

**DENEYSEL OLARAK ENFEKTE EDİLEN KOYUNLARDA
FASCIOLA HEPATICA'NIN IMMUNOPEROKSİDAZ ve
IMMUNOFLORESAN TEKNİKLERİ İLE MUKAYESELİ
TEŞHİSLERİ¹**

Turan Oğuz²

Hans Grelck³

Recep Tınar⁴

Ayşe Burgu⁵

Metin Alabay⁶

The comparative diagnosis of Fasciola hepatica by Immunoperoxidase and Immunofluorescence technics in experimentally infected sheep

Summary: *The diagnosis of Fascioliasis in 9-month-old merino lambs experimentally infected with F.hepatica, was investigated comparatively by using the indirect immunofluorescence (IFAT) and immunoperoxidase (IPT) tests.*

14 animals were used in this study. The first and the second group of lambs, each consisted of 6 animals, received 75 and 225 metacercariae, respectively. The third group of 2 animals was kept as controls, without being infected.

Specific antibodies were tested at one-week intervals, by using the both serological tests. These were firstly detected at the end of the second week after administration of the metacercariae.

1 TBTAK tarafından VHAG - 388 No.lu Proje ile desteklenmiştir.

2 Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara-Türkiye.

3 Dr. med. vet. Institut für Parasitologie des Fachberichs Veterinärmedizin der FU Berlin -B.R.D

4 Doç. Dr. med. vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara-Türkiye.

5 Dr. med. vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara-Türkiye.

6 Asistan, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara-Türkiye.

In all of infected animals, specific antibodies were detected at the end of the 3 rd. week by using IPT; in the 3 rd. week in Group II, in the 5 th. week in Group I, by IFAT. No significant difference was found between Group -I and -II.

The antibody titers were decreased gradually after treatment. The negative results were reached in the 18 th. week by IPT and in the 14 th. week by IFAT. IPT was found to be more sensitive in highly diluted solutions than IFAT, as far as the low antibody titers were concerned.

The serological findings obtained by both tests, were always found to be negative in control animals during these studies.

In this study, it was considered that both tests could successfully be used, in the diagnosis of fascioliasis. IPT was more preferable, from the stand points of being more sensitive in determining of low antibody titers in highly diluted solutions and necessitating only of a conventional light microscope. (Received on 16.11.1978.)

Özet: *F. hepatica ile yapay enfekte edilen 9 aylık merinos kuzularında, fascioliasis'in teşhisi indirek immunofloresan (IFAT) ve immunoperoksidaz (IPT) testleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.*

Üç gruba ayrılan kuzulardan 6 şar hayvanlık 1. ve 2. gruba sırasıyla 75 ve 225'er adet metaserker verilmiş, 2 hayvanlık 3. grup ise enfekte edilmeksizin kontrol olarak bırakılmıştır.

Enfeksiyondan sonra birer hafta ara ile her iki testle yapılan serolojik yoklamalarda en erken 2. haftada antikor tesbit edilmiştir. Tüm enfekte hayvanlarda antikor IPT ile 3. haftada, IFAT ile 2. grupta 3, 1. grupta ise 5. haftada saptanmıştır. Değişik sayıda metaserker ile enfekte gruplar arasında önemli sayılabilecek bir farklılık görülmemiştir.

Sağıtımdan sonra enfekte hayvanlarda antikor düzeyi haftalar ilerledikçe düşüş göstermiş, 1/2 dilusyondan sonraki sulandırmalarda negatif sonuçlar IPT ile 18. haftadan, IFAT ile ise 14. haftadan itibaren görülmeye başlanmıştır. IPT'nin yüksek sulandırmalarda yani düşük antikor düzeylerinin saptanmasında IFAT ne oranla daha hassas olduğu dikkati çekmiştir.

Kontrol grubundaki hayvanların deney süresince her iki testle yapılan serolojik yoklamaları daima negatif bulunmuştur.

Böylece yapılan çalışmada fascioliasis'in teşhisinde her iki testin başarı ile kullanılacağı kanısına varılmıştır. Ayrıca, ışık mikroskobunun kullanılabilmesi ve düşük antikor düzeylerinin tesbitinde daha hassas olması nedenleriyle IPT'nin tercih edilebilir bir test olduğu saptanmıştır.

