

## TRİŞİNELLOZİS TANISINDA ÜÇ FARKLI ELISA KİTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

### EVALUATION OF THREE DIFFERENT ELISA KITS FOR THE DIAGNOSIS OF TRICHINELLOSIS

Çiler AKİSU\*, Songül BAYRAM DELİBAŞ\*, Soykan ÖZKOÇ\*

**ÖZET:** *Trichinella* türlerinin neden olduğu insan trişinellozisi, parazit larvalarını içeren etlerin az pişmiş ya da çiğ olarak yenilmesi sonucu kazanılan, yaygın görülen bir parazit hastalığıdır. Bu çalışmada, Ocak 2004'de çiğ köfte tüketimini takiben İzmir'de ortaya çıkan trişinellozis salgını sırasında kullanılan ELISA testlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, trişinellozisli 100 hasta, diğer parazit enfeksiyonu ve otoimmün hastalığı olan 16 hasta (2 toksokariasis, 8 kist hidatik, 1 fasioliyazis, 5 romatoid artrit) ve sağlıklı 20 kişiden toplanan serum örnekleri alınmış ve laboratuvarımızda hazırlanan (in-house) ekskretuar-sekretuar ELISA kiti ile birlikte iki farklı ticari ELISA kiti (Kit 1; IBL, Hamburg, kit 2; Cypress, Belgium) kullanılarak *Trichinella* IgG antikorları araştırılmıştır. Laboratuvar yapımı ELISA IgG'nin duyarlılığı %100 olarak bulunurken, birinci ve ikinci kitlerin duyarlılıkları sırasıyla %75 ve %48 olarak saptanmıştır. Her üç testin özgüllükleri ise sırasıyla; %93.7, 87.5% ve 100% olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, laboratuvarımızda hazırlanan IgG ELISA kitinin trişinellozis tanısında değerli bir test olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar sözcükler:** *Trişinellozis, Trichinella britovi, IgG ELISA.*

**ABSTRACT:** Human trichinellosis caused by *Trichinella spp.* is a widely distributed parasitic disease, acquired by ingestion of undercooked or raw meat containing larvae of the parasite. In January 2004, a trichinellosis outbreak following the consumption of raw minced meat ball, occurred in İzmir, Turkey. In the present study, an in-house excretory/secretory (ES) IgG ELISA and two commercial IgG ELISA kits (Kit # I; IBL, Hamburg, kit # II; Cypress, Belgium) have been used to evaluate their diagnostic efficiencies in this outbreak. Serum samples were collected from 100 patients with trichinellosis, from 16 patients with other parasitosis and autoimmune diseases (2 toxocariasis, 8 hydatid cyst, 1 fascioliasis, 5 rheumatoid arthritis) and from 20 healthy subjects. While the sensitivity of in-house ELISA has been found as 100%, the sensitivities of commercial kits number I and II have been found as 75% and 48%, respectively. The specificities of these three tests have been detected as 93.7%, 87.5% and 100%, respectively. The results obtained in this study suggest that in-house ELISA is of significant diagnostic value for the diagnosis of trichinellosis.

**Key words:** *Trichinellosis, Trichinella britovi, IgG ELISA.*

\* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

## GİRİŞ

İnsan trişinelozisi, *Trichinella* türleri ile enfekte domuz, at gibi hayvan etlerinin çiğ veya az pişmiş olarak yenmesi sonucu oluşan ve ciddi klinik tablolara neden olabilen bir paraziter hastalıktır<sup>1</sup>. Hastalık Avrupa Birliği'ne üye birçok ülkede endemik olmasına rağmen, ülkemizde 28 yıl önce tanımlanmış yalnızca bir trişinelozis salgını bildirilmiştir<sup>2,3</sup>. Bununla birlikte geleneksel beslenme alışkanlıklarımız arasında çiğ et tüketiminin bulunması ve daha da önemlisi 2004 Ocak ayında İzmir'de yaşanan trişinelozis salgınının olması, hastalığın ülkemiz için önemini açıkça ortaya koymaktadır<sup>4</sup>.

