalar, bir blender içerisine konularak, üzerine önceden 48 °C'ye getirilmiş digestion solüsyonu (%1 lik pepsin-HCL) azar azar ilave edildi ve kaslar homojen hale gelene dek blender çalıştırıldı (100gr'lık örnek yaklaşık 2lt solüsyon içinde).
- c- Cam balona alınan bu karışım 37 °C'lik ortamda manyetik karıştırıcı kullanılarak 30-45 dakika inkübe edildi ve böylece larvaların kapsül dışına çıkması sağlandı.
- d- İnkübasyon sonunda solüsyonun üzerine çeşme suyu ilave edildi ve 20-30 dakika bekleme periyodunu takiben süpernatantlar vakum pompası yardımıyla uzaklaştırıldı.

Bu yıkama işlemini 10-15 kez tekrarlandı ve böylece saf *T. spiralis* larvalarının elde edilmesi sağlanmış oldu.

Ekskretuar/sekretuar (ES) antijeninin elde edilmesi :

- a-** Pürifiye edilmiş larvalar penisilin(500Ü/ml)-streptomisin(500µg/ml) içeren serum fizyolojik (%0.85) solüsyonu içinde üç kez daha yıkandı.
- b-** Larvalar penisilin (500Ü/ml) ve streptomisin (500µg/ml) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içinde tekrar birkaç kez yıkandıktan sonra 5000/ml larva olacak şekilde DMEM (1M HEPES, 200mM L-glutamin, 5000Ü/ml penisilin-streptomisin) ile resüspanse edilerek 25 cm² lik kültür flasklarına (Falcon) alındı.
- c-** Flasklar %5 CO₂ ve 37 °C koşullarında 18 saat inkübe edildikten sonra süpernatant toplandı ve 0.2 µm filtre yardımıyla filtre edildi.
- d-** Süpernatant Amicon^R basınçlı konsantrasyon cihazı kullanılarak 100 kez konsantre edildikten sonra 260 nm ve 280 nm dalga boyunda optik dansite ölçümü yapıldı ve protein konsantrasyonu değerlendirildi.
- e-** 280 nm/260nm değerinin 1.2 den büyük olması durumunda elde edilen ES ürünleri, antijen olarak testlerde kullanıldı.

4. Serolojik Testler ve Uygulanması

4.1. TRİCHİNELLOSİS STANDART ELISA TESTİ

Tampon ve solüsyonlar

Karbonat Buffer

0.1M Na₂CO₃ 10.6 g/L

0.1 M NaHCO₃ 8.4 g/L

Na₂CO₃ kullanılarak pH 9.6'ya ayarlandı.

PBS

NaH₂PO₄ 0.44gr

K₂HPO₄ 2.40gr

NaCl 17.00gr

Distile su 2000ml'ye tamamlandı.

Tüm maddeler tamamen karıştırıldıktan sonra pH 7.4'e ayarlandı.

Yıkama solüsyonu (PBS-T)

1000 ml PBS içine 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlandı.

Bloking solüsyonu

Bovin serum albumin(BSA) 1gr

PBS-Tween 20 1000ml

karıştırılarak hazırlandı.

Konjuge

Goat Anti-Human IgG (peroxidase ile işaretli)

Substrat

3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System

Testin Hazırlanması ve Uygulanması

- a- ES antijeni 5µg/ml olacak şekilde karbonat buffer içinde sulandırıldıktan sonra, her çukura 100µl konulmak suretiyle ELISA plakları (Nunc^R MaxiSorp) kaplandı. Plakların üzeri parafilm ile kapatılarak 1 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi.
- b- Antijen kaplı plaklar, etüvden çıkarıldıktan sonra, ters çevrilmek suretiyle boşaltıldı. Her çukura 200µl bloking solusyonu konularak 37 °C’ de 1 saat bekletilerek bloking işlemi yapıldı.
- c- Serum sulandırması için master bloğun her çukuruna 990µl PBS-Tween20 (PBS-T) ve üzerlerine negatif kontrol, pozitif kontrol ve hasta serumlarından 10µl eklenerek, 1/100 şeklindeki serum dilüsyonları elde edildi.
- d- Her hasta için çift çukur çalışıldı. Hazırlanan 1/100 dilüsyondaki serum örneklerinden 100µl, antijen kaplı plaklara aktarıldıktan sonra 37 °C’ de 30 dakika inkübe edildi.
- e- Etüvden çıkarılan plaklar ters çevrilmek sureti ile boşaltıldı. PBS-T’den her çukura 200µl konularak 5 dakika beklendi. Süre bitiminde plaklar ters çevrilmek suretiyle boşaltıldı. Bu yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı.
- f- Optimal dilüsyonda (1/1200 dilüsyonda) PBS-T ile sulandırılan, hydrogen peroxidase ile işaretli goat anti-human IgG konjuge, plağın her çukuruna 100 µl olacak şekilde aktarıldı ve plaklar tekrar oda ısısında 30 dk bekletildi.
- g- Plaklar etüvden çıkarıldıktan sonra daha önce bahsedildiği şekilde 2 kez PBS-T ile ve son olarak bir kez PBS ile yıkandı.

h- TMB Peroxidase Substrat System'den her çukura 100µl konuldu ve reaksiyon 15 dk sonra 1 N HCL den 100µl ilave edilerek durduruldu. Oluşan renk değişikliği, ELISA okuma cihazıyla 450 nm'de değerlendirildi.

i- Testin Değerlendirilmesi:

A= (negatif kontrollerin OD ortalaması – blenk çukurların OD ortalaması) x 2

B= (negatif kontrollerin OD ortalaması – blenk çukurların OD ortalaması) x 3

- *Negatif sonuç* ; Hasta serum OD < A ise
- *Ara pozitif sonuç* ; A < Hasta serum OD < B ise
- *Pozitif sonuç* ; Hasta serum OD > B ise

4.2. TİCARİ ELISA KİTİ

Tüm serum örnekleri Cypress ticari IgG-ELISA kiti ile 1/100 dilüsyonda, üretici firma prosedürlerine uyularak çalışıldı ve değerlendirildi (Cypress Diagnostics, Langdrop, Belçika).

4.3. SDS PAGE ve Wb TESTİ

Test iki basamaktan oluşmaktadır.

1. Sodium Dodecyl Sulphat Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Yöntemi: Bu yöntem ile önceden elde edilen ES antijeninin, SDS içeren jel sistemi ve elektroforez yardımı ile protein fraksiyonlarına ayrılması sağlandı.

2. **Western Blotting Testi:** Ayrışmış antijenik fragmanların nitrosellülöz membrana aktarıldıktan sonra serum örnekleri ile reaksiyona girmesi sağlanarak, Trichinella spesifik IgG antikollarının varlığı araştırıldı.

I- SDS-PAGE YÖNTEMİ

ES antijen proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılması amacıyla yapıldı (Laemmli, 1970).

Test için gerekli olan aletler

- Mini Trans-Blot Elektroforetic Transfer Cell sistemi
- Güç kaynağı
- Çalkalayıcı
- Sıcak su banyosu

Test için gerekli olan bufferlar

1M Tris:

Trisma base 121,14 gr

Distile su ile 1000ml'ye tamamlandıktan sonra pH' ı 6,8'e ayarlandı.

%2 Bromphenol blue

Bromphenol blue 0,2 gr

Distile su 10 ml içinde çözülerek hazırlandı.

Ammonium persulfate % 10

Ammonium persulfate 0,1 gr

Distile su 1 ml

içinde çözülerek hazırlandı ve hazırlandıktan sonra hemen kullanıldı.

Seperation buffer

Trisma base 43 gr

Trisma base yaklaşık 50 ml distile su içinde eritildikten sonra pH 8,8'e (saf HCl ile) ayarlandı.

SDS 1 gr

SDS yaklaşık 10 ml distile suda eritilerek, daha önce hazırlanmış Tris solüsyonuna eklendi. Trisma base-SDS karışımı distile su ile 125 ml'ye tamamlandı ve buffer oda ısısında saklandı.

Stacking buffer

Trisma base 6,06 gr

Az miktarda distile su içinde eritildikten sonra pH'sı HCl ile 6,8'e ayarlandı.

SDS 0,4 gr

Az miktarda distile su içinde eritilerek hazırlanmış Trisma base solusyonu üzerine eklendi. Daha sonra Trisma base-SDS karışımı distile su ile 100 ml' ye tamamlanarak Stacking solüsyonu elde edildi. Bu buffer oda ısısında bir ay süre ile saklanabilmektedir.

Sample buffer

1M Tris 12,5ml

%10 SDS 40 ml

Glycerol 20 ml

%2 Bromphenol blue 2 ml

Mavi renk oluşana kadar NaOH ile pH ayarlandı ve üzeri 100 ml distile su ile tamamlandı. Kullanılıncaya kadar oda ısısında saklandı.

%10 SDS:

SDS 10 gr

Distile su 100 ml

inde tamamen eritmek suretiyle hazırlandı.

Elektrolit buffer x 5:

Tris	15 gr
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalt)	5 gr
Glycine	72 gr
Distile su	1000ml

Tüm maddeler distile su içinde tamamen eritildikten sonra pH 8,5'e ayarlandı.

Solüsyon kullanılmaya kadar 4°C' de bekletildi.

Seperasyon jeli (%10'luk):

Seperasyon jeli 50 ml'lik santifüj tüpü içinde hazırlandı.

Distile su	7,65 ml
Stacking buffer	5,00 ml
Acrylamide/Bis %30	6,60ml
TEMED	18 µl
%10 ammonium persulfate	130 µl

Seperasyon jeli hazırlanırken toksik maddeler kullanıldığı için çeker ocak içinde çalışıldı. TEMED ve ammonium persulfate polimerizasyon işlemini başlattığı için en son olarak ilave edildi ve bu maddeler ilave edildikten hemen sonra jel dökme işlemi gerçekleştirildi.

Stacking jel (%5'lik):

Distile su	2,90 ml
Stacking buffer	1,25 ml
Acrylamide/Bis %30	835µl
TEMED	5 µl
%10 Ammonium persulfat	50 µl

SDS TESTİNİN UYGULANMASI

- Protein kontaminasyonunu önlemek için testteki bütün işlemler eldiven giyilerek yapıldı ve testte kullanılacak tüm malzemeler test öncesi etil alkolle iyice temizlendi.
- Elektroforez aletinin, biri kalın diğeri ince iki cam levhası, birbiri üzerine getirildikten sonra mengene şeklindeki alet yardımıyla düzgün bir zeminde, dik olarak sehpaye (casting stand) monte edildi.
- Cam levhalar arasında oluşan boşluklar tamamen alkol ile doldurularak boşluk olup olmadığı kontrol edildi. Takiben alkol kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırıldı.
- Separasyon jeli 50 ml tüp içinde hazırlandı ve hazırlanır hazırlanmaz cam levhalar arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde bir pipet yardımıyla döküldü. Cam levhalar arasındaki boşluk jelle $\frac{3}{4}$ üne kadar dolduruldu. Jelin hava ile temasının kesilmesi için üzerine % 70'lik etil alkol döküldü.
- Polimerizasyon için 30 dakika beklendi ve polimerizasyon işleminden sonra jelin üzerindeki alkol kurutma kağıdına emdirilerek alındı.
- Hazırlanan stacking jel, seperasyon jelinin üzerine döküldü ve hiç beklemeden bu jele kullanım amacına uygun olarak tek dişli tarak yerleştirildi. Bu işlem esnasında tarağın mutlaka stacking jel içinde kalmasına, seperasyon jeli ile temas etmesine ve jel ile tarak arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
- Stacking jelinin polimerizasyonu için 20 dakika beklendi.
- Bu bekleme esnasında, önceden belirlenmiş ideal oranlardaki ES antijeni ile sample buffer 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde hazırlandı (Bizim ön çalışmamıza göre 70 µl antijen + 130µl sample buffer).

Ön çalışma:

Örnek serumların çalışma aşamasına gelmeden önce Wb yönteminde kullanılacak antijenin ideal sulandırım oranı belirlendi. Bu ön çalışma esnasında farklı sulandırmaların elde edildiği ES antijeni ile sample buffer karışımları, SDS-PAGE yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntemle yapılan analiz sonucunda hangi sulandırım sütunundaki bantların ideal yoğunluk oluştuğuna bakıldı. Bantların net görüntülerinin elde edildiği sütundaki antijen sulandırımı “antijenin çalışma sulandırımı” olarak kabul edildi. Biz çalışmamızda 70 µl antijen + 130µl sample buffer şeklindeki antijen sulandırımının Wb uygulaması için ideal olduğuna karar verdik.

- ES antijeni ile sample buffer içeren ependorf tüpün kapağına, sıcak etkisi ile oluşacak basıncın önlenmesi amacıyla iğne yardımıyla birkaç delik açıldı ve kaynayan su içinde 5 dakika bekletildi.
- Tek kullanımlık olacak şekilde ependorflara bölünmüş olarak -20 °C’de bekletilen marker (Prestained SDS-PAGE standart low range) birkaç dakika oda ısısında kaldıktan sonra, bir pens yardımı ile birkaç kez kaynar suyun içine daldırılıp çıkarıldı.
- Stacking jelinin polimerizasyonu için beklenen 20 dakikanın sonunda, arasında jel bulunan cam levhalar elektroforez tankına yerleştirildi ve sonra soğuk ortamdan çıkarılan elektrolit bufferla elektroforez tankı jelin üzerinden taşmayacak şekilde dolduruldu.
- Stacking jelin içindeki taraklar jele zarar vermeden çıkarıldı.
- Tarakların çıktıkları yerlerde jelin içinde oluşan çukurlardan, en baştaki küçük çukura Gilson pipet ile 6µl marker, diğer büyük çukura ise 200µl sample buffer ve antijen

karışımı konuldu (Çok dişli tarak kullananlar ise birinci çukura marker, diğer tüm çukurlara sample buffer ve antijen karışımını koymalıdır).

- Bu işlemlerden sonra elektroforez aletinin kapağı anod ve katod uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı ve alet, proteinlerin seperasyon işlemi için 1 saat süre ile 150V sabit akıma ayarlanarak çalıştırıldı.
- Bu süre sonunda markerın oluşturduğu rengin jelin alt ucuna kadar gelip gelmediği kontrol edildi. Eğer hala gelmemişse, marker jelin alt ucuna ulaşmaya kadar bir süre daha beklendikten sonra akım kesildi ve uçlar çıkarıldı.
- Jel, elektroforez aletinden dikkatli bir şekilde çıkarılarak Wb kasetine yerleştirildi. Eğer Wb düzeneği henüz hazır değilse, jel elektroforez aletinden çıkarılmadan bir süre daha +4 °C'de bekletildi.

