

KÖPEKLERDE ERİŞKİN *TAENIA HYDATIGENA* ANTİJENİNE KARŞI ANTİJENİK SPESİFİTENİN SDS-PAGE ve WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI*

Murat KARA**

Ahmet DOĞANAY***

Geliş Tarihi:

Özet: Köpek, kurt ve diğer yabani karnivorların ince bağırsaklarında parazitlenen ve oldukça kozmopolit bir yayılışa sahip olan *Taenia hydatigena*'nın karnivorlarda teşhisi oldukça zor olup, yumurtaları Taeniidae ailesine bağlı diğer türlerin yumurtalarıyla karışmaktadır. Bu çalışmada deneysel yolla enfekte edilen ile kontrol grubu köpek yavrularından elde edilen serumlar ve olgun *T.hydatigena* halkalarından hazırlanan antijen kullanılmıştır. Antijendeki proteinlerin molekül büyüklüklerinin belirlenmesi için antijenin SDS-PAGE yöntemiyle elektroforezi yapılmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile separe edilen proteinler Western blot metoduyla nitroselüloz membranlara transfer edilip, köpek serumları (deneysel enfekte ve kontrol grubu) ve ayrıca hazır ticari non-enfekte köpek serumu test edilmiş ve membranlarda açığa çıkan protein bantlarından hangilerinin deneme grubu hayvanlar için spesifik olduğunu belirlemek için elde edilen bulgular diğer bantlarla karşılaştırılmıştır. Bu bulgulara göre Western blot yönteminde köpeklerde *T.hydatigena*'nın tanısında kullanılabilecek spesifik bantların molekül ağırlıklarının 24 ve 84 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Taenia hydatigena*, köpek, SDS-PAGE, Western blot.

Investigation of Antigenic Specificity Against Somatic *Taenia hydatigena* Antigen in Dogs by SDS-PAGE and Western Blotting

Summary: *Taenia hydatigena* occurs in the small intestine of dogs, wolves and other wild carnivores and it is cosmopolitan in distribution. The diagnosis of this cestode is almost impossible via fecal examination in carnivores. Because the egg of this parasite is very similar to other species of Taeniidae family, which causes confusion in diagnosis. In this study the sera were obtained from the experimentally infected dogs and Control group dogs. Antigen was prepared from the *T.hydatigena* proglottids. The antigen was studied with SDS-PAGE to determine protein bands. These proteins were transferred to nitrocellulose membranes by the method of Western blotting. The dog sera and also commercial non-infected dog serum were tested on these nitrocellulose membranes. After that the results from the sera of experimental group were compared to the results of sera from Control group and non-infected dog serum to determine specific bands for this parasite. According to the results, the bands of 24 and 84 kDa are determined to be specific proteins in the diagnosis of *T.hydatigena* in dogs.

Key Words: *Taenia hydatigena*, dog, SDS-PAGE, Western blotting.

GİRİŞ

Taenia hydatigena başta köpek olmak üzere, kurt, tilki, çakal gibi yabani karnivorların ince bağırsaklarında bulunur. Gelişmelerinde başta koyun ve keçi olmak üzere çeşitli evcil ve yabani ruminantlar, domuz, sincap ve yeşil maymunlar hatta nadir de olsa atlar arakonaklık yaparlar^{1,2}. Kasapların ve halkın su kesesi olarak adlandırdığı *T.hydatigena*'nın larvası olan *Cysticercus tenuicollis*, bilinen sistiserkler içinde en büyüklerinden olup, 5 ile 8 cm'lik bir çapa ulaşabilmektedir. Olgun parazitler köpekler için fazla bir tehlike arz etmese de, arakonaklar fazla sayıda sistiserk ile enfekte olduklarında, bu larvalar karaciğer dokusundaki göçleri esnasında tahribat meydana getirmekte ve sonuçta akut fasciolosise benzeyen hepatitis cysticercosa tablosu ortaya çıkmaktadır.

Kozmopolitan bir yayılışa sahip olan bu parazit dünyada koyun, keçi ve domuz yetiştiriciliği yapılan

tüm bölgelerdeki köpeklerde görülmektedir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada Mimioğlu ve ark.³, bu cestodun Ankara sokak köpeklerindeki yayılışının % 4 olduğunu bildirmişlerdir. Pamukçu ve Ertürk⁴, nekropsisini yaptıkları köpeklerin % 15.2'sinde bu parazite rastlamışlardır. Doğanay⁵, nekropsilerini yaptığı Ankara sokak köpeklerinde bu parazite % 32 oranında rastladığını bildirmiştir.