İnsanlarda oluşan trişinelozis, gerek asemptomatik seyredebilmesi, gerekse semptomlarının diğer enfeksiyöz hastalıklarla karışabilmesi nedeniyle çoğu zaman tanımlanamamaktadır<sup>5</sup>. Buna karşın serolojik yöntemler hastalığın erken tanısında ve ilaç tedavisi sonrası hastalığın seyrinin izlenmesinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır<sup>6,7</sup>. Özellikle ELISA yöntemi hem kolay uygulanabilen hızlı ve ucuz bir test olması, hem de yüksek duyarlılığa sahip olması nedeniyle bir çok laboratuvar da rutin tarama testi olarak kullanılmaktadır<sup>5</sup>.

Bu çalışmada, parazitin ekskretuar/sekretuar (ES) ürünlerinin antijen olarak kullanıldığı laboratuvar yapımı bir ELISA IgG kiti ile iki ticari ELISA IgG kitinin karşılaştırılması ve trişinelozis tanısında ELISA IgG yönteminin değerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Hasta Serumları:** Çalışmaya, İzmir'de 2004 Ocak ayında meydana gelen trişinelozis salgını esnasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı'na başvuran ve trişinelozis kesin tanısı konmuş 54 erkek, 46 kadın olmak üzere 100 hasta dahil edildi. Serum örnekleri şüpheli et yeme tarihini takip eden 3-6 hafta içinde alındı. Ayrıca testlerde oluşabilecek çapraz reaksiyonların değerlendirilebilmesi amacıyla, trişinelozis dışı paraziter hastalığı olan 11 (2 toxocariasis, 8 kist hidatik, 1 fascioliasis) ve otoimmün hastalığı olan 5 (hepsi romatoid artrit) hastadan alınan toplam 16 serum ile sağlıklı kişilere ait 20 serum çalışmaya dahil edildi.

**Laboratuvar Yapımı ELISA IgG:** Bu yöntem, Nöckler ve arkadaşlarının<sup>8</sup> tarif ettiği şekilde uygulandı. Kullanılan saflaştırılmış *Trichinella* ES antijeni, Uluslararası *Trichinella* Referans Merkezi'nden sağlandı (*Trichinella* International Reference Centre, Instituto Superiore di Sanità, Roma). Sodyum karbonatlı tampon içinde 5 µg/ml olacak şekilde sulandırılan ES antijeninden her çukura 100 µl konulmak suretiyle ELISA plakları (Nunc<sup>R</sup> MaxiSorp) kaplandı. Plakların üzeri parafilm ile kapatılarak 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Antijen kaplı plakların her çukuruna, 200 µl "blocking" solüsyonu (PBS-Tween 20 + %0.1 siğir serum albümini) konularak 37°C'de 1 saat blokama işlemi yapıldı. Daha sonra plaklar üç kez PBS-T (PBS-%0.05 Tween 20) ile yıkandı. PBS-T ile 1/100 sulandırımı hazırlanan serum örneklerinden 100'er µl, antijen kaplı plaklara aktarıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklar tekrar 3 kez yıkandı ve PBS-T ile

optimal dilüsyonda sulandırılan konjugat (hidrojen peroksidaz ile işaretli keçi anti-insan IgG), plakların her çukuruna 100 µl olacak şekilde konuldu. Oda ısısında 30 dakika inkübasyonu takiben yıkama işlemleri tekrarlandı ve bu kez çukurlara 100 µl substrat solüsyonu (TMB; tetrametilbenzidin) eklendi. Reaksiyon 15 dakika sonra 100 µl durdurma solüsyonu (1 N HCl) eklenerek sonlandırıldı. Oluşan renk değişikliği, spektrofotometrede 450 nm'de okunarak değerlendirildi. Hasta serumu absorbansları (OD), aşağıdaki formüle göre hesaplanan eşik (cut off) değerinin üzerinde olduğunda pozitif, altında olduğunda negatif olarak değerlendirildi.

Eşik değer=(Negatif kontrollerin OD ortalaması-kör çukurların OD ortalaması) x 3

*Ticari ELISA IgG Kitleri:* Kullanılan ticari *Trichinella* ELISA IgG kitleri (I no'lu kit: IBL Immuno-biological Laboratories, Hamburg, Germany; II no'lu kit: Cypress Diagnostics, Langdrop, Belgium) üretici firmaların önerilerine göre çalışıldı.