II. WESTERN BLOT (WESTERN BLOTTING) YÖNTEMİ

Bu basamakta SDS-PAGE yapılarak jel üzerinde antijenik proteinleri ayırıştıran ES antijeni, nitrorosellüloz membrana aktarılarak serumlarla inkübe edildi ve *Trichinella*'ya özgü IgG antikorları araştırıldı (Towbin ve ark 1979).

Test için gerekli olan aletler

Mini Trans – Blot Electroforetic Transfer Cell

Güç kaynağı

Nitrosellüloz membran

Filtre kağıdı

Fiber spanç

Dikdörtgen petri kutusu

Test için gerekli olan bufferlar

Stok Tris buffer saline (Stok TBS):

Trizma base 121,14 gr

NaCl 99,35 gr

Bu maddeler 1 litrelik balon içine aktarılıp üzerine distile su eklenerek 1 litreye tamamlandı ve kullanılmaya kadar oda ısısında bekletildi.

Tris buffer saline-Tween 20 (TBS-T):

Stok TBS 100 ml

Distile su 900 ml

Tween 20 500µl

Bloking solüsyon:

Casein 3 gr

TBS 100 ml

Stok Tris-Glycine buffer :

Tris 18,905 gr

Glycine 90 gr

Distile su ile 1000 ml'e tamamlandı ve tüm maddelerin iyice erimesi sağlandı. Solüsyon kullanılmaya kadar buzdolabında +4 °C 'de bekletildi

Transfer buffer :

Stok Tris-Glycine buffer 200 ml

Distile su 800 ml

Karıştırılarak hazırlandı. Kullanmadan hemen önce 800 ml transfer buffer üzerine 200 ml %96'lık methanol ilave edildi.

Konjuge

Goat Anti - Human IgG (alkaline phosphatase ile işaretli)

Substrat

5- Bromo-4Chloro-3-İndol phosphate (BCIP)/Nitro Blue Tetrazolium (NBT) tablet (BCIP/NBT alkaline phosphatase substrat) -20 °C'de karanlıkta saklandı.

Çalışma anında 1 tablet substrat, 10ml distile su içinde eritilerek bekletilmeden kullanıldı.

Jel boyama solüsyonu :

Commasie brillant blue	200 mg
Ethanol	90 ml
Glacial asetic acide	20 ml
Distile su	90 ml

Karıştırılıp kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

Jel boya açma solüsyonu:

Ethanol	100 ml
Glacial acetic acide	100 ml
Distile su	800 ml

Karıştırılıp kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

Wb TESTİNİN UYGULANMASI

Nitrosellüloz membran, filtre kağıtları ve spançlar 30 dakika transfer buffer içinde bekletildi.

İki jelden aktarım yapılacaksa 2 adet nitrosellüloz membran, 4 adet filtre kağıdı ve 4 adet spanç kullanıldı.

Blotting aletine, transfer işleminin yapılacağı kaset, nitrosellüloz membran, filtre kağıtları ve spançlar yerleştirilerek kapatıldı. Bu işlem dikkatli bir şekilde şu sıra ile yapıldı.

- Kasetin siyah kısmı jelin katod kısmına karşılık gelecek şekilde yerleştirildi.
 - Kasetin üzerine ıslak spanç, onun üzerine de ıslak filtre kağıdı yerleştirildi.
 - Jel elektroforez aletinden çıkarıldıktan sonra bir spatula yardımıyla ıslak filtre kağıdının üzerine alındı.
 - Yerleştirme sırasında jel, elle hava kabarcığı kalmayacak şekilde düzeltildi ve üzerine nitrosellüloz membran konuldu. Bu sırada sürekli olarak transfer buffer ile ıslatıldı.
 - Nitrosellüloz membranın üzerine ıslak filtre kağıdı ve onun üzerine ıslak spanç konduktan sonra alet kapatıldı.
- Hazırlanan jel-membran sistemi, +4 °C'de saklanan transfer buffer ile doldurulmuş tankın içine aktarıldı ve ısınmayı önlemek için yanına buz aküleri yerleştirildi.
 - Blotting aletinin kapağı anod ve katod uçlarının doğruluğu kontrol edildikten sonra kapatılarak 300 mA akım uygulanmak suretiyle 1 saat boyunca çalıştırıldı.
 - Bu işlem sırasında akım istenmeyen seviyelere çıkabileceğinden, alet sık sık kontrol edildi ve akım şiddetinden sapmalar olduğu zaman tekrar istenilen şiddete ayarlandı.
 - Blotting işleminin sonunda akım kesildi. Membran ve jel dikkatlice birbirinden ayrıldı.
 - Antijenin nitrosellüloz membrana transfer olup olmadığını kontrol etmek için jel, 10ml jel boyama solüsyonu içinde 1 gece bekletilerek boyandı. Ertesi gün boyama solüsyonu döküldü ve jel 10 ml boya açma solüsyonu içine alınarak bu solüsyon içinde yarım saat bekletildi. Bantların olmaması durumunda antijenin, jelden nitrosellüloz membrana tamamen transfer olduğu kabul edildi.

- Nitrosellüloz membran, oluşabilecek non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için TBS ile % 3'lük sulandırımı yapılan casein (100ml TBS + 3 gr casein) içinde bir gece +4 °C'de bekletildi.
- Ertesi gün membran, üzerindeki fazla caseini uzaklaştırmak için 15 ml TBS içerisinde konularak, 3 kez 10 dakika boyunca karıştırıcı üzerinde yıkanması sağlandı.
- Bloklanmış ve yıkanmış, antijen içeren nitrosellüloz membranlar, eğer hemen kullanılmayacaksa hafif nemli olarak alimünyum folyoya sarılır ve -20 °C'de birkaç ay bekletilebilir.
- Alkolle temizlenmiş bir cam üzerine konan membran, cetvel ve bistüri yardımı ile 0,3 cm kalınlığında şeritler halinde kesildi. Bu arada şeritlerin ve markerın üst kısmına hangi markerın hangi mambrana ait olduğunun bilinebilmesi için bir işaret konuldu.
- Membranın markerdan sonraki ilk ve son şeriti, üzerinde yeteri kadar antijen olmayabileceği düşünülerek kullanılmadı.
- Serum örnekleri total 4 ml olacak şekilde TBS ile tüp içinde 1:100 (40µl serum + 3960µl TBS) oranında sulandırıldı.
- Sulandırılan her bir serum dikdörtgen şeklindeki kutulara boşaltıldıktan sonra içlerine nitrosellüloz şeritlerden birer tane atıldı ve karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda serum sulandırılmaları boşaltıldı ve nitrosellüloz membran şeritler yine dikdörtgen kutular içinde 3 kez 10'ar dakika 4 ml TBS ile yıkandı.
- İşaretli sekonder antikorun bağlanması: Her bir nitrosellüloz şerit üzerine TBS ile 1:5000 oranında sulandırılarak hazırlanan goat anti-human IgG konjugeden 4 ml ilave edilerek bir saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.

- İnkübe işleminden sonra her şerit, 3 kez 10'ar dakika 4 ml TBS ile yıkandı.
- Substrat ilave edilmesi: 10 ml distile su içinde 1 tane BCIP/NBT alkaline-phosphatase substrat tablet 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.
- Sıraları değişmeden kurutma kağıtlarının arasına konulan şeritler, ertesi gün kurutma kağıtlarından çıkarıldı. Her şerit üzerine numaraları yazılarak markerla aynı hizaya gelecek şekilde bir kağıt üzerine fikse edildi.

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, trichinellosis yönünden pozitif olarak kabul edildi..

4. Kullanılan Malzemelerin Ticari Adı

Pepsin _____	Merck, 1.07185.0100
HCl _____	UPARC, %37'lik stok 08364602
Tween-20 _____	Merck, 8.22184.0500
Bovin serum albumin(BSA) %30 _____	Lorne, 452010
HEPES buffer (1M) _____	Sigma, H-0887
DMEM _____	Sigma, D-5796
Penicillin-Streptomycin solüsyon _____	Sigma, P-0906
Trisma base _____	Sigma, T-1503
SDS _____	Merck , 1.13760.0100
Bromphenol blue _____	Merck, 1.08122.0025
Ammonium persulfate _____	Applichem, A 2941,0100
Glycerol _____	Sigma, G-7757
NaOH _____	Riedel-deHaen, 06203
Glycine _____	Applichem, A 1067,1000
Acrylamide/Bis %30 _____	Bio-Rad, 161-0158
TEMED _____	Applichem, A 1148,0100
Casein _____	Sigma, C-7078
Commase brilliant blue _____	Merck, 15444
Goat Anti-Human IgG (peroxidase ile işaretli) _____	Sigma, A-6029
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System _____	Sigma, T-8665
Goat Anti – Human IgG (alkaline phosphatase ile işaretli) _____	Sigma, A-3187
5- Bromo-4Chloro-3-İndol phosphate (BCIP)/Nitro Blue Tetrazolium (NBT) tablet (BCIP/NBT alkaline phosphatase substrat _____	Sigma, B-5655

Test için gerekli olan aletler:

Amicon basınçlı konsantrasyon cihazı (YM-5 filtrelili) ____	(Amicon Inc., MA, USA)
Mini Trans-Blot Elektroforetic Transfer Cell sistemi ____	Bio-Rad, 170-3930
Mini Trans – Blot Electroforetic Transfer Cell _____	Bio-Rad, 170-3930
Güç kaynağı _____	Bio-Rad, Power Pac 300, 165-5051
Çalkalayıcı _____	Janke & Kunkel, HS 500
Nitrosellüloz membran _____	Bio-Rad, 162-0145
Filtre kağıtları _____	Bio-Rad, 1703932
Fiber spanç _____	Bio-Rad
Dikdörtgen şeklindeki kutuları _____	100mm x 100mmx75mm
Kültür flask (25 cm ²) _____	Falcon, (35)3108

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

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 X² testi ve Discriminant analizi uygulandı.

Saptanan protein bantlarının tanısal güvenilirliğini değerlendirmek için Roc Curve eğri çıkarıldı ve eğri altında kalan alan hesaplatıldı.

BULGULAR

Çalışmamıza, 2004 Ocak ayında İzmir’de meydana gelen trichinellosis salgını boyunca trichinellosis şüphesiyle başvuran 39 kişi dahil edildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı’na yönlendirilen ve standart ELISA sonuçlarına göre pozitif saptanan 39 hasta serumu ve yine ELISA sonuçlarıyla negatif olarak saptanan 11 kontrol grubu serumu anti *Trichinella*-IgG antikorları yönünden farklı yöntemlerle incelendi. Tüm serum örnekleri ticari ELISA kiti ve Wb yöntemi ile araştırıldı.

Kontrol grubu olarak seçilen 11 kişinin 3’ü *Toxocara* pozitif, 2’si *Fasciola* pozitif ve 6’sı sağlıklı kişilerden oluşmaktaydı.

Çalışmaya alınan bireylerin 25 (%50)’i erkek ve 25 (%50)’i kadındı. Yaş gruplarına göre değerlendirme yapıldığında, hastaların 11 (%22)’i 3-15, 19 (%38)’u 16-30 ve 20 (%40) tanesi de 31-55 yaş grubundaydı (Tablo5).

ELISA SONUÇLARI :

ES antijen kullanılarak hazırlanan standart ELISA ile 29 (%74.4) hasta 1/100 dilüsyonda pozitif saptandı. ELISA ile ara pozitif olarak değerlendirilen 10 (%25.6) hasta klinik bulgularının trichinellosis yönünde olması ve 1. aydan sonra tekrarlanan ELISA testi ile pozitif saptanmalarından dolayı pozitif hasta olarak değerlendirildi. Kontrol grubundaki 11 hasta serumu ise standart ELISA testi ile 1/100 dilüsyonda negatif olarak değerlendirildi.

Ticari kit olarak seçilen Cypress IgG-ELISA kiti ile 1/100 dilüsyonda 39 hastanın yalnızca 22'si (%56) pozitif olarak saptandı. Bu kit ile kontrol gruplarında herhangi bir pozitif reaksiyon izlenmedi.

Tablo 5: Çalışma ve kontrol grubundaki hastaların demografik özellikleri, standart ELISA ve ticari ELISA sonuçları

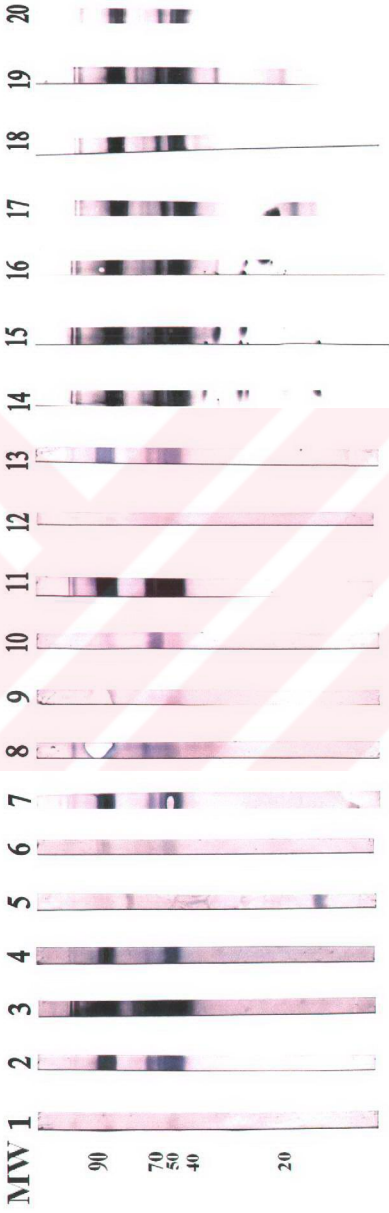
Hasta No	Cins	Yaş	Klinik	Serum örneğinin alınma tarihi	Ticari ELISA kiti	Standart ELISA
1.	K	41	+	26.gün	-	+*
2.	K	15	+	20. gün	+	+*
3.	E	17	+	35. gün	+	+
4.	K	23	+	25. gün	+	+*
5.	E	33	+	17. gün	-	+*
6.	E	49	-	22. gün	-	+*
7.	E	12	+	24. gün	+	+*
8.	E	27	+	38. gün	-	+
9.	E	24	+	20. gün	-	+
10.	K	49	+	19. gün	+	+
11.	K	11	-	31. gün	+	+
12.	K	31	+	30. gün	-	+
13.	K	32	+	26. gün	-	+
14.	E	28	-	19. gün	+	+
15.	E	25	+	25. gün	+	+
16.	K	36	+	33. gün	-	+
17.	K	49	+	31. gün	-	+
18.	K	55	+	22. gün	+	+