Parazitlerin teşhisinde mikroskopik yöntemler hala en geçerli yöntemler olmayı sürdürmekle beraber bu yöntemlerin bir çok dezavantajı da vardır. Örneğin bazı parazitler morfolojik olarak benzer yapıda yada küçük yapılı olup, boyanmaları veya tetkikleri zordur. Ayrıca *Taenia* yumurtalarının mikroskopta tür düzeyinde teşhisleri de mümkün değildir^{6,7}. Yukarıda sayılan zorlukların üstesinden gelebilmek için son yıllarda serolojik tanı yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu amaçla son yıllarda serolojik yöntemlerden SDS-PAGE ve Western blot metotları sıklıkla kullanılanlardan

* Bu makale doktora tez çalışmasının bir bölümünden özetlenmiştir.

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

*** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Helmintholoji Bilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

olmuştur^{6,8}. Köpeklerdeki *Taenia hydatigena* enfeksiyonlarında spesifik olan protein bantlarının Western blot yöntemiyle ortaya çıkarılması; bu parazit ve diğer köpek cestodlarının eradikasyonuna yönelik çalışmalara, ileride gerçekleştirilebilecek aşı çalışmalarına, bu hastalığın erken dönemde serolojik teşhisi için kit hazırlanmasına, diğer serolojik ve biyo-moleküler çalışmalara bir basamak teşkil etmesi bakımından önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında, SDS-PAGE metoduyla erişkin *Taenia hydatigena* halkalarından hazırlanan antijenlerindeki proteinlerin ayrıştırılmasından sonra *Taenia hydatigena* ile deneysel enfekte pozitif, kontrol grubu ve piyasadan sağlanmış olan non-enfekte köpek serumları kullanılarak Western blot yöntemiyle bu bantlardan hangilerinin spesifik olduğu araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Serumlar: Deneme ve Kontrol grubu hayvanların Vena saphena externa'larından alınan 10 ar ml kan örnekleri 6.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüje edilip serumları ayrıştırıldıktan sonra numuneler -20 °C 'de derin dondurucuda kullanılmaya kadar saklanmıştır.

Antijen Hazırlanması: Halkalardan antijen hazırlanması işleminde ise; gebe halkalar çok iyi temizlenmiş bir havan içerisine konuldu ve üzerlerine yaklaşık -300 °C gibi çok düşük bir ısıya sahip sıvı azot ilave edildi. Sıvı azotun uçmasıyla beraber aşırı derecede donmuş durumdaki parazitler havan tokmağı ile dövülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen her bir gram olgun halka için 2 ml PBS ile birlikte proteaz inhibitörleri olarak %1 oranında deoxycholic acid (SIGMA Chemical Company, USA) ve ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA, SIGMA Chemical Company, USA) 5 mM oranlarında ilave edilerek iyice karıştırıldı ve solüsyon haline getirildi. Bu solüsyon 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant diyaliz torbasına konularak distile suya karşı +4 °C de 24 saat diyaliz edildi. Diyalizle tuz konsantrasyonu düşürülen olgun (somatik) antijenleri 0.45 µl'lik membran filtreden geçirildi. Filtreden geçirilen solüsyon, müteakiben eppendorf tüplere konularak derin dondurucuda kullanılmaya kadar -70 °C de saklandı.

SDS-PAGE ve Western blot: Deneyin sonraki aşamalarında kullanılacak en uygun antijen miktarını

belirleyebilmek için 5, 10, 20, ve 30 µl hacimlerinde antijenler prosedüre uygun olarak hazırlanan jelle yüklenmiştir. Elektroforez işleminden sonra ortaya çıkacak olan proteinlerin molekül ağırlıklarını belirleyebilmek için jelle antijenin yanı sıra iki farklı protein standardı yüklenmiştir (High and Wide Molecular Weight Range, SIGMA Chemical Company, USA). Antijeni %15'lik jel içinde molekül ağırlıklarına göre ayrıştırmak için sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) işlemi yapılmıştır.

Elektroforez işleminden sonra bir kereye mahsus olmak üzere jel, ortaya çıkan proteinleri görebilmek ve molekül ağırlıklarını ölçebilmek için hazır kit ile gümüş boyama işlemine tabii tutulmuştur (Owl Silver Staining Kit, Owl Separation Systems, Inc., USA).