*İstatistiksel Analiz:* İstatistiksel analizde testlerin karşılaştırılması için ROC eğrisi kullanıldı. Her testin ROC eğrisinde kapladığı alanlar hesaplandı. Her üç ELISA kitinin duyarlılık ve özgüllükleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (GP: Gerçek pozitif, YP: Yalancı pozitif, GN: Gerçek negatif, YN: Yalancı negatif):

Duyarlılık (%):  $[GP / (GP + YN)] \times 100$

Özgüllük (%):  $[GN / (GN + YP)] \times 100$

## BULGULAR

Laboratuvarımıza şüpheli et yeme öyküsü ile başvuran ve kesin olgu olarak saptanan 100 hastaya uygulanan her üç ELISA kiti ile alınan sonuçlar Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I: Trişinellosis'li Hastaların Farklı ELISA IgG Kitleriyle Alınan Sonuçları ve Testlerin Duyarlılıkları

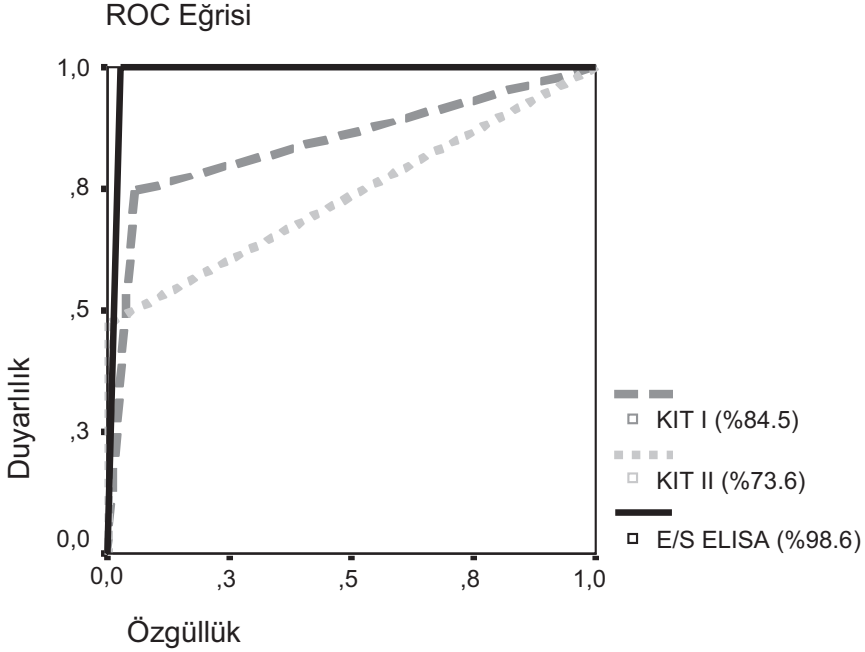
| Sonuçlar       | Laboratuvar Yapımı Kit | I no'lu Kit | II no'lu Kit |
|----------------|------------------------|-------------|--------------|
| Pozitif        | 100                    | 75          | 48           |
| Negatif        | —                      | 25          | 52           |
| Duyarlılık (%) | 100                    | 75          | 48           |

Trişinellosis dışı hastalığı olan 16 hastanın ve sağlıklı 20 kişinin farklı ELISA kitleriyle alınan sonuçları Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II: Trişinellosis Dışı Hastalığı Olanların ve Kontrollerin ELISA IgG Kitleriyle Alınan Sonuçları ve Testlerin Özgüllükleri

| Hasta Grupları        | Trichinella IgG pozitif serumlar |             |              |
|-----------------------|----------------------------------|-------------|--------------|
|                       | Laboratuvar Yapımı Kit           | I no'lu Kit | II no'lu Kit |
| Romatoid artrit (n:5) | —                                | —           | —            |
| Toksokariyazis (n:2)  | 1                                | —           | —            |
| Kist hidatik (n:8)    | —                                | 1           | —            |
| Fasioliyazis (n:1)    | —                                | 1           | —            |
| Sağlıklı (n:20)       | —                                | —           | —            |
| Özgüllük              | %93.7                            | %87.5       | %100         |

ELISA testlerinin kişilerin trişinelozisli olup olmadıklarını ayırmadaki doğruluk düzeylerini saptamak amacıyla oluşturulan ROC Eğrisi analizinde, en geniş alanı (%98.6) kaplayan ve tanıda en değerli bulunan kitin laboratuvar yapımı ELISA kiti olduğu görülmüştür (Şekil 1).