19.	K	8	-	29. gün	+	+
20.	E	16	+	27. gün		+
21.	E	10	+	23. gün	+	+
22.	K	35	+	15. gün	-	+
23.	K	24	+	26. gün	+	+
24.	E	5	+	21. gün	+	+
25.	E	9	-	19. gün	+	+
26.	K	14	+	28. gün	+	+
27.	K	28	+	24. gün	+	+
28.	K	21	+	18. gün	-	+
29.	K	26	+	29. gün	+	+
30.	K	51	+	25. gün	+	+
31.	E	50	+	32. gün	+	+
32.	E	14	+	15. gün	+	+
33.	E	29	-	12. gün	-	+
34.	K	24	+	23. gün	-	+
35.	E	19	+	17. gün	-	+
36.	E	42	+	19. gün	-	+
37.	K	43	+	21. gün	+	+
38.	K	35	-	17. gün	+	+
39.	E	25	+	21. gün	-	+
40.	E	12	-	17. gün	-	-
41.	E	29	-	15. gün	-	-
42.	K	30	-	22. gün	-	-
43.	K	38	-	11. gün	-	-
44.	E	36	-	30. gün	-	-
45.	E	3	-	19. gün	-	-
46.	E	46	-	28. gün	-	-
47.	E	51	-	19. gün	-	-
48.	K	55	-	25. gün	-	-
49.	E	51	-	24. gün	-	-
50.	K	16	-	24. gün	-	-

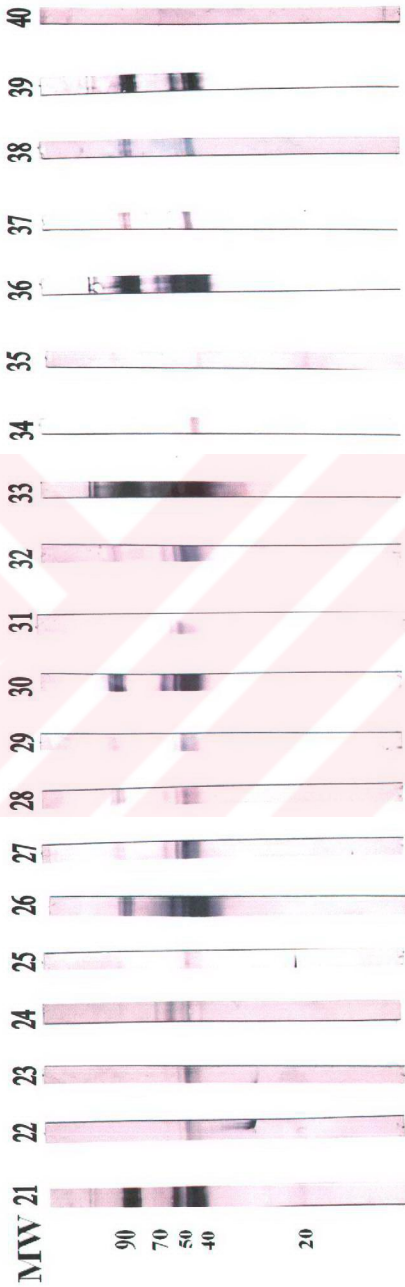
* Standart ELISA ile 1/100 dilüsyonda, ara pozitif olarak değerlendirilen hastalar

Wb SONUÇLARI :

Standart ELISA ile pozitif olarak saptanan 39 hasta ve 11 kontrol serumu, Wb yöntemi ile değerlendirildi (Resim 1, 2, 3).



Resim 1: Örnek 1-20'e ait Wb nitrocelluloz şeritler



Resim 2: Örnek 21-40'a ait Wb nitros elülüz şeritler



Resim 3: Örnek 41-44'e ait Wb nitrocelluloz şeritler

ES antijenin kullanıldığı Wb testiyle, ELISA ile pozitif çıkan 39 hastanın tümü (%100) pozitif bulundu. Wb testi ile pozitif olarak değerlendirilen hastalarda en az 2, en fazla 13 olmak üzere farklı moleküler ağırlıkta bantlar elde edildi (Tablo 6).

Tablo 6: Çalışma ve kontrol grubu hastalarının standart ELISA sonuçları ve Wb ile elde edilen bant paternleri

Hasta	ELISA (1/100)	Wb	Wb bantlar (kDa)
1.	+	+	45, 89, 131
2.	+	+	45, 52, 55, 77, 79, 86, 95
3.	+	+	43, 45, 58, 61, 64, 77, 95, 111
4.	+	+	45, 55, 79, 89, 95
5.	+	+	14, 66, 79, 98
6.	+	+	45, 55, 63, 81, 89, 95
7.	+	+	45, 52, 55, 79, 89, 95
8.	+	+	45, 48, 55, 79
9.	+	+	45, 55, 81
10.	+	+	45, 55, 81, 89, 95
11.	+	+	43, 45, 52, 55, 79, 95
12.	+	+	43, 45, 89, 95
13.	+	+	45, 52, 55, 79, 89, 95
14.	+	+	27, 28, 35, 40, 43, 45, 47, 52, 57, 73, 80, 88, 123
15.	+	+	28, 33, 40, 43, 45, 52, 59, 61, 66, 73, 82, 88, 123
16.	+	+	29, 33, 40, 45, 47, 52, 59, 73, 75, 82, 88, 123
17.	+	+	14, 20, 40, 45, 47, 52, 59, 62, 73, 75, 88, 123
18.	+	+	20, 38, 42, 45, 47, 52, 59, 64, 73, 75, 82, 88, 123
19.	+	+	20, 38, 42, 45, 47, 52, 59, 64, 73, 75, 82, 88
20.	+	+	20, 38, 42, 45, 47, 52, 59, 64, 73, 75, 82
21.	+	+	20, 40, 45, 47, 52, 73, 75, 82, 88, 123
22.	+	+	37, 40, 45, 48, 55
23.	+	+	26, 40, 43, 46, 55
24.	+	+	40, 43, 45, 49, 50, 57, 88
25.	+	+	43, 46, 79
26.	+	+	35, 38, 43, 45, 55, 73, 75, 79, 84
27.	+	+	40, 45, 48, 55, 79, 84
28.	+	+	40, 45, 48, 55, 79, 84, 89
29.	+	+	40, 43, 48, 55, 79, 84, 89
30.	+	+	40, 43, 45, 48, 55, 77, 79, 84, 89

31.	+	+	43, 48, 55
32.	+	+	40, 43, 45, 48, 55, 79, 84, 89
33.	+	+	32, 34, 35, 40, 42, 45, 61, 66, 70, 80, 111, 115, 123
34.	+	+	43, 45
35.	+	+	20, 43
36.	+	+	38, 40, 43, 45, 47, 50, 52, 57, 70, 73, 82, 115, 123
37.	+	+	45, 47, 52, 64, 77, 82, 88
38.	+	+	45, 47, 50, 77, 82, 88
39.	+	+	41, 43, 45, 50, 70, 73, 77, 85, 115, 123
40.	-	-	-
41.	-	-	-
42.	-	-	-
43.	-	-	-
44.	-	-	-
45.	-	-	-
46.	-	-	-
47.	-	-	-
48.	-	-	-
49.	-	-	-
50.	-	-	-

Wb testi sonucunda hasta ve kontrol gruplarında 14-123 kDa arasında farklı sensitivitelere toplam 46 bant saptandı. Gözlenen tüm bantlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

45 kDa ağırlığındaki bant, trichinella pozitif hastaların çoğunda gözlenirken ELISA ile negatif bulunan 3 hastada da reaksiyon verdi.

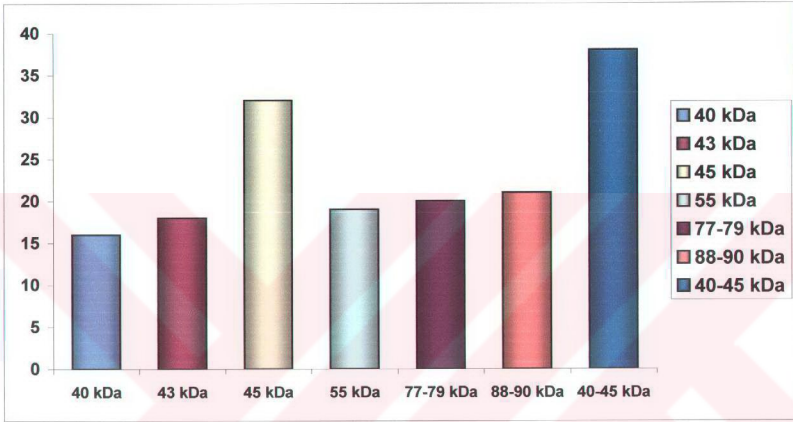
Sensitivitesi en düşük bantlar incelendiğinde 29, 32, 34, 58, 62 ve 63 kDa ağırlığındaki bantlar 11 kontrol hastasının hiçbirisinde gözlenmezken pozitif olarak değerlendirilen hastalarda %2.6 sensitivitede gözlemlendiler.

Tablo 7 : Wb sonucu elde edilen tüm bantların hastalığı göstermedeki etkinlikleri

	Hasta Grubu (n :39)	Sensitivite (%)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n:6)	Parazitli Kontrol Grubu (n:5)
14 kDa	2	%5,1	-	-
20 kDa	6	%15,4	-	-
27 kDa	2	%5,1	-	-
28 kDa	2	%5,1	-	-
29 kDa	1	%2,6	-	-
32 kDa	1	%2,6	-	-
33 kDa	2	%5,1	-	-
34 kDa	1	%2,6	-	-
36 kDa	3	%7,7	-	-
38 kDa	6	%15,4	-	-
40 kDa	16	%41,0	-	-
42 kDa	4	%10,3	-	-
43 kDa	18	%46,2	-	-
45 kDa	32	%82,1	3	-
46 kDa	2	%5,1	-	-
47 kDa	10	%25,6	-	-
48 kDa	8	%20,5	-	-
49 kDa	8	%20,5	-	-
50 kDa	4	%10,3	-	-
52 kDa	14	%35,9	-	-
55 kDa	19	%48,7	-	-
57 kDa	3	%7,7	-	-
58 kDa	1	%2,6	-	-
59 kDa	6	%15,4	-	-
61 kDa	3	%7,7	-	-
62 kDa	1	%2,6	-	-
63 kDa	1	%2,6	-	-
64 kDa	5	%12,8	-	-
66 kDa	3	%7,7	-	-
70 kDa	3	%7,7	-	-
73 kDa	11	%28,2	-	-
75 kDa	7	%17,9	-	-
77 kDa	6	%15,4	-	-
79 kDa	14	%35,9	-	-
80 kDa	2	%5,1	-	-
81 kDa	3	%7,7	-	-

82 kDa	9	%23,1	-	-
84 kDa	6	%15,4	-	-
86 kDa	2	%5,1	-	-
88 kDa	10	%25,6	-	-
89 kDa	11	%28,2	-	-
95 kDa	9	%23,1	-	-
98 kDa	1	%2,6	-	-
111 kDa	2	%5,1	-	-
115 kDa	3	% 7,3	-	-
123 kDa	9	% 23,1	-	-
40-45-55 kDa	36	%92,3	-	-

Wb sonuçlarına göre trichinellosis için en anlamlı bantlar sırasıyla 40kDa moleküler ağırlığındaki bant, 16 (%41) hastada, 43kDa bant 18 (%46.1) hastada, 45kDa bant 32 (%82) hastada, 55kDa bant 19 (%48.7) hastada, 77-79kDa bant 20 (%51.2) hastada ve 88-90kDa bant ise 21 (%53.8) hastada pozitif olarak tespit edildi. 40-45-55 kDa ve 40-45 kDa ağırlığındaki bantlar birlikte değerlendirildiklerinde sırasıyla %92.3 ve %97.8 oranında sensitivitelere elde edildi (Grafik 1).



Grafik 1: Wb yöntemi ile en sık saptanan bantlar

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 (Kociecka, 2000; European Commission, 2001).

Serolojik tanıda kullanılan testler temelde, konağın infeksiyona karşı geliştirdiği hücrel ve sıvısal immün yanıtın nicel ve nitel yöntemlerle ölçülmesi esasına dayanır. Bu testlerde kullanılmak üzere farklı antijen tipleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en yaygın olarak krut, ES, tyvelose ve sentetik antijenler yer alır (Pozio, 2003b; De-la-Rosa, 1995). Krut antijenlerin, ES antijenine oranla daha duyarlı fakat daha az özgüllükte olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında somatik antijenlere karşı antikor yanıtının en erken ortaya çıktığı ve ES'ye karşı oluşan antikor yanıtının da ilk olarak düşüş gösterdiğini belirtilmiştir (Rodriguez-Osorio M ve ark., 2003).

Morakote ve ark., kaslardaki larvalardan elde edilen krut ve ES antijenlerinin oldukça duyarlı olduğunu fakat diğer parazit hastalıklarıyla çapraz reaksiyonlar oluşturduğunu saptamışlardır

(Morakote ve ark., 1991). Mahannop ve ark., diğer parazit hastalıklarını ve sağlıklı bireyleri kontrol grubu olarak aldıkları çalışmalarında, *T. spiralis*'in infektif dönem larvalarından hazırladıkları krut antijeni kullandıkları ELISA ile %96.8 spesifite oranı elde etmişlerdir. Bu krut antijen ile capillariasis, gnathostomiasis ve opisthorchiasisli hastalara ek olarak strongyloidiasis ve kancalı kurt infeksiyonu olan opistorchiasisli hasta serumlarıyla da çapraz reaksiyonların gözlemlendiği belirtilmiştir. Araştırmacılar yine aynı çalışmada, infeksiyonun 57. gününde krut antijen kullanarak yapılan ELISA testinin sensitivitesini %100 olarak tespit etmişlerdir (Mahannop ve ark., 1995)

Trichinella için oldukça yüksek spesifitede bir immünodominant epitop olan tyvelose (3,6-dideoksihegzos şekeri), son zamanlarda üzerinde sıkça çalışılan bir başka antijendir. Bu antijenin kullanımı ile her ne kadar non-spesifik reaksiyonlar gözlenmese de, krut ve ES antijenlerine göre daha düşük duyarlılıkta olması tyvelosun rutin testlerde kullanımını sınırlayan bir faktördür (Owen ve ark., 2001; Bruschi ve ark., 2001). Bruschi ve ark., trichinellosisin tanısında ES antijen ile beta-tyvelose-BSA'yı kıyasladıkları çalışmalarında IgG-ELISA için her iki antijen ile de %100 sensitivite ve IgE-ELISA için ise ES antijen ile %78, beta-tyvelose-BSA ile ise %100 sensitivite elde etmişlerdir (Bruschi ve ark., 2001).