Elektroforez işlemi müteakip western blot metoduna geçilmiştir. Bunun için jeldeki ayrıştırılmış proteinler nitroselüloz membranlara transfer blot cihazıyla nakledilmiştir. Bu transfer işleminde yarı-ıslak blot (semi-dry blot) cihazı kullanılmıştır. Bu membranlar, enfekte ve kontrol grubu köpeklerin serumları ve ayrıca piyasadan alınmış hazır non-enfekte köpek serumuyla (SIGMA Chemical Co., USA) muamele edilmiştir. Konjugat olarak anti-dog IgG peroxidase conjugate (antibody developed in rabbit IgG fraction of serum, SIGMA Chemical Co., USA) kullanılmıştır. Nitroselüloz membranlardaki peroksidaz aktivitesini gözlemleyebilmek için, DAB (3,3,-Diaminobenzidine) peroksidaz (SIGMA Chemical Co., USA) tabletlerden hazırlanan solüsyon substrat olarak kullanılmıştır. Bu işlemi müteakip vakit geçirmeden membranların fotoğrafları çekilerek saklanmıştır.

SDS-PAGE ve Western blot işlemlerinin tatbiki ve kullanılan solüsyonların hazırlanması Sambrook ve ark.⁹a göre yapılmıştır.

BULGULAR

SDS-PAGE: *Taenia hydatigena*'nın olgunlarından hazırlanan antijen 5, 10, 20 ve 30 µl miktarlarında jelle yüklenmiş, bunlar arasından 30 µl'lik miktar ile tespit edilen bantlar en belirgin olarak kabul edilmiş ve çalışmanın sonraki aşamaları bu miktar kullanılarak sürdürülmüştür. Bu antijen SDS-PAGE ile analiz edilip, gümüş boyama yöntemiyle boyandığında <6.5 kDa ile 205 kDa arasında 22 bant tespit edilmiştir. Boyanmış olan jelle en belirgin bantlar 116, 84, 66, 55, 45, 42.5,

36, >29, 29, <29, >14.2 ve 6.5 kDa olarak belirlenmiştir. Yüz on altı, 84, 66 ve 45 kDa'lık bantların jel üzerindeki görünümünde birbirine benzerlik görülürken; en belirgin olarak 6.5, 45 ve 55 kDa'lık bantlar tespit edildi. Diğer protein bantları ise jel üzerinde daha zayıf şekilde görülmüştür (Resim 1).

Western Blot: *Taenia hydatigena* olgun antijenindeki protein bantları nitroselüloz membrana aktarılıp, deneysel enfekte köpeklerin serumlarıyla Western blot yöntemiyle test edildiğinde membranda 16 bant tespit edilmiştir. Bu bantlardan molekül ağırlığı en düşük olanın 6.5 kDa'un altında olduğu, en yüksek molekül ağırlığındaki bandın ise 116 kDa olduğu görülmüştür (Resim 2). Kontrol grubu köpeklerin serumlarının Western blot yöntemiyle serolojik kontrolünde membranda birisi 6.5 kDa'un altında, diğerleri ise 6.5 ile 116 kDa arasında molekül ağırlığına sahip 14 protein bandı belirlendi (Resim 3). Non-enfekte köpek serumu ile çalışıldığında ise yine birisi 6.5 kDa'un altında, diğerleri ise 6.5 ile 116 kDa arasında 11 bant tespit edildi (Şekil 4). Elde edilen bulgular karşılaştırıldığında *Thydatigena* olgun antijenin kullanıldığı Western blot yönteminde; köpeklerdeki *Thydatigena*'nın tanısında immün reaktif protein bantlarının molekül ağırlıkları 24 ve 84 kDa olarak belirlendi. Bununla birlikte nitroselüloz membranda 24 kDa'lık immün reaktif bandın 84 kDa'lık banttan daha belirgin olduğu dikkat çekicidir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, *C.tenuicollis* ile deneysel olarak enfekte edilen köpeklerden elde edilen erişkin *Thydatigena*'lardan hazırlanan antijenler kullanılmıştır. Daha sonra Western blot metoduyla köpeklerde *Thydatigena* enfeksiyonu için immün reaktif protein bantları ortaya çıkarılmıştır.