**Şekil 1:** Trişinelozis tanısında kullanılan ELISA IgG kitlerinin ROC eğrisine göre kapladıkları alanlar.

## T A R T I Ş M A

Ülkemiz trişinelozis yönünden riskli bölgeler arasında gösterilmesine rağmen, 1977 yılından bu güne kadar Türkiye’de yerli kaynaklı insan trişinelozis olgusu bildirilmemiştir<sup>3</sup>. Ancak 2004 Ocak ayında İzmir’de meydana gelen trişinelozis salgını ve bu salgına neden olan türün *Trichinella britovi* olarak belirlenmesi, Türkiye’nin özellikle silvatic (yabani hayvan kökenli) trişinelozis açısından riskli bölgede yer aldığını ortaya koymaktadır<sup>4</sup>.

Yapılan çalışmalarda parazitin ekskretuar/sekretuar (ES) ürünlerinin özellikle ELISA testi için en uygun antijenik yapı olduğu gösterilmiştir<sup>9-11</sup>. ES antijeni, tüm türler için ortak bir yapı olması ve özellikle ELISA sistemlerinde daha özgül reaksiyonlar vermesi nedeniyle trişinelozis tanısında güvenle kullanılmaktadır<sup>12,13</sup>. Bu nedenle laboratuvarımızda hazırlanan ELISA testinde *T. spiralis*’ten elde edilen ES antijeni kullanılmış ve sonuçlar yine ES antijeninin kullanıldığı iki ticari kit ile karşılaştırılmıştır.

Trişinelozis tanısında farklı antikor izotiplerinin değerlerinin araştırıldığı bir çok çalışmada, IgG'nin hastalık sırasında oluşan oldukça özgül bir yanıt tipi olduğu ve kanda saptanabilme dönemleri göz önüne alındığında hastalığın tanısını koyma açısından en uygun antikor tipi olduğu gösterilmiştir<sup>13,14</sup>. Bu nedenle çalışmamızda *Trichinella* IgG antikorlarının araştırılması planlanmıştır.

Günümüzde trişinelozisin serolojik tanısında birçok test kullanılmakla birlikte, pratik, hızlı ve ekonomik olması nedeniyle ELISA testi daha fazla tercih edilmektedir<sup>5</sup>. Özellikle ES antijenlerinin kullanıldığı laboratuvar yapımı ELISA testleri, enfeksiyonun erken dönemindeki özgül antikorları saptaması nedeniyle erken tanıda oldukça önemli yer tutmakta bu sebeple salgınlarda sıkça kullanılmaktadır<sup>15</sup>. Bizim çalışmamızda da, trişinelozis kesin tanısı konulan 100 hastadan ilk 3-6 hafta içinde alınan serumlarda, laboratuvar yapımı ELISA IgG testinde %100 duyarlılık elde edilmiş ve *Trichinella* IgG antikorlarının hastalığın erken tanısında değerli olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız, laboratuvar yapımı ELISA IgG kitinin diğer iki ticari kit ile karşılaştırıldığında pozitif hastaları en erken saptayan test olduğunu ortaya koymuştur.

Ticari olarak satılan ELISA kiti daha kolay kullanılabilir olması nedeniyle bir çok laboratuvar da tercih edilmektedir. Ancak erken dönemde enfeksiyonu tanımadaki yetersizlikler ve diğer paraziter enfeksiyonlarla çapraz reaksiyonlar sonucu gözlenen yalancı pozitiflikler bu kitlerin eksiklikleri olarak gösterilmektedir<sup>16</sup>. Ticari kitlerin insan trişinelozisi tanısındaki yerini değerlendirmek amacı ile yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır. Yera ve arkadaşları<sup>17</sup> ticari kit sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, erken dönem trişinelozis hastalarında yalancı negatifliklerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, sağlıklı kişilerde yalancı pozitifliğe rastlamadıklarını, ancak otoimmün ve diğer paraziter hastalığı olanlarda yalancı pozitiflik tespit ettiklerini ifade etmektedirler<sup>17</sup>. Bizim çalışmamızda da test edilen iki ticari kit, trişinelozis kesin tanısı alan hastaların erken dönem serumlarında, laboratuvar yapımı ELISA testine göre daha düşük (sırasıyla %75 ve %48) duyarlılık sonuçları vermiştir.