Farklı araştırma gruplarının geliştirdiği monoklonal ve poliklonal antikörlerinin, erişkin *Trichinella*, yeni doğan larva (NBL) ve muskular larva (ML) total ekstratlarına karşı reaksiyonları ELISA, Wb, ve immunopresipitasyon teknikleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Ortega ve ark., 1996). Bu çalışma sonucunda TSL-1 ile TSL-8 arası sekiz farklı ML antijeni tanımlanmıştır. Bunlardan biyokimyasal ve immunolojik olarak en iyi tanımlanmış olan antijenik grup olan TSL-1, hem ES, hem de larva kutikül yüzeyinde bulunmaktadır. Ayrıca *Trichinella*'ya spesifik, fosforilkolin ile ilişkisi olmayan, immünodominant bir karbonhidrat epitopu olan tyvelose'ü içerdiği için son derece değerli olduğu bildirilmiştir (Ortega ve ark.,

1996). Biz de bu nedenlerle çalışmamızda TSL-1 antijen grubunu içeren ES ürünlerini tercih ettik.

Serolojik testlerde bazı pürifiye fraksiyonlar da kullanılmaktadır. Chapa-Ruiz ve ark., ELISA testinde antijen olarak poliacylamid jelden kaldırdıkları 43 ve 47 kDa ağırlığındaki antijenik bölgeleri (p43, p47 TsL1) kullanmışlar ve bunu kas larva antijeni kullanarak hazırladıkları ELISA ile karşılaştırmışlardır. 43kDa ve 47kDa TSL-1 ELISA testi ile tüm trichinellosis hastalarında ve kas larva antijenini kullandıkları ELISA ile düşük antikor titresi saptadıkları 8 hastanın 6'sında, bu test ile pozitif sonuç saptanmıştır. Ayrıca tüm kontrol gruplarında (sağlıklı vd parazitozlu) bu testle negatif sonuçlar elde etmişlerdir. Sonuç olarak bu 43 ve 47 kDa ağırlığındaki antijenik bölgeleri içeren pürifiye fraksiyonun, trichinellosis tanısında daha sensitif ve spesifik olduğunu bildirmişlerdir (Chapa ve ark., 1992).

Farklı konaklarda farklı antijenler kullanılarak yapılan tarama testlerinde ES antijeninin daha değerli olabileceği sonucuna varılmıştır. Sofronic-Milosavljevic ve ark., *Trichinella*'lı 5267 at serumu üzerinde, ES antijenini ve farklı konjugeleri kullanarak (protein A, protein G, koyun ve keçi) ELISA ve Wb testlerini uygulamışlardır. Kullanılan antijene bağlı olarak ELISA ile %3-6 oranında prevalans saptanırken, pozitif serumların tümünün sentetik tyvelos- glikan-BSA antijen ile negatif olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar eksperimental olarak infekte edilen atlardan alınan serumların ise pozitif olduğunu göstermişlerdir (Sofroniç ve ark., 2001).

Mahannop ve ark., *Trichinella* ES antijenini kullanarak çalıştıkları standart ELISA testiyle IgG antikorlarını araştırmışlardır. Trichinellosis olduğu ispatlanmış hastaların serumları çalışıldığında, IgG-ELISA testini infeksiyonun 57. ve 120. günlerinde %100 sensitivite ve %100 spesifitede bulurlarken 23. ve 700. günde toplanan serum örneklerinde

önemsenmeyecek kadar düşük antikor yanıtları saptamışlardır. Bu nedenle araştırmacılar, ES antijeni kullanılan IgG-ELISA ile hem hastalık tanısı konulabileceğini, hem de hastalık kürünün değerlendirilebileceğini savunmuşlardır (Mahannop ve ark., 1992).

Kapel ve ark., *T. spiralis*, *T. britovi* ve *T. nativa* ile eksperimental olarak infekte edilen deney hayvanlarıyla yaptıkları çalışmalarında, farklı antijen gruplarını kullanarak ELISA ile antikor yanıtlarını araştırmışlar ve infeksiyonun 35. gününden itibaren, kaslarda larva saptanmayan denekler de dahil olmak üzere tüm hayvan serumlarında dolaşan antikorları saptamışlardır. Antijen gruplarının etkinliklerine bakıldığında ise *T. spiralis*'in ES antijeni ile daha önce pozitiflik sergilediği gösterilmiştir.(Kapel ve ark 1998).

Bugün serolojik yöntemlerde kullanılan antijenler incelendiğinde ES antijeninin yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarına sahip antijen grubu olduğu görülmektedir (Dupouy-Camet J ve ark., 2002; Kociecka, 2000; European Commission 2001). Diğer taraftan ES antijenin, hangi *Trichinella* türü, genotipi veya suşundan elde edildiğinin önemli olmaması da bu antijenin değerini daha da artırmaktadır. Tüm bunlar dikkate alındığı zaman biz de çalışmamızdaki her iki testte de *T. spiralis*'ten elde edilen ES antijenini kullanmayı uygun bulduk.

Günümüzde trichinellosisin serolojik tanısında kullanılan birçok test bulunmaktadır. Ancak bu testler arasında kolay uygulanabilir, çabuk yanıt veren ve ekonomik olan testlerin seçilmesi önemlidir. Son yıllarda ELISA ve Wb yöntemleri en sık kullanılan teknikler olarak gösterilmektedir. ELISA yöntemi gerek yüksek sensitivitesi, gerekse yüksek spesifitesinden dolayı en sık tavsiye edilen ve özellikle epidemiyolojik araştırmalarda en sık kullanılan yöntemler arasındadır (Pozio ve ark., 2002).

Her gün yeni bir testin uygulamaya konulduğu günümüzde trichinellosisin serolojik tanısında ELISA ve Wb tekniklerinden farklı tekniklerin de değerli olup olmadığını değerlendiren çalışmalara rastlanmaktadır. Bu teknikler arasında IFAT, FAST-ELISA, PVC-ELISA, CIA (Competitive Inhibition Assay), dot-ELISA, Dipstick Assay, Dot Immunogold Filtrasyon, CC-dot ELISA (Cysteine capture dot enzyme-linked immunosorbent assay), CIEP (Counter-Current immunoelectrophoresis), Thin-layer Immunassay (TIA-ELISA) testleri bulunmaktadır.

Costantino ve ark insan trichinellosisinde ELISA ve IFAT testlerini değerlendirdikleri çalışmalarında, serolojik testlerin mutlaka birlikte değerlendirilmesi gerektiğini, tek test kullanılmasının tanıyı geciktirmenin yanında, yanlış tanıya neden olabileceğini iddia etmişlerdir (Costantino ve ark., 2001).

Cui ve ark., trichinellosis tanısında, pürifiye *Trichinella* larvalarından hazırladıkları donmuş kesitleri antijen olarak kullandıkları IFAT testini değerlendirmişlerdir. Çalışmada infekte farelerden, trichinellosisli hastalardan, diğer parazitözlu (filiariasis, echinococcosis, paragonimiasis) hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan serum örnekleri kullanılmıştır. Deneysel olarak infekte edilmiş 15 farenin serumunda, enfeksiyonun 2. haftasında anti-*Trichinella* antikorları gösterilirken, 467 trichinellosisli hastanın %86.5 inde bu antikorlar pozitif olarak saptanmıştır. Sağlıklı bireylerde antikor yanıtı gözlenmezken 48 paragonimiasisli hastanın 8'inde (%16.7) pozitiflik saptanmıştır. Trichinellosisli hastalarda, hastalığın başlangıcından 1, 2, 3 ve 4 hafta sonra sırasıyla %70.2, %91, %95.8, %100 oranlarında pozitiflik belirlenmiştir. Tedavi sonrası antikor yanıtındaki negatif konversiyon, tedavinin 1. ayında %24 ve tedavinin 4. ayında %75 olarak saptanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış antijenlerin yüksek sensitivite ve spesifite sergilediği ayrıca -20 °C'de 5 yıl saklanabildiği

bildirilmiştir. Bu çalışmada IFAT testinin tedavi izlemi için de faydalı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (Cui ve ark., 1999).

Azab ve ark., eksperimental olarak *T. spiralis* ile infekte ettikleri tavşanlarda FAST-ELISA (Falcon Assay Screening ELISA) ile standart ELISA testlerini karşılaştırmışlardır. Kan örnekleri ilk iki hafta için her gün ve 12. haftadan itibaren haftalık olarak alınmış, *Trichinella* spesifik antikorları saptamak üzere ELISA, FAST-ELISA teknikleri uygulanmıştır. *T. spiralis* krut larva antijenlerinin kullanıldığı testlerde antikor yanıtının ELISA ile 10. günde saptanabildiği, FAST-ELISA ile infeksiyonun 7. gününde bu yanıtın elde edilebildiği belirtilmiştir. Ayrıca her iki test için de 4. haftada maksimum antikor yanıtları elde edilmiş, sonuç olarak FAST-ELISA tekniği infeksiyonun erken tanısında ELISA'ya göre daha sensitif, uygulanması kolay ve hızlı bir teknik olarak değerlendirilmiştir (Azab ve ark., 1999).

Chen ve ark., insan trichinellosisinde 1988-94 yılları arasında sık kullanılan PVC-ELISA testini değerlendirdikleri çalışmalarında, klinik olarak konfirme edilmiş 56 hasta serumu kullanmışlar ve testi %100 sensitiv olarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları prevalans çalışmasında, endemik bölgede bu teknikle %10.63 oranında pozitiflik saptamışlar ve alan çalışmalarında bu tekniğin uygun olabileceği görüşünü bildirmişlerdir (Chen ve ark., 1997).

Kociecka ve ark., *Trichinella* invazyonunun geç dönem periyodunda ELISA ve CIA (Competitive Inhibition Assay) testlerini değerlendirmişler ve her iki testin birbirini tamamladığını; CIA'nın yüksek spesifitesi nedeniyle invazyonu takip eden ileri ve geç dönemlerde patolojik bulguların iyi bir göstergesi olduğunu ve immun cevabın değerlendirilmesinde önemli olabileceğini ortaya koymuşlardır (Kociecka ve ark., 2001).

Chan ve ark'nın ELISA ile dot-ELISA'yı karşılaştırdıkları çalışmalarında, konfirme edilmiş 18 *Trichinella* hastasında, standart ELISA ve dot-ELISA teknikleri benzer spesifite ve sensitivitede bulunmuştur. Çapraz reaksiyonların değerlendirilebilmesi için diğer parazitler enfeksiyonu olan 31 hasta incelenmiş ve standart ELISA ile 7 çapraz reaksiyon oluşurken dot-ELISA ile sadece 2 çapraz reaksiyon gözlenmiştir (Chan ve ark., 1988).

Su ve ark., domuz trichinellosisinin tanısında geliştirdikleri dot-ELISA tekniğinde, pürifiye edilmiş antijenleri ve monoklonal antikor affinity kromatografisi kullanmışlardır. ES ürünleri kullanıldığında, ELISA ve Wb kadar sensitiv ve en az Wb kadar spesifik olarak değerlendirilen bu teknikte düşük seviyedeki enfeksiyonların hepsini tanımladıklarını bildirmişlerdir (5.-6.haftalarda/ 0.08-4.74 larva/gr). Çalışılan 1960 örneğin 262'si standart ELISA ile pozitif bulunurken, Wb ile 15 ve dot-ELISA ile 16 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Araştırmacılar bu yüksek spesifiteyi türe spesifik denatüre edilmiş antijen kullanımına bağlamışlar ve dot-ELISA'nın Wb'den daha kolay bir teknik olduğu sonucuna varmışlardır. (Su ve ark., 1991).

Mahmoud ve ark., anti-*Trichinella spiralis* cystein proteinase (CyP) IgG aranması için geliştirilmiş CC-dot ELISA (Cysteine Capture dot Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) tekniği ile standart ELISA'yı karşılaştırmışlardır. Bu teknikte pürifiye edilmemiş *Trichinella* ES ürünlerinden CyP'yi yakalamak için cystatin ile sensitize edilmiş nitrosellülöz membranlardan faydalanılmış ve çalışma için ağır infekte edilmiş (300 larva/fare) ve hafif infekte edilmiş (100 larva/fare) farelerden 7., 14., 21., 56. günlerde alınan kanlar kullanılmıştır. CC-dot ELISA, ağır ve hafif enfeksiyonlarda enfeksiyonun 1. haftasında sırasıyla %86.6 ve %100 oranlarında pozitif reaksiyonlar vermiştir. Diğer kontrol farelerinde ve diğer parazitlerle infekte farelerde çapraz reaksiyonlar göstermeyen CC-dot ELISA tekniği; standart ELISA'nın % 93.3 spesifitesine karşın %100 spesifite de bulunmuştur.

Flubendazol tedavisi sonrasında yapılan incelemelerde standart ELISA ile hem tedavi sonrası kaslarında larva bulunduran hem de bulundurmeyen fare kanlarında pozitifliklerin saptandığı buna karşın CC-dot ELISA yöntemiyle sadece kaslarında larva kalmış fare kanlarında pozitiflik gözlemlendiği bildirilmiştir (Mahmoud ve ark., 2003).

Al-Sherbiny ve ark., trichinellosis tanısında Dipstick Assay'i, Enzyme-linked Immunoelctrophoresis Blot (EITB) ve Falcon assay screening test-ELISA (FAST-ELISA) ile karşılaştırdıkları çalışmalarında *T. spiralis* muscle larva antijenleri (TSML) kullanılmıştır. Trichinellosisli, diğer paraziter hastalıklı ve normal sağlıklı kişilerden toplanan serum örneklerine ilaveten *T. spiralis* ile infekte edilmiş ve infeksiyondan sonra belli aralıklarla sakrifiye edilmiş farelerden de serum örnekleri alınmıştır. İnsan trichinellosisi için sensitivite, spesifite ve tanısal kesinlik dipstick ve EITB için %100 iken, FAST-ELISA için %87.5 olarak tespit edilmiştir. FAST-ELISA hastalığın erken dönemi için (ikinci haftada %100 sensitif), dipstick assay ve EITB (üçüncü haftada %100 sensitif) den daha sensitif olarak bulunurken tüm testlerin sensitivitelerinin 12. haftaya kadar korunduğu gözlemlenmiştir. Dipstick Assay son derece kolay olması, 15 dakika içinde okunabilmesi ve yüksek sensitif ve spesifik olması nedeniyle, EITB ve FAST-ELISA gibi yöntemlerin uygulanamadığı laboratuvar koşullarında önemli bir alternatif yöntem olarak öngörülmüştür (Al-Sherbiny ve ark., 2004).