Giriş

Paraziter hastalıkların teşhisinde kullanılan direkt metodlar ile konakıcılardaki ergin parazitlerin çok büyük bir kısmını saptamak mümkün ise de çoğu kez erginlerinden daha patojen olan genç veya larva dönemindeki parazitleri bu yöntemlerle tesbit etmek olanaksızdır. Bu güçlüğü yenmek amacıyla indirekt bir metod olan immuno-lojik yöntemlerden parazitoloji alanında da yararlanmayı düşünen bilim adamları bilhassa 2. Dünya savaşından sonra bu hususta geniş araştırmalar yapmaya başlamışlardır. Bunlar içerisinde üzerinde en çok durulanlar komplement fikzasyon, hemaglutinasyon, agar-jel precipitasyon, latex aglutinasyon ve immunofloresan testleri olmuştur. Son yıllarda, yeni geliştirilen ve FAT ne oranla bazı üstünlükleri bulunan immunoperoksidaz testi üzerinde durulmaya başlanmıştır.

Bu çalışmamızda, yurdumuzun önemli bir sorunu olan fascioliasis'in erken teşhisinde yararlı olabilecek bu iki metodu mukayeseli olarak denemeyi amaç edinmiş bulunuyoruz.

Fascioliasis bir çok ülkede olduğu gibi yurdumuz evcil ruminantlarının da önemli bir paraziter hastalığı ve sorunudur (11). Özellikle öldürücü seyreden akut fascioliasis'in parazitlerin genç şekillerinden ileri gelmesi, canlı hayvanlarda teşhisin ancak immunoserolojik metodlarla yapılması gereğini ortaya koymaktadır.

Bu metodlardan floresan antikor tekniği Coons ve arkadaşları (2) tarafından 1942 yılında geliştirilerek viral ve bakteriyel hastalıkların teşhisinde kullanılmış olup Helmintolojide ise ilk kez 1959 da Jackson (13) tarafından *Trichinella spiralis*'de uygulanmıştır. Daha sonra bir çok Trematod, Cestod ve Nematod türleri ve larvalarının tanımı için araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (3, 4, 8, 15, 16, 21). *F. hepatica*'nın teşhisinde ilk kez direkt floresan antikor tekniğini uygulayan Thorpe (23) bilhassa genç parazitlerden hazırladığı antijenlerin daha kuvvetli floresans verdiğini ve floresansın kütikülada, barsak ve boşaltı kanallarına göre daha şiddetli olduğunu bildirmiştir. Koch (14), *F. hepatica* ile yapay enfekte koyun ve sığırlarda indirekt floresan antikor tekniği (IFAT) ile enfeksiyonun 2. haftasında antikor tesbit ettiğini, aynı sayıda metaserker ile enfekte hayvanlar arasında antikor teşekkülünün ve titresinin ise farklılıklar gösterdiğini saptamıştır. Movsesijan ve Borjevic (17), yapay enfekte kuzularda 14 üncü günden itibaren IFAT ile antikorların saptandığını ve antijenlerin daha çok sindirim ve dölerme organlarında lokalize olduğunu bildirmişlerdir. *F. hepatica* ile enfekte

şahıslarda sağıtmadan sonraki antikor seviyesini inceleyen Ambroise-Thomas (1) tedaviden sonraki ilk ay içinde anktikor seviyesinin yükseldiğini, daha sonra tedricen düşerek bazı vakalarda 7. aydan itibaren antikor tesbitinin mümkün olmadığını bildirmektedir. Aynı yazar (1) *F. hepatica*'nın, *F. gigantica* ile çok yakın, *Clonorchis sinensis* ve *Dicrocoelium dendriticum*'la ise çok farklı antijenik bir özelliğe sahip olduğunu kaydetmektedir. Hörchner ve arkadaşları (12) ile Grelck (9), *F. hepatica* ile tabii enfekte sığırlarda, indirekt floresan antikor metodunun, agar jel presipitasyon, latex çabuk aghutinasyon testlerinden üstün olduğunu ayrıca tedavi edilen sığırların serumunda 4. haftadan itibaren titrasyonun belirgin bir şekilde düştüğünü, 8. haftadan sonra ise bir kaç hayvanın pozitif reaksiyon gösterdiğini bildirmektedirler. *F. hepatica* ile yakın antijenik özelliği bilinen *F. gigantica*'nın erken teşhisinde IFAT ni kullanan Tınar (24), experimental olarak enfekte koyunların serumunda 20. günden itibaren antikor tespit ettiğini, değişik miktarda metaserker ile enfekte hayvanlar arasında antikor seviyesi bakımından önemli bir fark bulunmadığını, bu hayvanların sağıtılmasından hemen sonra antikor seviyesinde düşme görüldüğünü ve 150. günden itibaren de sıfıra indiğini kaydetmektedir.