Şimdiye kadar ruminantları ve domuzları enfekte eden cestod larvaları üzerinde bir çok çalışma gerçekleştirilmişken olgun formları köpeklerde yerleşen cestodlar üzerinde *E.granulosus* ve *T.ovis* haricinde Western blot çalışmasına rastlanmaması nedeniyle, bu çalışmadaki sonuçlar yakın kaynaklar tartışılarak değerlendirilmiştir. *Taenia hydatigena* ile yapılmış olan serolojik çalışmalar Heath ve ark.¹⁰, Jenkins ve ark.¹¹, Deplazes ve ark.⁷'nin yapmış olduğu ELISA çalışmalarından ibarettir. Ancak *C.tenuicollis* için koyunlar¹²⁻¹⁴ ve domuzlar¹⁵ üzerinde yapılmış olan Western blot çalışmaları vardır. Bu çalışmaların bazıları *C.tenuicollis*'in, *C. cellulosa*, *C.bovis* ve *C.ovis* gibi cestod lar-

valarına genetik yakınlığından dolayı bunların tanısında kullanılıp kullanılmayacağına araştırılması yönündedir.

Jenkins ve Rickard^{11,16-18} ve Heath ve ark.⁶'nın çalışmalarından önce köpeklerde *Taenia* türlerine karşı oluşan antikor yanıtları üzerine yayımlanmış herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Bu araştırmacılar¹⁶, ilk çalışmalarında tamamıyla parazitsiz ortamda yetişmiş köpekler ile monospesifik olarak cestodlar ile enfekte köpeklerdeki hematalojik ve serolojik verileri karşılaştırmışlardır. Bu enfeksiyonların hiç birinde antikor titrelerinde ve hematolojik değerlerde kayda değer bir değişimin olmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar parazitsiz yetiştirdikleri köpekleri *Thydatigena*, *T.pisiformis* ve *E.granulosus*'la monospesifik olarak enfekte etmişler, sonra tedavi edip tekrar aynı parazitlerle enfekte ettikten sonra, onkosfer antijenleri ile skoleks antijenlerini ELISA yöntemi ile kıyaslamışlardır. Çalışma sonucunda onkosfer antijenlerin spesifitesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir¹⁸.

Heath ve ark.⁶ *Taenia* türleriyle enfekte köpeklerde spesifik antikorların oluştuğunu *T.ovis*'i kullanarak yapmış olduğu çalışmada teyit etmiştir. *Taenia ovis*'le birlikte *T. hydatigena*, *T. pisiformis* ve *E. granulosus*'dan hazırlanan E/S antijenlerini ELISA yöntemi kullanarak karşılaştırmış, sonuçta *T. ovis* ile *T. hydatigena* arasında çapraz reaksiyon görülürken, *T. ovis* ile diğer iki parazit arasında çapraz reaksiyon görülmediğini bildirmişlerdir. Heath ve ark.⁶'nin çalışmasında kullanılan antijen E/S antijeni olmasına rağmen, yine de *T. ovis* ile *T. hydatigena* arasında çapraz reaksiyon görülmüştür. Bizim çalışmamız sonucunda elde edilen 24 ve 84 kDa'luk proteinlerin pürifikasyonu ile çapraz reaksiyon probleminin ortadan kalkacağı düşünülmektedir.

Ralston ve Heath¹⁹ *T.ovis* skolekslerinin salgılarından hazırladığı antijenle cestod-spesifik ELISA ve Western blot testleri geliştirmeyi amaçladıkları çalışmalarında, köpeklerde *T. ovis* enfeksiyonlarının serodiagnozunda spesifik antijenin molekül ağırlığının 94 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, bu antijenleri ELISA yöntemi ile monospesifik olarak *T. hydatigena* ve *T. pisiformis* ile enfekte köpek serumları ile test ettiklerinde, serumların sadece % 30'unun pozitif reaksiyon verdiğini gözlemlemişlerdir. Köpek serumlarının, olgun *T. hydatigena* ham antijenleri kullanılarak Western blot yöntemiyle test edildiği ve bu parazit üzerinde ilk defa gerçekleştirilen bu tez çalışmasında 24 ve 84 kDa molekül ağırlığında iki banda rastlanmıştır. Bu

parazit ile yakın genetik özelliğe sahip olan *T. ovis*'le yapılmış olan çalışmada¹⁹ bulunan 94 kDa'luk bantın bu çalışmada bulunmadığı gibi 24 ve 84 kDa molekül ağırlığındaki bantlarda *T. ovis*'ten bildirilmemiştir.