Liu ve ark., 2003 yılında yayınladıkları çalışmalarında, trichinellosisli hastaların IgG'lerinin tanımlanmasında yeni bir yöntem olarak tanımlanan Dot Immunogold Filtrasyon yöntemini yüksek sensitivite ve spesifitede bulduklarını bildirmişler, *T. spiralis* kas larvalarının membran antijenlerinin kullanıldığı çalışmada 76 serumun %94.7'sinde pozitiflik saptamışlardır (Liu ve ark., 2003).

El-Temsahi ve ark., trichinellosis tanısında CIEP (Counter-Current immunoelectrophoresis) ve ELISA tekniklerini değerlendirdikleri çalışmalarında, krut larva antijeni kullanarak infeksiyonun 1., 2., 5., 8., ve 12. haftalarında alınan serum örneklerinde antikor yanıtlarına bakmışlardır. ELISA ile 12. haftaya kadar alınan tüm örneklerde pozitif sonuçlar elde edilmiş, buna karşın CIEP ile infeksiyonun 2. haftasında örneklerin sadece %36'sında, 5. ve 8. haftalarda tüm örneklerde, 12. haftada ise örneklerin % 90' ında pozitiflik saptanmıştır. Bu sebeple ELISA hastalığın erken ve geç döneminde daha sensitif olarak değerlendirilirken, CIEP yalancı pozitif reaksiyonlar vermemesi nedeniyle daha spesifik bir test olarak değerlendirilmiştir (El-Temsahi ve ark 1992).

Gomez-Priego ve ark., insan trichinellosisinde antikor saptamaya yönelik bir serolojik test olarak değerlendirdikleri Thin-layer Immunassay (TIA-ELISA) immunoenzimatik yöntemini, Wb ile doğrulanmış kas biyopsisi pozitif olan 8, semptomolojik olarak pozitif 26 ve sağlıklı 67 kişiye uygulamışlardır. Standart ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %76 ve %94 olarak bulunurken, TIA-ELISA için her iki parametre de %91 olarak değerlendirilmiştir. TIA-ELISA testinin, genel laboatuvar koşullarında 3 saatte çalışılabilmesi, Wb ve ELISA da olduğu gibi kantitatif antijen gerektirmemesi, uygulanmasının kolay, ucuz olması ve oldukça sensitiv ve spesifik bir yöntem olması nedeni ile ELISA ve Wb gibi testler için gerekli laboratuvar koşulların olmadığı durumlarda alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Gomez-Priego ve ark., 2000).

Biz de çalışmamızda, günümüzde kullnılan yukarıda bahsettiğimiz birçok test arasından, trichinellosis tanısında rutin laboratuvar olanakları içinde uygulanması kolay, birçok serum örneğinin eř zamanlı incelenmesine olanak sağlayan ve duyarlı bir yöntem olan standart ELISA ile Wb yöntemlerini bir arada kullanmayı uygun gördük.

Yurt dışında yapılan birçok çalışmada IgG, IgM, IgE ve IgA tipi antikorların trichinellosis tanısı için değerlilikleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda IgG'nin hastalığa karşı oldukça spesifik bir antikor yanıtı geliştirdiği bildirilmiş ve kanda saptanabilme dönemleri göz önüne alındığında hastalığın tanısını koyma açısından, en uygun antikor tipi olduğu gösterilmiştir (Morakote ve ark., 1991; Dupuoy-Jamet ve ark., 2002). Biz de çalışmamızda kullandığımız yöntemler olan ELISA ve Wb testlerinde anti- *Trichinella* IgG antikorlarını araştırdık.

Morakote ve ark., IgG -ELISA'nın 1 aydan önceki vakalarda maksimum sonuç vermediğini ancak 2. aydan sonra %100'e yakın sensitivitenin elde edildiği bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında enfeksiyonun 23., 50. ve 57. günlerinde IgG-ELISA ile sırasıyla %68.75, %100 ve %100; IgM-ELISA ile de sırasıyla %12.5, %85.71, %93.33 oranında pozitif sonuçlar elde etmişlerdir. Mendez ve ark., ise IgG-ELISA ile 3. haftada, ancak vakaların %31'inde tanı koyulabildiğini; bu dönemlerde diğer antikorların arandığı tanı yöntemlerinin daha yararlı olacağını bildirmişlerdir (Mendez-Loredo ve ark., 2001; Morakote ve ark., 1991).

IgG-ELISA'nın özellikle geç vakalarda, diğer antikorları arayan testlerden çok daha değerli olduğu bildirilmektedir. Brushi ve ark., 1986 yılında İtalya'nın güneyindeki salgın sırasında yaptıkları çalışmalarında *T. britovi*'e özgü antikorları araştırmışlar, standart ELISA ile IgG ve IgM, güçlendirilmiş ELISA ile IgE ve ayrıca IFAT ile IgG antikorlarını taramışlardır. Enfeksiyonun ilk döneminde tüm testlerde hemen hemen aynı oranlarda pozitif sonuçlar elde edilirken (%78.2-86.9), enfeksiyondan 1 yıl sonra en yüksek pozitiflik ELISA-IgG ile %55 oranında saptanmıştır. Diğer testlerde ise bu oran %20-38.5 şeklinde bulunmuştur. Enfeksiyonun 2. ayında kesin tanımı yapılmış olguları en iyi tespit eden yöntem IFAT- IgG olarak bulunsa da, özellikle geç dönem insan trichinellosis tanısında ELISA-IgG nin en duyarlı test olduğu sonucuna varılmıştır (Brushi ve ark., 1990).

IgE antikorlarının trichinellosiste en erken dönemde saptanan antikorlar olmasına rağmen yarılanma ömürlerinin oldukça kısa olmasından dolayı çok nadir olarak saptandıkları önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Dupouy-Camet, 2002). Bunun yanında *Trichinella* spesifik IgA antikorlarının özellikle erken dönem enfeksiyon tanısında yararlı olabileceğini bildiren çalışmalara sıkça rastlanmaktadır. Mendez ve ark., Meksika'daki salgında yeni doğan larva (YDL) antijenlerini ELISA da kullanarak hastalarda antikor yanıtlarına bakmışlardır. YDL antijenlerini tanıyan IgA antikorları enfeksiyonun 3. haftasında hastaların %80'inde, 5.-7. haftalar arasında ise %82- 100'ünde pozitif olarak bulunmuştur. IgE antikorları hastalığın 3. haftasında %44, IgM antikorları %19 oranında pozitif bulunurken; 5.-7. haftasında ise % 0-82 arasında pozitif bulunmuştur. Yine 37.-57. haftalar arasında IgA, IgE, IgM'in, YDL'ya karşı reaktiviteleri %0-38 arasında bulunmuştur. Tüm bu sonuçlara göre IgA'nın, epidemiyolojik çalışmalarda ve salgınlarda trichinellosisin erken dönem tanısı için faydalı olabileceği bildirilmiştir (Mendez ve ark., 2001).

Contreras ve ark., trichinellosis tanısında IgA-ELISA ve IgM-ELISA değerlendirdikleri çalışmalarında IgM-ELISA sensitivitesini %82.2-100, spesifitesini %92.3-97.8 olarak saptamışlardır. IgA-ELISA sensitivitesini ise %86.7-100 ve spesifitesini ise %97.8- 100 olarak tanımlamışlardır (Contreras ve ark 1999).

Yugoslavya'ya kısa turistik gezi yaptıkları esnada infekte et yiyen 5 kişilik bir aile bireylerinin Hollanda'ya döndükten sonra hastalanmaları üzerine 1., 2., 6. ve 18 aylarda alınan kanlarında IgG, IgM ve IgA antikor düzeyleri, ES antijeni kullanılarak hem ELISA, hem de Wb teknikleri ile araştırılmıştır. Semptomatik üç hastada da en kuvvetli yanıt IgM yanıtı olarak gözlenmiş, 2. ayda başlayan antikor yanıtının 18. aya kadar devam ettiği

görülmüştür. IgG yanıtı yine aynı hastalarda 18. aya kadar yükselerek devam etmiş ve bu ayda en yüksek titredeki antikor olarak değerlendirilmiştir. IgA antikor yanıtı da başlangıçta yüksek olmak üzere bu üç semptom gösteren bireyde de saptanmıştır. Buna karşın asemptomatik bireylerde antikor yanıtı gözlenmemiştir. Wb yöntemi sonuçlarına göre de bazı bireylerde ELISA sonuçlarının negatif olduğu dönemde antikor yanıtları gösterilebilmiştir. Özellikle vejeteryan olan bir bireyde ne ELISA ile ne de Wb ile spesifik antikorların gösterilemediği belirtilmiştir (Pinelli ve ark., 2003).

Au ve ark., IgE, IgG, IgM-ELISA ve ayrıca IgG-RIA ile IHA testlerinin değerlendirilmesi amacıyla, klinik özellikleri bakımından akut trichinellosisli 18 hasta ve diğer parazitöz 35 hastanın serumlarını çalışmışlardır. Güçlü amplifikasyon etkisi oluşturmak amacı ile ek bir antikor tabakası eklenerek çalışılan IgE-ELISA testi ve IgM-ELISA testi ile %100 spesifite ve sensitivite elde edilirken IHA, IgG-RIA ve IgG-ELISA ile %94 sensitivite elde edilmiş, ancak özellikle IgG-ELISA ve IgG-RIA testlerinde non spesifik reaksiyonlar gözlenmiştir. Kas biyopsisi ise hastaların sadece %56'sı pozitif olarak saptanmıştır (Au ve ark., 1983).

Pozio ve ark., *T. spiralis* ve *T. britovi* infeksiyonlarını karşılaştırdıkları zaman *T. britovi* infeksiyonlarında parazite spesifik antikorların görülme sürelerinin daha uzun olduğunu bildirmişlerdir (Pozio ve ark., 1993)

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz IgG-ELISA testiyle trichinellosis şüpheli 39 hastanın 29 inde 1/100 dilüsyonda pozitif sonuç elde edilmiştir. Diğer 10 hastada ara pozitif sonuçlarla karşılaşılırken, kontrol grubu hastalarında herhangi bir reaksiyon gözlenmemiştir. Pozitif hastaların çoğunda, serumların çiğ et yeme öyküsünden sonraki 1 ay içinde alınmış olması, *Trichinella* spesifik IgG antikorlarının hastalığın erken tanısını koymada etkin olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte başta ara pozitif serumlar olmak üzere tüm şüpheli kişilerin

serumlarının belli periyotlarla tekrar incelenmesinin sensitivite oranlarını daha da yükselteceği düşüncesindeyiz.

Özellikle yurdumuzdaki salgının *T. britovi* kaynaklı olduğu düşünüldüğünde, serum antikor düzeylerinin daha uzun süreler yüksek seyredeceği ve bu sebeble prevelans çalışmalarında bu durumun göz önüne alınması gerektiği unutulmamalıdır. Çalışmamızda kontrol grubunda görülen, trichinellosis için spesifik bantların değerlendirilmesi esnasında da bu durumu düşünerek bu kişilerin eski trichinellosis vakaları olabileceği ihtimalini düşündük.

Trichinellosis seyrinde antikor yanıtında gözlenen değişiklikler, tanıda kanda dolaşan immun komplekslerin ve antijenlerin araştırılmasını gündeme getirmiştir. Ancak özellikle antijen aranmasına yönelik testler, gerek özel personel, gerekse özel laboratuvar koşulları gerektirmelerinden dolayı hastalığın tanımlanmasında ve izleminde uygulanması oldukça güçtür (Feldmeir, 1987; Dubenski, 1994). Tüm bu zorluklara rağmen bazı araştırmacılar *Trichinella* tanısında antijenleri aramanın, spesifik antikorları aramaktan daha yararlı olduğunu belirtmişlerdir (Nishiyama ve ark., 1992).

Nishiyama ve ark., Sandwich' ELISA ile kanda dolaşan *T. spiralis* antijenlerini saptamaya çalışmışlar ve yöntemin sensitivite ve spesifitesini değerlendirirken 4 farklı antijen (*T. spiralis*, *Trichirus trichiura*, *Dirofiliaria immitis*, *Ascaris suum*) kullanmışlardır. Yöntem *T. spiralis* için sensitif ve spesifik bulunmuştur. *T. spiralis* içeren etleri az pişmiş olarak yiyen trichinellosis şüpheli 347 hasta bu yöntemle çalışılmıştır. Klinik semptom gösteren hastalarda antikor varlığı %18.9 oranında, oluşan antijenlerin ise %29.9 oranında bulunduğu, klinik belirti vermeyen olgularda ise bu oranın sırasıyla %5 ve %21.4 olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, araştırmacılar dolaşan antijenleri aramanın, *Trichinella* tanısında spesifik antikorları aramaktan daha yararlı olduğunu belirtmişlerdir((Nishiyama ve ark., 1992).

Çapraz reaksiyonlar trichinellosis serolojisinde en sık karşılaşılan sorunlardan biri olarak görünmektedir. Özellikle nematod grubundan parazitler arasında birçok benzer epitopun bulunması, çapraz reaksiyonların en önemli sebepleri arasında gösterilmekte ve parazit ekstratlarının krut olarak kullanıldığı çalışmalarda bu tip reaksiyonların saptanabileceği, ES antijenleri veya yüzey pürifiye antijenlerin kullanılması durumunda ise bu reaksiyonların daha az gözleneceği bildirilmektedir (De-la-Rosa ve ark., 1995).

Marakote ve ark., trichinellosisli ve diğer parazitik infeksiyonlu (intestinal nematod ve sestodlar) hastalardan topladıkları serum örneklerinde ELISA ile *Trichinella* spesifik IgG ve IgM antikolarını çalışarak çapraz reaksiyonları araştırmışlar ve en güçlü intestinal capillariasiste olmak üzere IgG-ELISA ile %20.93, IgM- ELISA ile de %9.30 oranında çapraz reaksiyonlarla karşılaşmışlardır (Marakote ve ark., 1991).

Yera ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ELISA ile negatif kontrollerin hiçbirisinde yalancı pozitiflik saptanmazken, otoimmün ve diğer paraziter hastalıklı çalışma gruplarında gruplarında sırasıyla %4.3 ve %39.2 yalancı pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Yera ve ark., 2003).