Trişinelozis tedavisi, özellikle erken dönemde yani parazitin henüz barsaklarda bulunduğu ve kaslara tam olarak yerleşmediği dönemde etkilidir<sup>5</sup>. Bu nedenle hastalığın tanısının acilen konulması büyük yarar sağlamaktadır. Tanı testi olarak tek bir ticari kitin kullanılması, yalancı negatif sonuç olasılığını artıracak ve dolayısıyla bazı trişinelozis hastalarında tedavinin uygulanmamasına ya da geç uygulanmasına neden olacaktır. Bu açıdan, özellikle erken dönem trişinelozis şüpheli hastalarda mümkünse laboratuvar yapımı ELISA IgG testlerinin yapılması ya da duyarlılığı artırmak için en az iki ticari kitin kullanılması uygun olacaktır kanısındayız.

Trişinelozis serolojik tanısında karşılaşılan önemli problemlerden biri de, özellikle otoimmün ve diğer paraziter hastalıkların neden olduğu yalancı pozitifliklerdir<sup>18</sup>. Trişinelozisde klinik bulguların bu hastalık için çok özgül olmaması nedeniyle, özellikle sporadik olgularda klinik olarak ayırt edici tanı son derece zor olabilir. Bu nedenlerle testlerin, özellikle sporadik olgularda kullanılması esnasında yalancı pozitifliklerin oluşabileceği göz önünde bulundurulması ve dikkatli değerlendirilmesi gereklidir. Çalışmamızda, her üç ELISA kiti ile de sağlıklı kişilerde

ve romatoid artritli hastalarda herhangi bir yalancı pozitifliğe rastlanmamış, buna karşın biri dışında (II no'lu kit) diğer kitler trişinellosis dışı parazit enfeksiyonu olan hastalarda yalancı pozitif sonuç vermişlerdir. Ancak bu konuda kesin bir yorum yapılabilmesi ve özgüllüğün tam olarak değerlendirilmesi için daha fazla sayıda trişinellosis dışı hasta ve sağlıklı kontrol grubunun çalışılması gereklidir.

Ülkemizde İzmir'de görülen salgına kadar trişinellosis tanısına yönelik herhangi bir serolojik yöntem uygulanmamaktaydı. Ancak bu salgınla birlikte, hastalığın ülkemizi tehdit ettiği ve dolayısıyla ileriki yıllarda sporadik olguların ve salgınların ortaya çıkma olasılıklarının yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle ülkemizde de bu hastalığın tanısına yönelik testlerin yapılması ve değerlendirilmesi zorunludur. Bu gereklilikten yola çıkarak yaptığımız bu çalışmada, laboratuvarımızda hazırladığımız ELISA IgG testinin trişinellosisin erken tanısında ticari kitlere oranla daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Murrell KD, Pozio E: Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. Int J Parasitol 2000, 30: 1339-1349.
2. Pozio E, La Rosa G: *Trichinella murrelli* sp. etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. J Parasitol 2000, 86: 134-139.
3. Merdivenci A, Aleksanyan V, Giriskan G, Perk M: An outbreak of *Trichinella spiralis* infection in man and wild pig in Turkey. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1977, 3: 46-71.
4. İzmir Trichinella Study Group: The worlds largest *Trichinella britovi* outbreak in İzmir, Turkey. IX European Multicolloquium of Parasitology, 18-23 July 2004, Valencia, Spain. Abstract Book, p. 371.
5. Pozio E, Gomez Morales MA, Dupouy Camet J: Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2003, 1: 471-482.
6. Kociecka W: Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. Vet Parasitol 2000, 93: 365-383.
7. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health: Trichinellosis, epidemiology, methods of detection *Trichinella*-free pig production. European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General. 21-22 November 2001. [www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out47\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out47_en.pdf)
8. Nockler K, Pozio E, Voigt WP, Heidrich J: Detection of *Trichinella* infection in food animals. Vet Parasitol 2000, 93: 335-350.
9. Gamble HR, Anderson WR, Graham CE, Murrell KD: Serodiagnosis of swine trichinosis using an excretory-secretory antigen. Vet Parasitol 1983, 13: 349-361.
10. Gamble HR: Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. J Food Prot 1996, 59: 295-298.
11. Kapel CM, Webster P, Lind P, et al: *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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. Alcantara P, Correa D: Human humoral immune responses against *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol* 1993, 23: 657-660.
16. 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.
17. 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.
18. 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.