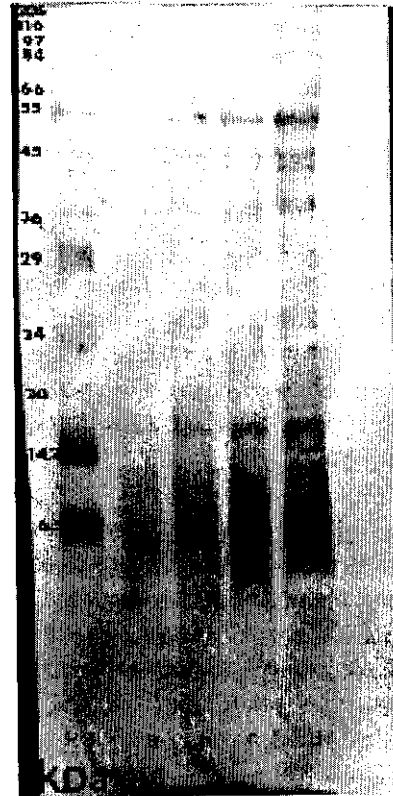
Bu çalışmada, özellikle olgun *T. hydatigena*'dan hazırlanan ham antijen ekstraktlarının hem SDS-PAGE ile elektroforezinde hem de Western blot'unda çok sayıda protein bantları ortaya çıkmıştır. Çalışma sonuçlarına göre Western blot ta ortaya çıkan spesifik olmayan protein bantlarının sayısını en aza indirmek için gelecekte bu parazit ile yapılacak çalışmalarda E/S antijenleri gibi spesifik antijenlerle çalışılması gerekmektedir. Ancak, E/S antijenleri bile olsa yukarıda sözü edilen bazı çalışmalar göstermektedir ki cestodlar arasındaki yakın genetik benzerlikten dolayı E/S antijenlerinin bile purifikasyona ihtiyaç gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen 24 ve 84 kDa molekül ağırlıklarındaki iki immün reaktif bantın yakın gelecekte Gel Eluter, Prep-Cell ve Rotofor-Cell gibi modern cihazlarla saflaştırılması halinde *T. hydatigena*'nın teşhisinde kullanılabilceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1 **Güralp N:** Helmintoloji. İkinci baskı. Ankara Üniv Vet Fak Yayinevi, No: 368, 1981.
- 2 **Soulsby E.J.L:** Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall, London. 113-114, 1982.
- 3 **Mimioğlu MM, Güralp N, Tolgay N, Sayın F:** Ankara köpeklerinde görülen parazit türleri ve bunların yayılış nisbeti. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 6: 53-68, 1960.
- 4 **Pamukçu AM, Ertürk E:** 1933 ve 1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 8: 323-346, 1961.
- 5 **Doğanay A:** Ankara sokak köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 30: 550-561, 1983.
- 6 **Heath DD, Lawrence SB, Glennie A, Twaalhoven H:** The use of excretory and secretory antigens of the scolex of *Taenia ovis* for the serodiagnosis of infections in dogs. *J Parasitol*, 71: 192-199, 1985.
- 7 **Deplazes P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J:** Detection of *Taenia hydatigena* copro-antigens by ELISA in dogs. *Vet Parasitol*, 36: 91-103, 1990.
- 8 **Burgu A, Doğanay A, Gönenç B, Sarimehmetoğlu HO, Kalınbacak F:** Analysis of hydatid cysts from sheep by SDS-PAGE and determination of spesific antigens in protein structure by Western blotting. *T J Vet Anim Sci*, 24: 493-501, 2000.
- 9 **Sambrook J, Fritsch EF, Manniatı T:** Molecular cloning: A laboratory manual. 15.section, Cold Spring, Harbor, Newyork, p.18.47-18.76, 1989.
- 10 **Heath DD, Parmeter SN, Osborne PJ:** An attempt to immunize dogs against *Taenia hydatigena*. *Res Vet Sci*, 29: 388-389, 1980.
- 11 **Jenkins DJ, Rickard MD:** Specific antibody responses in dogs experimentally infected with *E.granulosus*. *Am J Trop Med Hyg*, 35: 345-349, 1986.
- 12 **Yong WK, Heath DD:** Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, and *T.ovis* infections in sheep. *Res Vet Sci*, 36: 24-31, 1984.
- 13 **Jacobs HJ, Moriarty KM, Charleston WAG:** Resistance against *Taenia hydatigena* in sheep after passive transfer of serum or colostrum. *Parasit Immunol*, 16: 351-359, 1994.
- 14 **Berezhko VK, Romanenko LN:** Antigenic affinity of cestodes in the genus taenia. *Parazitologıia*, 23:153-158, 1989.
- 15 **Ko RC, Ng TF:** Evaluation of e/s products of larval *Taenia solium* as diagnostic antigens for porcine and human cysticercosis. *J Helminthol*, 72:147-154, 1998.
- 16 **Jenkins DJ, Rickard MD:** Haematological and serological data from dogs raised worm-free and monospesificly infected with helminths. *Aust Vet J*, 61: 309-311, 1984.
- 17 **Jenkins DJ, Rickard MD:** Specific antibody responses to *Taenia hydatigena*, *T.pisiformis*, and *Echinococcus granulosus* infection in dogs. *Aust Vet J*, 62: 72-78, 1985.
- 18 **Jenkins DJ, Rickard MD:** Specificity of scolex and oncosphere antigens for the serological diagnosis of taeniid cestode infections in dogs. *Aust Vet J*, 29: 1271-1272, 1986b.
- 19 **Ralston MJ, Heath DD:** A defined antigen for the serodiagnosis of *Taenia ovis* infections in dogs. *J Parasitol*, 81: 422-428, 1995.