Dela Rosa ve ark., *Trichinella* infeksiyonu tanısında karşılaşılabilecek çapraz reaksiyonları değerlendirmek için ELISA ve Wb testlerini kullandıkları çalışmalarında trichinellosis (25serum), brucellosis (31), toxoplasmosis (16), typhoid ateş (12), amebiasis (8), trichocephaliasis (1), cysticercosis (99), ascariasis (20) ve onchocerciasis (17)'li hasta serumlarını çalışmışlardır. Tüm *Trichinella*'lı hasta serumlarında ELISA ile pozitif sonuç bulurlarken Wb ile de önceden belirtilmiş bant paternleri elde etmişlerdir. Diğer grup hastalıklarda ELISA ile yalnızca 1 onchocerciasis hastası dışında tüm hastalarda, trichinellosise özgün antikora rastlamamışlardır. Wb sonuçlarına bakıldığında ise ELISA

ile negatif bulunan bir ascariasis olgusunda ve onchocerciasis olgularının çoğunda silik de olsa bant paternlerini göstermişlerdir (77 kDa da bir bant). Fakat diğer gruplar için herhangi bir bant gözlememişlerdir (De-la-Rosa ve ark., 1995).

Biz de çalışmamızda *Trichinella* tanısında kullandığımız standart IgG-ELISA testinin olası çapraz reaksiyonlarını değerlendirmek amacıyla toplumumuzda daha sık gözlenen parazit hastalıklarından toxocariasis ve fascioliasis infeksiyonlarını ele aldık. ES antijenini kullandığımız IgG-ELISA testi ile çalışılan 2 toxocariasis ve 4 fascioliasis serumunun hiçbirisinde pozitif sonuçla karşılaşmadık. Bu sonuç daha sonraki olası *Trichinella* salgınlarında elimizdeki ES antijenini kullanabileceğimizi öngörebilir. Fakat çapraz reaksiyonları tam olarak değerlendirebilmek için, farklı paraziter hastalık gruplarından, daha fazla serumun çalışılması gerektiği inancındayız.

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(Rodriguez-Osorio M , 2003; Yera ve ark., 2003).

Wb testinin özellikle hastalığın başlangıç döneminde, ELISA dahil diğer testlerden daha fazla değerli bir test olduğu bildirilmektedir. İspanya'nın Granada bölgesinde yaşanan 140 kişinin infekte olduğu üçüncü *T. britovi* salgınında, semptomların başladığı dönemde Wb testi ile ELISA ve IFAT'a göre daha fazla sayıda pozitif olgunun saptandığı bildirilmiştir. Rodriguez-Osorio M ve ark., toplam 52 hastayı içeren çalışmalarında, hastaların IgG düzeylerinin orta seviyelerde bulunduğunu görmüşler ve infeksiyondan 6 ay sonra ELISA ile diğer iki testten daha az pozitiflik saptamışlardır (Rodriguez-Osorio M, 2003). Biz de çalışmamızda klinik semptomlar açısından kuvvetle trichinellosis olduğu düşünülen 11 hastanın ELISA ile,

şüpheli düzeylerde kaldığını gördük. Fakat bu ara pozitif hastaların tümünün Wb ile pozitif olarak bulunması, özellikle hastalığın erken döneminde ELISA ile yaşanabilecek ara pozitif sonuçların, kesin tanı açısından Wb ile değerlendirilmesi gerektiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Hassanain ve ark.'nın erişkin krut antijen kullanarak uyguladıkları Wb'da, insan, domuz ve sıçan için sırasıyla 45.00, 75.35 ve 57.98 kDa ağırlığındaki antijenik bantlar, *Trichinella* için anlamlı bulunurken, erişkin ES antijen kullanılarak yapılan Wb'da ise sırasıyla 26.00, 24.00 ve 46.99 kDa ağırlığında bantlar değerli bulunmuştur (Hassanain ve ark., 2004). Çalışmamızda, 45 kDa ağırlığındaki bant, standart ELISA ile pozitif olarak değerlendirilmiş hastaların %82 sinde gözlenmiş ve bu bant, çalışmamızda *Trichinella* tanısı için en sensitif bant olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 95 kDa ağırlığındaki bantın pozitif hastaların %23'ünde, 61-66 kDa bantın, %33 hastada ve 38-40 kDa arasındaki bantların da yine pozitif hastaların %56.4'ünde olduğunu gördük. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak Mahannop ve ark., ise Wb ile *T. spiralis* için 94 kDa, 67 kDa, 63 kDa ve 39 kDa ağırlığındaki komponentleri değerli antijenik bantlar olarak değerlendirmişlerdir (Mahannop ve ark., 1992).

Chapa-Ruiz ve ark. *T. spiralis* kas larvasının total solubl ekstraktlarına insan antikor cevabını Wb ile çalışmışlardır. En sık tanımlanan antijenleri 96, 67, 63, 55 ve 47kDa ağırlığında belirlemişlerdir (Chapa ve ark., 1992). Alcantara ve ark., *T. spiralis* krut antijenini kullandıkları Wb testi ile trichinellosis hastalarının serumlarını çalışmışlardır ve 38 ile 104 kDa arasında sekiz ayırt edici bant tanımlamışlardır (Alcantara ve ark., 1993). Çalışmamızda Wb testinde ES antijeni kullanılmış ve hasta ve kontrol gruplarında 14-123 kDa arasında farklı sensitivitelere, tekli, ikili ya da üçlü toplam 47 bant saptanmıştır.

Nunez ve ark., insan trichinellosisinin akut ve kronik döneminde, ES antijenini kullanarak Wb yöntemini uygulamışlardır. Tekli, ikili veya üçlü yerleşimli 66, 55, 45, 36, 29, 24 ve 14 kDa ağırlığa uyan bölgelerde yoğunlaşmış 13 bant tanımlamışlardır. Araştırmacılar yaklaşık 55, 36, 29 ve 14 kDa ağırlığındaki bantları *T. spiralis* için spesifik bulurken, 55 kDa'nun tüm hasta serumlarında gözleendiğini buna karşın 14 kDa bantın ise serumların küçük bir yüzdesinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca kronik trichinellosis vakalarında Wb tekniğinin, özellikle endemik bölgelerdeki surveyans çalışmalarında standart bir yöntem olan ELISA dan daha sensitif olduğunu bildirmişlerdir (Nunez ve ark., 2000). Çalışmamızda 55 kDa ağırlığındaki bant %48.7 oranıyla *Trichinella* için en değerli bantlar arasında değerlendirilmiştir. Yine Nunez ve ark'nun *T. spiralis* için spesifik olarak değerlendirdikleri 14 kDa ağırlığındaki bant, araştırmacıların sonuçlarına benzer bir biçimde bizim çalışmamızda da düşük bir yüzde de bulunmuş, fakat kontrol gruplarının hiçbirisinde saptanmamıştır. Diğer taraftan çalışmamızdaki sensitivitesi en düşük bantlar incelendiğinde 29, 32, 34, 58, 62 ve 63 kDa ağırlığındaki bantlar 11 kontrol hastasının hiçbirisinde gözlenmezken, pozitif olarak değerlendirilen hastalarda %2.6 sensitivitede gözlenmiştir.

Wb yönteminin trichinellosisin erken dönem tanısında ELISA'dan çok değerli olduğu ve bu dönemde tanı koymada tek serolojik yöntem olabileceği bildirilmiştir (Yera ve ark., 2003). 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. Yera ve ark., trichinellosis tanısında IF ve ELISA ile karşılaşılan çapraz reaksiyonları aşabilmek amacıyla *T. spiralis* krut ekstratlarını kullanarak endüstriyel Wb stipleri dizayn etmişler ve trichinellosisli 60 hastanın tümünde 43, 44, 64, 96 ve 127 kDa ağırlığında bantları gözlemişlerdir. Araştırmacılar 43-44 kDa ve 64 kDa bantlarını %100 sensitif olarak bulmalarının yanısıra, %98,8 ile en spesifik bantlar (sadece bir

kontrolde, anisakiasis) olarak değerlendirilmiştir (Yera ve ark., 2003). Benzer şekilde çalışmamızda 40-45 kDa bantlarını birlikte değerlendirdiğimizde %97.8 oranında sensitivite elde ettik. Ancak 45 kDa bantı 3 sağlıklı kontrol hastasında da pozitif olarak bulduk. 64 kDa bantının çalışmamızda sadece 5 (%12.8) hastada pozitif bulunması, araştırmacıların farklı krut antijen kullanmış olmalarından kaynaklanıyor olabilir.

Robert ve ark., trichinellosis tanısında IFAT ile gözlenen çapraz reaksiyonları Wb ile tanımlamaya çalışmışlardır. Wb ile *Trichinella* serumlarıyla 47, 55 ve 90 kDa da spesifik bantlar tanımlanmıştır (Robert ve ark., 1996). Bizim çalışmamızda 47 kDa bantı pozitif hastaların %25.6 sında gözlenirken sağlıklı kontrol gruplarında rastlanmamıştır. Robert ve ark nın bulgularına paralel olarak, biz de 88-90 kDa ağırlığındaki bantları %53.8 sensitivite ile trichinellosis tanısında en değerli bantlar arasında sıraladık.

Pinelli ve ark., IgM ve IgG antikolarını tanımlayan ES antijenin komponentlerini Wb yöntemini kullanarak tanımlamaya çalışmışlardır. Özellikle 45 kDa ile spesifik IgG4 yanıtının birlikteliği ortaya konurken echinococcosis, filariasis, cysticercosis, ascariasis, strongyloidasis veya toxocariasisli hasta serumlarında ise bu ilişki gösterilememiştir (Pinelli ve ark., 2001). Yine aynı araştırmacılar IgG4 yanıtının tetiklenmesi için sürekli bir antijen maruziyetinin gerekli olduğunu belirtilerek, 1. aydan önce bu yanıtın alındığı hastaların daha önceden infekte ete maruz kalmış olabileceğini bildirmişlerdir (Pinelli ve ark., 2004). Çalışmamızda, 45 kDa antijenik bantı %82 oranıyla en fazla gözlenen bant olarak değerlendirdik. Özellikle diğer araştırmacıların belirttiğinin aksine uyguladığımız IgG ELISA testinin infeksiyonun 1. ayından önce de yüksek pozitiflikler vermesi önceden bu infeksiyona sürekli bir maruziyetin olabileceğini de düşündürülebilir. Bu perspektiften bakıldığında ülkemizde önceden bilinmeyen küçük çaplı salgınların, ya da sporadik vakaların olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır.

Yera ve ark., *T. spiralis* krut ekstratları ile hazırladıkları Wb striplerini kullandıkları çalışmalarında amebiasis, strongyloidosis, hydatidosis, malarya, toxoplasmosis serumlarında hiçbir reaksiyon gözlememişler, anisakiasis, bilharziasis, cysticecosis, filariasis, toxocariasis, fascioliasisli hasta serumlarında, zayıf reaksiyonlar bulmuşlardır (20 serumda 127 kDa, 16 serumda 96 kDa, 10 serumda 110 kDa, 4 serumda 64 kDa, 2 serumda 43 kDa, 1 serum örneğinde ise 44-46 kDa). Otoimmün hastalıklara ait, 11 serum örneğinde 127 kDa, 10 örnekte 110 kDa, 2 örnekte 43 kDa bantları saptamışlardır. Kontrol gruplarının çoğunda 127, 110 ve 96 kDa bantları da saptandığından, bu bantlar en az spesifik bantlar olarak değerlendirilirken, akut trichinellosisli tüm hastalarda ve sadece bir kontrolde (anisakiasis) 43-44 kDa ve 64 kDa bantları gösterildiğinden bu bantlar %98,8 ile en spesifik bantlar olarak değerlendirilmiştir (Yera ve ark 2003).

Robert ve ark., *Trichinella*, otoimmün ve *Trichinella* dışı paraziter hasta (hydatidosis, filariasis, leishmaniasis, fascioliasis, schistosomiasis) serumları ile hem IFAT, hem de Wb tekniklerini çalışmışlardır. Bu çalışmada, otoimmün ve diğer parazitozlu hasta gruplarında, doku kesitlerine karşı belli serum dilüsyonlarında pozitiflik saptanmıştır. Leishmaniasiste 60 kDa, filariasiste 85 kDa, schistosomiasiste 85, 90 ve 120 kDa ağırlığında bantlar tanımlanmıştır. Otoimmün hasta serum örneklerinden 3'ünde Wb ile 47, 55 kDa bantlar gösterilmiştir. Sonuçta bazı otoantikorların da *Trichinella* antijen epitoplarıyla reaksiyona girebileceği bildirilmiş. Diğer parazit infeksiyonlu hasta serumlarında görülen bantların da yine ortak antijenik epitoplara karşı oluşmuş reaksiyonlarla veya HSP60, HSP90 gibi stress proteinlerine karşı oluşan antikor yanıtlarıyla meydana gelmiş olabileceği bildirilmiştir (Robert ve ark., 1996).

Biz de çalışmamızda da hepsi sağlıklı kontrol grubunda olmak üzere 20, 28, 33, 43, 45, 47, 50, 52, 57, 61, 82, 115 ve 131 kDa bantlarda düşük yoğunluklarda reaksiyonlar saptadık.

Sonuç olarak, ES antijenini kullanarak hem standart ELISA, hem de Wb tekniklerini trichinellosis tanısında başarıyla uyguladık. Yurdumuzda meydana gelebilecek bundan sonraki olası *Trichinella* salgınlarında, tarama testi olarak standart ELISA'yı başarıyla uygulayabileceğimiz ve özellikle şüpheli olgularda ya da hastalığın erken dönemlerinde diğer testlerin henüz negatif olduğu durumlarda Wb tekniğinin kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna vardık.



SONUÇ

Araştırmamızda trichinellosisli hastaların serolojik tanılarında ES antijen kullanılarak hazırlanan standart ELISA ve Wester blot testlerinin son derece değerli olduğunu gördük. Özellikle trichinellosis salgınları gibi büyük popülasyonları etkileyen durumlarda tarama testi olarak ES antijenin kullanıldığı standart ELISA'nın uygulanabileceği, bu testle kesin tanının konulmadığı durumlarda doğrulama testi olarak Wb yönteminin yararlı olduğu sonucuna vardık. Ancak elde ettiğimiz diğer bir sonuca göre sağlıklı gruplarda da Wb ile değerli bazı bantların ortaya konulması, trichinellosisde çapraz reaksiyonlar ile ilgili çalışmalara ihtiyaç olduğunu ve testlerin spesifitelerinin de ortaya konulması gerekliliğini gösterdi. Çözüm olarak özellikle sporadik olgularda, en az bu iki serolojik testin birlikte değerlendirilmesinin şart olduğu inancındayız.

Türkiye'de oluşan ilk büyük trichinellosis salgınından sonra ülkemizin tekrar karşılaşacağı salgınlar ve sporadik olgular karşısında, tanı amacı ile serolojik testlerden ELISA ve Wb testlerinin güvenle kullanılabilmesi sonucuna vardık.

ÖZET

Trichinellosis, insan ve diğer birçok vertebralıyı etkileyen, *Trichinella* türleriyle meydana gelen bir parazit hastalığıdır. Tüm dünyada halk sağlığını tehdit eden bu hastalık, geniş yayılım gösteren helmantik zoonozlardan biridir. Ocak 2004 tarihinde İzmir’de, sığır ve domuz eti karışımından yapılan çiğ köfte tüketilmesine bağlı olarak bir trichinellosis salgını ortaya çıkmıştır. Etiyolojik ajanın *T. britovi* olduğu saptanmıştır (Trichinella International Reference Centre, Istituto Superiore di Sanità, Roma).

Bu çalışmada ekskretuar/sekretuar (ES) antijen kullanılarak yapılan standart ELISA testi, Western blot (Wb) testi ve ticari IgG-ELISA testi ile trichinellosisde IgG antikorları arandı. Çalışma grubunu 39 trichinellosis hasta serumu ve kontrol grubunu 3’ü *Toxocara* pozitif, 2’si *Fasciola* pozitif ve 6’sı sağlıklı olmak üzere 11 kontrol serumu oluşturdu. Tüm serumlar önce ES antijenin kullanıldığı standart ELISA ile değerlendirildi. Trichinellosis pozitif olan 39 hasta serumunun hepsi standart ELISA ile pozitif olarak belirlenirken, 11 kontrol grubunun hepsi negatif olarak bulundu. Ticari IgG-ELISA kiti ile ise 39 serumun 22’si (%56) pozitif olarak saptandı. Wb sonuçlarına göre trichinellosisli hasta serumlarında 14 kDa ile 123 kDa arasında benzer bant profilleri gözlemlendi. Bu serum örneklerinin en çok; 40 kDa (%41), 43 kDa (%46.1), 45 kDa (%82), 55 kDa (%48.7), 77-79 kDa (%51.2), ve 88-90 kDa (%53.8) moleküler ağırlığındaki antijenik bantları, farklı sensitivitelere tanındığı saptandı. Ayrıca 40-45 kDa bant kompleksinin sensitivitesi %97.4 olarak bulundu.

Bu araştırma ile insan trichinellosisinde ES antijeni kullanılarak yapılan ELISA ve WB testlerinin özellikle salgınlarda erken tanıda değerli olduğu sonucuna varıldı.

SUMMARY

Trichinellosis is a parasitic disease caused by *Trichinella* spp. that affects human and many other vertebrates. This disease, one of the most widespread helminthic zoonoses, is a public-health concern throughout the world. In January 2004, an outbreak of trichinellosis occurred in İzmir, Turkey, following the consumption of raw minced meat ball made with both beef and pork. The etiological agent has been identified as *Trichinella britovi* (Trichinella International Reference Centre, Istituto Superiore di Sanità, Roma).

In the present study, a conventional ELISA, Western blot (Wb) assay using an excretory/secretory (ES) antigen and commercial IgG-ELISA kit have been evaluated for the IgG antibody detection in trichinellosis. Serum samples were collected from 39 persons with trichinellosis and from 11 control individuals: 3 with a positive serology for *Toxocara*, 2 for *Fasciola* and 6 healthy subjects. All of sera have been previously tested by a standart ELISA using ES antigen. By ELISA, serum samples from the 39 persons with trichinellosis resulted positive, and serum samples from the other 11 persons were negative. Whereas, 22 serum samples from the 39 persons with trichinellosis resulted positive by commercial kit. In Wb analysis, serum samples from the 39 persons suffering for trichinellosis showed common profile bands with band size ranging from 14 to 123 kDa. These serum samples recognized the following antigenic bands with a different sensitivity: 40 kDa (sensitivity 41%), 43 kDa (46.1%), 45 kDa (82.0%), 55 kDa (48.7%), 77-79 kDa (51.2%) and 88-90 kDa (53.8%). Also the band complex of 40-45 kDa showed 97.4% sensitivity.

As a result of this study, ELISA and Wb tests using ES antigen are found valuable in early diagnosis of human trichinellosis especially in outbreaks.

KAYNAKLAR

- Alcantara P, Correa D.** Human humoral immune responses against *Trichinella spiralis*. Int J Parasitol. 1993; 23: 657-660.
- Al-Sherbiny MM, Farrag AA, Fayad MH, Makled MK, Tawfeek GM, Ali NM.** Application and assessment of a dipstick assay in the diagnosis of hydatidosis and trichinosis. Parasitol Res. 2004; 93:87-95.
- Ancelle T.** History of trichinellosis outbreaks linked to horse meat consumption 1975-1998. Euro Surveill. 1998; 3: 86-89.
- Andrews JR, Ainsworth R, Abernethy D.** *Trichinella pseudospiralis* in humans: description of a case and its treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994; 88: 200-203.
- Anonymous.** Outbreak of trichinellosis in Southeast England. Eurosurveillance Weekly. 2000; 13: 2.
- Arriaga C, Muniz E, Morilla A, Ortega-Pierres G.** *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp Parasitol. 1989; 69: 363-372.
- Au AC, Ko RC, Simon JW, Ridell NJ, Wong FW, Templer MJ.** Study of acute trichinosis in Ghurkas: specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to *Trichinella* larval antigens in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77: 412-415.
- Azab ME, Fekry AA, Abbas MM, Khalifa KE, Tawfik RA.** Evaluation of FAST-ELISA for the diagnosis of experimental trichinosis. J Egypt Soc Parasitol. 1999; 29: 247-259.

Azab ME, Morsy TA, Abdel-Aal TM, Safar EH, Makaram SS, el Hady HM, Kamel AA. Current prevalence of trichinosis in pigs in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 1988; 18: 383-389.

Bandi C, La Rosa G, Bardin MG, Damiani G, de Carneri I, Pozio E. Arbitrarily primed polymerase chain reaction of individual *Trichinella* specimens. *J Parasitol.* 1993; 79: 437-440.

Baruch AM, Despommier DD. Blood vessels in *Trichinella spiralis* infections: a study using vascular casts. *J Parasitol.* 1991; 77: 99-103.

Bogitsh BJ, Cheng TC. Human Parasitology. Second edition. Academic Press 1998; p: 343-349.

Boireau P, Vallée I, Roman T, Perret C, Mingyuan Liu, Gamble HR, Gajadhar A. trichinellosis in horses: a low frequency infection with high human risk *Vet. Parasitol.* 2000; 93: 309-320.

Bostan K, Akkaya H, Vurusaner C, Aksu H. A case of *Trichinella spiralis* in a fermented sausage. *Acta Parasitologica Turcica.* 1999; 23: 194-198.

Britov VA, Boev SN. Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. *Vestnik Akad Nauk.* 1972; 28: 27-32.

Bruschi F, Moretti A, Wassom D, Piergili Fioretti D. The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite.* 2001; 8: 141-143.

Bruschi F, Tassi C, Pozio E. Parasite-specific antibody response in *Trichinella* sp. 3 human infection: a one year follow-up. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43: 186-193.

Campbell RJ, Klaas II J. Blood and Tissue Helminths. Howard JB, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC, (eds.) *Clinical and Pathogenic Microbiology.* Second Press. Mosby Year Book. St. Louis. 1994; p:733-735.

Capo V. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9: 47-54.

Chan SW, Ko RC. Comparison between standard ELISA and dot-ELISA for serodiagnosis of human trichinosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82: 892-894.

Chapa-Ruiz MR, Salinas-Tobon MR, Aguilar-Alvarez DJ, Martinez-Maranon R. Recognition of *Trichinella spiralis* muscle larvae antigens by sera from human infected with this parasite and its potential use in diagnosis. Rev Latinoam Microbiol. 1992; 34: 95-99.

Chen S, Li L, Wu C, Ye J. Serological investigation on human trichinellosis spiralis in Hubei Province of PR China. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997; 28: 107-109.

Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. Atlas of Helminthology and Protozoology. 4. Edition. Churchill Livingstone, London 2001

Commission of The European Communities. Draft Commission Regulation of laying down specific rules for the official controls for *Trichinella* in meat. Brussels 2003

Contreras MC, Acevedo E, Aguilera S, Sandoval L, Salinas P. Standardization of ELISA IgM and IgA for immunodiagnosis of human trichinosis. Bol Chil Parasitol. 1999; 54: 104-109.

Costantino SN, Malmassari SL, Dalla Fontana ML, Diamante MA, Venturiello SM. Diagnosis of human trichinellosis: pitfalls in the use of a unique immunoserological technique. Parasite. 2001; 8: S144-146.

Cox FE. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 595-612.

Cruz Martinez A, Gomez Cerezo J, Ferrer MT, Medrano J, Perez Conde MC, Cobo J, Molina F. Single fibre and quantitative EMG study in acute stage of human trichinosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1989; 52: 681-683.

Cui J, Wang Z, Wu F, Jin X, Zhang P, Yang R, Liu J. Diagnosis of trichinosis by indirect fluorescent antibody test with *Trichinella* larva section. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 1999;17:28-31.

Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernandez F. *Trichinella* antigens: a review. Vet. Parasitol. 1999; 81: 57-68.

De-la-Rosa JL, Alcantara P, Correa D. 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. 1995 ; 2:122-124.

Dembinski AB, Johnson LR, Castro GA. Dembinski 1979 Influence of enteric parasitism on hormone-regulated pancreatic secretion in dogs. Am J Physiol. 1979; 237: 232-238.

Despommier DD. *Trichinella* and *Toxocara*. Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, (eds.) Parasitology. 9. press. Great Britain. 1998b; p: 597-602.

Despommier DD. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol Today*. 1998a; 14: 318–323.

Despommier DD. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J Parasitol. 1993; 79: 472-482.

Dick TA. Species and infraspecific variaton. Campbell WC, (ed.) In *Trichinella* and *Trichinosis*. Plenum Press, New York. 1983; p:31-37.

Dubenski TH, Bitkowska E, Onka W. Detection of a circulating parasitic antigen in acute infections with *Trichinella spiralis*: diagnostic significance of findings. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis. 1994; 281: 519-525.

Dupouy-Camet J, Kociecka W, Bruschi F, Bolas-Fernandez F, Pozio E. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. Expert Opin Pharmacother. 2002; 3:1117-1130.

Dupouy-Camet J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. Vet Parasitol. 2000; 93:191-200.

Dupouy-Camet J, Van Knapen F, Ancelle T, Vo Quang D, Lavarde V, Lapierre J. Study of specific immunoglobulins (total, IgG, IgM, IgA, IgE) in indirect immunofluorescence and ELISA in 40 patients with trichinosis followed over a 9-month period. Pathol Biol. 1988; 36: 803-807.

Dupouy-Camet, J. Is human trichinellosis an emerging zoonosis in the European community? Helminthologia. 1999; 36: 201-204.

el-Temsahi MM, Abu-Samra LM, el-Mansoury ST, Barakat RM, Awadalla HN. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and counter-current immunoelectrophoresis in diagnosis of experimental trichinosis. *J Egypt Soc Parasitol.* 1992; 22: 9-15.

European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary measure relating to Public Health on trichinellosis, epidemiology, methods of detection *Trichinella*- free pig production 21-22 November 2001.

Feldmeier H, Fischer H, Blaumeiser G. Kinetics of humoral response during the acute and the convalescent phase of human trichinosis. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* 1987; 264: 221-234.

Fourestie V, Douceron H, Brugieres P, Ancelle T, Lejonic JL, Gherardi RK. Neurotrichinosis. A cerebrovascular disease associated with myocardial injury and hypereosinophilia. *Brain.* 1993; 116: 603–616.

Froscher W, Gullotta F, Saathoff M, Tackmann W. Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. *Eur Neurol.* 1988; 28: 221-226.

Gabryel P, Gustowska L, Blotna-Filipiak M. The unique and spesific transformationof muscle cell infected with *Trichinella spiralis*. *Basic Appl Myol.* 5, 231-238.

Gamble HR, Anderson WR, Graham CE, Murrel KD. Serodiagnosis of swine trichinosis using an excretory-secretory antigen. *Vet Parasitol.* 1983; 13: 349-361.

Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K, Gajadhar AA, van Knapen F, Noeckler K, Schenone H, Zhu X. International Commission on trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 393-408.

Gamble HR, Graham CE. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of swine trichinosis. *Am J Vet Res.* 1984; 45: 67-74.

Gamble HR. Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J Food Prot.* 1996; 59: 295-298.

- Gamble HR.** Sensitivity of artificial digestion and enzyme immunoassay methods of inspection for trichinae in pigs. *J Food Prot.* 1998; 61: 339-343.
- Garkavi BL.** Species of *Trichinella* from wild carnivores. *Vet Moscow.* 1972; 49: 90-91.
- Gomez-Priego A, Crecencio-Rosales L, de-La-Rosa JL.** Serological evaluation of thin-layer immunoassay-enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in human trichinellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7: 810-812.
- Greenbloom SL, Martin-Smith P, Isaacs S, Marshall B, Kittle DC, Kain KC, Keystone JS.** Outbreak of trichinosis in Ontario secondary to the ingestion of wild boar meat. *Can J Public Health.* 1997; 88: 52-56.
- Guralp N.** The trichinosis problem in Turkey. *Pendik Vet Mikrobiol Derg.* 1995; 26: 221-229.
- Gustowska L, Gabryel P, Blotna-Filipiak M, Rauhut W.** The role of the muscle cell nucleus in the mechanism of its transformation after infection by *Trichinella spiralis* larvae. II. Histochemical features of the functional transformation of the muscle cell nucleus in the course of infection. *Wiad Parazytol.* 1989; 35:401-411.
- Gustowska L, Ruitenberg EJ, Elgersma A, Kociecka W.** Increase of mucosal mast cells in the jejunum of patients infected with *Trichinella spiralis*. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1983; 794: 304-308.
- Harms G, Binz P, Feldmeier H, Zwingenberger K, Schleehauf D, Dewes W, Kress-Hermesdorf I, Klindworth C, Bienzle U.** Trichinosis: a prospective controlled study of patients ten years after acute infection. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 637-643.
- Hassanain MA, Hassanain NA, El-Mogazy FM.** 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.* 2004; 34: 281-295.
- Januszkiewicz J.** The incubation period of trichinosis. *Przegl Epidemiol.* 1969; 3: 36-42.
- Jasmer DP.** *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J Cell Biol.* 1993; 121: 785-793.