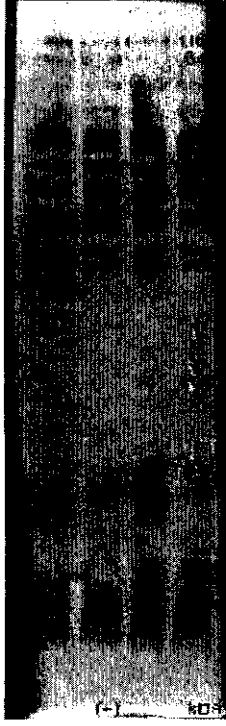
Yazısma adresi (correspondence address)

Yrd.Doç.Dr. Murat KARA
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE
TIF: +90 242 68 00



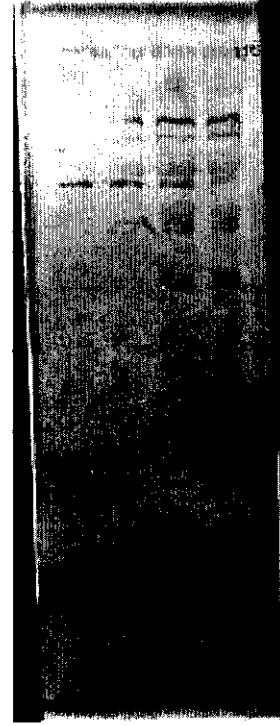
Resim 1: *Taenia hydatigena* olgun antijeninin SDS-PAGE ile analizi. P.S.: Protein standardı, a:5, b:10, c:20, d:30 µl'lik antijen miktarı

Figure 1: Analysis of *T. hydatigena* proglottid antigen by SDS-PAGE. P.S.: Protein standards, a:5, b:10, c:20, d:30 µl volume of antigens.



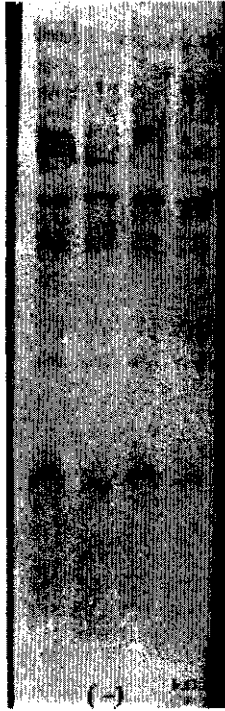
Resim 2: Western blot'da deneme grubu köpeklerin serumlarında görülen protein bantları.

Figure 2: The protein bands detected in the sera of dogs in experimental group by western blotting.



Resim 4: Western blot'da non-enfekte köpek serumunda görülen protein bantları.

Figure 4: The protein bands detected in the non-infected dog serum by western blotting.



Resim 3: Western blot'da kontrol grubu köpeklerin serumlarında görülen protein bantları.

Figure 3: The protein bands detected in the sera of dogs in control group by western blotting.