Jongwutiwes S, Chantachum N, Kraivichian P, Siriyasatien P, Putaporntip C, Tamburrini A, La Rosa G, Sreesunpasirikul C, Yingyourd P, Pozio E. First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. Clin Infect Dis. 1998; 26:111-115.

Kapel CM, Pozio E, Sacchi L, Prestrud P. Freeze tolerance, morphology, and RAPD-PCR identification of *Trichinella nativa* in naturally infected arctic foxes. J Parasitol. 1999; 85: 144-147.

Kapel CM, Webster P, Lind P, Pozio E, Henriksen SA, Murrell KD, Nansen P. *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. Parasitol Res. 1998; 84: 264-271.

Kapel CM. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. Vet Parasitol. 2000; 93: 263-278.

Ko RC, Fan L, Lee DL, Compton NH, Experimental reorganization of host muscle cell's excretory/secretory products in infective *T. spiralis* larvae. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1992; 86: 77-78.

Kociecka W, Bruschi F, Marini C, Mrozewicz B, Pielok L . Clinical appraisal of patients and detection of serum antibodies by ELISA and CIA tests in late periods of *Trichinella* sp. invasion. Parasite. 2001; 8: S147-151.

Kociecka W, Gabryel P, Leszyk A, Gustowska L. A case of fatal trichinosis with early renal failure and involvement of the central nervous system. Wiad Parazytol. 1987; 33: 545-551.

Kociecka W, Gustowska L, Blotna-Filipiak M. Evaluation of jejunal mucosa biopsy in patients with gardiosis, taeniarhynchosis and trichinellosis. In: Proceedings of the Xth European Congress of Pathology, on Pathology Research and Practice. 1985; 18: 285-286.

Kociecka W, Kaczmarek J, Stachowski B, Gustowska L. Electromyographic studies in persons with trichinellosis history. Wiad Parazytol. 1975; 21: 721-730.

Kociecka W, Mrozewicz B, Gustowska L. Clinical aspects of late sequelae of trichinellosis. *Wiad Parazytol.* 1997; 43: 309-311.

Kociecka W, Skrzypinska K, Machowska L. The effect of thymus factor X (TFX Polfa) on the clinical course of human trichinellosis. *Wiad Parazytol.* 1989; 35: 423-433.

Kociecka W. Relationship between the clinical picture of trichinosis, the species or strain of *Trichinella* and the intensity of invasion. I. Clinical studies *Wiad Parazytol.* 1981; 27:399-442

Kociecka W. trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 365-383.

Kozek WJ, The molting pattern in *Trichinella spiralis*. I. A light microscope study. II. An electron microscope study. *J Parasitol.* 1971; 57: 1015–1029.

Kress-Hermesdorf I, Klindworth C, Bienzle U. Trichinosis: a prospective controlled study of patients ten years after acute infection. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 637-643.

Kumar V, Pozio E, de Borchgrave J, Mortelmans J, De Meurichy W. Characterization of a *Trichinella* isolate from polar bear. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1990; 70:131-135.

Kurup A, Yew WS, San LM, Ang B, Lim S, Tai GK. Outbreak of suspected trichinosis among travelers returning from a neighboring island. *J Travel Med.* 2000; 7:189-193.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.

Leighty JC. Control of trichinosis, public health aspects (with special reference to the United States). Campbell WC, ed. In *Trichinella and Trichinosis.*, Plenum Press, New York. 1983; p: 501-513.

Liu YJ, Liu Y, Qu YH, Zheng Y, Liu YH, Zhang YL, Chen J. Application of dot-immunogold filtration assay in detection of IgG in sera of trichinellosis patients. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2003; 21: 342-344.

- Mahannop P, Chaicumpa W, Setasuban P, Morakote N, Tapchaisri P.** Immunodiagnosis of human trichinellosis using excretory-secretory (ES) antigen. *J Helminthol.* 1992; 6:297-304.
- Mahannop P, Setasuban P, Morakote N, Tapchaisri P, Chaicumpa W.** Immunodiagnosis of human trichinellosis and identification of specific antigen for *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol.* 1995; 25: 87-94.
- Mahmoud MS, Moustafa MA.** Cystatin capture-dot-enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis and assessment of cure of experimental trichinellosis in mice. *J Egypt Soc Parasitol.* 2003; 33: 275-290.
- Medrano J, Gomez Cerezo J, Cobo J, Lopes Dupla JM, Zapico R, Molina F, Vazquez JJ.** Embolic episodes in a patient with trichinellosis,. Tanner CE, Fernandez ARM, Fernandez FB (ed.), *In trichinellosis.* Graficas Dias, Alicante, Spain. 1988; p: 334–336
- Mendez-Loredo B, Martinez Y, Zamora R, Chapa-Ruiz R, Salinas-Tobon R.** Class specific antibody responses to newborn larva antigens during *Trichinella spiralis* human infection. *Parasite.* 2001; 8:152-157.
- Merdivenci A, Aleksanyan V, Giriskan G, Perk M.** An outbreak of *Trichinella spiralis* infection in man and wild pig in Turkey. *İstanbul Univ Vet Fak Derg.* 1977; 3: 46-71.
- Mikhail EM, Mansour NS, Awadalla HN.** Identification of *Trichinella* isolates from naturally infected stray dogs in Egypt. *J Parasitol.* 1994; 80: 51-154.
- Moorhead A, Grunenwald PE, Dietz VJ, Schantz PM.** Trichinellosis in the United States, 1991-1996: declining but not gone. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 66-69.
- Morakote N, Khamboonruang C, Siriprasert V, Suphawitayanukul S, Marcanantachoti S, Thamasonthi W.** The value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human trichinosis. *Trop Med Parasitol.* 1991; 42:172-174.

Morakote N, Sukhavat K, Khamboonruang C, Siriprasert V, Suphawitayanukul S, Thamasonthi W. Persistence of IgG, IgM, and IgE antibodies in human trichinosis. *Trop Med Parasitol.* 1992; 43:167-169.

Murray RP, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical Microbiology. Parasitology* 3. press. St. Louise Missouri. Mosby-Year Book . 1998; p: 653-654.

Murrell KD, Lichtenfels RJ, Zarlenga DS, Pozio E The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Vet Parasitol.* 2000a; 93: 293-307.

Murrell KD, Pozio E. trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *Int J Parasitol.* 2000b; 30: 1339-1349.

Nishiyama T, Araki T, Mizuno N, Wada T, Ide T, Yamaguchi T. Detection of circulating antigens in human trichinellosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86: 292-293.

Nöckler K, Pozio E, Voigt WP, Heidrich J. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 335-350.

Nöckler K, Voigt WP, Protz D, Miko A, Ziedler K. Diagnosis of trichinellosis in living pigs using indirect ELISA. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 1995; 108:167-174.

Nunez GG, Malmassari SL, Costantino SN, Venturiello SM. Immunoelectrotransfer blot assay in acute and chronic human trichinellosis. *J Parasitol.* 2000; 86:1121-4.

Ortega-Pierres MG, Yepez-Mulia L, Homan W, Gamble HR, Lim PL, Takahashi Y, Wassom DI, Appleton JA. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.* 1996; 18: 273-284.

Owen IL, Pozio E, Tamburrini A, Danaya RT, Bruschi F, Gomez Morales MA. Focus of human trichinellosis in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 553-557.

Owen R. Description of a microscopic entozoon infesting the muscles of the human body. *London Med Gaz.* 1835; 16:125-127.

Patrascu I, Gamble HR, Sofronic-Milasovljevic L, Radulescu R, Andrei A, Ionescu V, Timocanu V, Boireau P, Cuperlovic K, Djordjevic M, Murrell KD, Nöckler K, Pozio E. The lateral flow card test: An alternative method for the detection of *Trichinella* infection in swine. *Parasite*. 2001; 8: 240-242.

Pawlowski ZS. Clinical aspects in man. Campbell WC, (ed.) In *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press, New York. 1983. p: 367-401.

Pinelli E, Mommers M, Homan W, Van Maanen T, Kortbeek LM. Imported human trichinellosis: sequential IgG4 antibody response to *Trichinella spiralis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 57-60.

Pinelli E, Van Der Lugt G, Homan W, Van Der Giessen J, Kortbeek LM. Antigen recognition by IgG4 antibodies in human trichinellosis. *Parasite*. 2001; 8:168-171.

Pozio E, La Rosa G, Murrell KD, Lichtenfels JR. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol*. 1992a; 78: 654–659

Pozio E, La Rosa G, Mignone W, Amati M, Ercolini C. Survival of muscle larvae of *Trichinella britovi* in frozen muscle tissues of wild boar. *Arch Vet Ital*. 1992b; 43: 57–60.

Pozio E, Varese P, Morales MA, Croppo GP, Pelliccia D, Bruschi F. Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 48:568-575.

Pozio E. Trichinellosis in the European Union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitol Today*. 1998; 14: 35-38.

Pozio E, Owen IL, La Rosa G, Sacchi L, Rossi P, Corona S. *Trichinella papuae* sp (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *Int J Parasitol*. 1999a; 29:1825-1839.

Pozio E, Paterlini F, Pedarra C, Sacchi L, Buggarini R, Goffredo E, Boni P. Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. *J Helminthol*. 1999b; 73: 233–237.

Pozio E, La Rosa G. *Trichinella murrelli* sp. etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. J Parasitol. 2000a; 86: 34–139

Pozio E. New patterns of *Trichinella* infection. Vet Parasitol. 2000b; 12; 98: 33-48.

Pozio E. Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. Vet Parasitol. 2000c; 1;93: 241-262.

Pozio E. Taxonomy of *Trichinella* and the epidemiology of infection in the Southeast Asia and Australian regions. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2000d; 32:129-132.

Pozio E, Sofronic-Milosavljevic L, Gomez Morales MA, Boireau P, Nockler K. Evaluation of ELISA and Western Blot Analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. Vet Parasitol. 2002; 108: 63-78.

Pozio E, La Rosa G. PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. Methods Mol Biol. 2003a; 216: 299-309.

Pozio E, Gomez Morales MA, Dupouy Camet J. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. Expert Rev Anti-infect Ther. 2003b; 1: 471-482.

Robert F, Weil B, Kassis N, Dupouy-Camet J. Investigation of immunofluorescence cross-reactions against *Trichinella spiralis* by western blot (immunoblot) analysis. Clin Diagn Lab Immunol. 1996; 3: 575-577.

Rodriguez-Osorio M, Gomez-Garcia V, Benito R, Gil J. *Trichinella britovi* human infection in Spain: antibody response to surface, excretory/secretory and somatic antigens. Parasite. 2003; 10:159-164.

Rodriguez-Perez J, Gomez-Garcia V, Rodriguez-Osorio M, Rojas-Gonzalez J, Gomez-Morales MA. Differentiation between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infective larvae by a monoclonal antibody. J Helminthol. 1989; 63: 275-279.

Smirnov GP. New method of determination of basal metabolism in animals. Probl Endokrinol Gormonoter. 1963; 9: 49-51.

Sofronic-Milosavljevic L, Pozio E, Patrascu IV, Skerovic N, Gomez Morales MA, Gamble HR. Immunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. *Parasite*. 2001; 8: 260-262.

Sohn WM, Kim HM, Chung DI, Yee ST. The first human case of *Trichinella spiralis* infection in Korea. *Korean J Parasitol*. 2000; 38:111-115.

Sokolova IB. The effect of temperature on the viability of different species of *Trichinella*. *Voprosy Prirodnoi Ochagovosti Boleznej* 1979; 10: 185–187.

Su XZ, Prestwood AK. A dot-ELISA mimicry western blot test for the detection of swine trichinellosis. *J Parasitol*. 1991; 77: 76-82.

Takahashi Y, Mingyuan L, Waikagul J. Epidemiology of trichinellosis in Asia and the Pacific Rim. *Vet Parasitol*. 2000; 93: 227-239.

Theodoropoulos, G, Kapel CMO, Webster P, Saravanos L, Zaki J, Koutsotolis K. Infectivity, predilection sites, and freeze tolerance of *Trichinella* spp. in experimentally infected sheep. *Parasitol Res*. 2000; 86: 401–405.

Tomasovicova O. The role of fresh water fish in transfer and maintenance of *Trichinellae* under natural conditions. *Biologia*. 1981; 36: 115–125.

Tomasovicova O, Corba J, Havasiova K, Rybos M, Stefancikova A. Experimental *Trichinella spiralis* infection in sheep. *Vet Parasitol*. 1991; 40:119–126.

Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci*. 1979; 76: 4350-4354.

Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Beşinci baskı, İstanbul, Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfi Yay. 1995; s: 350.

Virchow R. Recherches sur le développement de la trichina spiralis (ce ver devient adulte dans l'intestin du chien). *C R Seanc Acad Sci*. 1859; 49: 660-662.

Wee SH, Lee CG, Joo HD, Kang YB. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Trichinella spiralis* antibodies and the surveillance of selected pig breeding farms in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol*. 2001; 39: 261-264.

Williams HH, Jones A. Marine helminths and human health. Commonwealth Agricultural Bureaux. Miscellaneous Publication, Farnham Royal, Bucks, UK, 1976; 3: 1-47.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. A panel of antigens of muscle larvae of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* as revealed by two-dimensional western blot and immunoelectron microscopy. Parasitology. 1999; 118: 615-622.

Yaşarol Ş, Medikal Parazitoloji. Bölüm III Medikal Helmintoloji. Nematoda'lar. Ege Üniv Tıp FakYay. No: 93 İzmir. 1978; s: 250-253

Yepez-Mulia L, Arriaga C, Viveros N, Adame A, Benitez E, Ortega-Pierres MG. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. Vet Parasitol. 1999; 81: 57-68.

Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J. Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10: 793-796.

Zenker FA. Ueber die Trichinen-krankheit des Menschen. Arch Pathol Anat Physiol Klin Med. 1860; 18: 561-572

Zhan YA, Yan ZZ, Wan W, Lu ZY, Zhu ZQ. Localization and characterization of partial immunodominant antigen epitopes of *Trichinella spiralis*, Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2000; 18: 216-219.

ÖZGEÇMİŞ

28 Mayıs 1977 yılında Erzincan'ın Refahiye ilçesinde doğdum. İlkokulu Aydın-Söke-Bağarası Kemalpaşa İlkokulu'nda bitirdikten sonra, ortaokul ve lise eğitimimi Bağarası Lisesi'nde tamamladım. 1994 yılında girdiğim Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2000 yılında mezun oldum. 2000-Eylül dönemi Tıpta Uzmanlık Sınavında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında ihtisas yapmaya hak kazanarak, 13 Aralık 2000 tarihinde göreve başladım. Halen aynı Anabilim Dalında çalışmaktayım.