1960 larda demir, civa ve uranyum gibi ağır metaller ile işaretlenmiş antikorlar ile doku antijenlerinin ultrastructural lokalizasyonunu tesbit eden bazı metodlar geliştirilmiştir. Fakat ağır metallerle işaretlenmiş antikorlar moleküllerinin büyüklükleri nedeniyle hücrelere nüfuzunun zayıf oluşu, antijen-antikor reaksiyonu bölgelerinde kontrast sağlanamaması ve karışık bir tekniğe sahip olması nedeniyle bu metodların kullanılışı fazla rağbet görmemiştir.

Nakane ve Pierce (18, 19), antikorları ağır metaller yerine peroksidaz veya asit fosfataz gibi enzimlerle etiketliyerek, antijenlerin tanınmada elde ettikleri sonuçların, floresans antikor tekniğindeki kadar iyi olduğunu bildirmişlerdir. Bu teknik "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay" İngilizce adından kısaltılarak ELISA diye anılmaktadır. Bu metodun elektron mikropkop için elverişli olması, preparatlarının uzun süre saklanabilmesi ve ışık mikroskobunda incelenebilmesi gibi üstünlüklerinin olduğunu ortaya koyan Nakane ve Pierce (19), ayrıca peroksidaz ile konjuge edilmiş antikorların asit fosfatazla konjuge edilenlere nazaran daha stabil ve hazırlanmasında kolay olduğunu belirtmektedirler. Dorling ve arkadaşları (5) ile Palmer ve arkadaşları (20) da İmmunofloresan testinde mümkün olmamasına karşın immunoperoksidaz (IPT) da, parafine batırılmış dokuların veya formalin ile tesbit edilmiş

parçaların boyanabileceğini ve ışık mikroskobu kullanılması gibi kolaylığı bulunduğunu açıklamaktadırlar. ELISA, antikorların tanımında ilk kez Engvall ve Perlmann (6) tarafından modifiye edilerek kullanılmış çok yakın tarihlerde de viral ve paraziter antijen ile antikorların saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır (7, 10, 22, 25, 26). Voller ve arkadaşları (26) son yıllarda immunoperoksidaz testiyle paraziter hastalıkların tanımı ile ilgili araştırmaları toplıyan yazısında, bu testin bir çok protozoon ve helmintlerin tanımında başarı ile kullanıldıklarını göstermektedir. Sığır fascioliasis'inin serolojik teşhisinde immunoperoksidaz testini, immunofloresan testi ile mukayeseli olarak deneyen Grellck ve H6rchner (10), IFAT ile *F. hepatica* taşıyan hayvanların serumlarının 1/8 titrasyona kadar % 100, buna karşın IPT nin % 93 pozitif sonuç verdiğini, fakat *F. hepatica* taşımayan hayvanların serumlarındaki pozitif reaksiyonların IFAT için bir dezavantaj, buna karşın IPT nin bu serumlarda daima negatif kalışı ile bu testte sulandırılmamış serumların ve heparinize plasmanın kullanılabilmesinin bir avantaj olarak kabul edilebileceğini kaydetmektedirler.

Materyal ve Metot

1- Çalışmada deney hayvanı olarak Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsünden satın alınan 9 aylık 14 erkek merinos kuzu kullanılmıştır. Bu kurumda fascioliasis enfeksiyonu bulunmadığı bilinmesine rağmen hayvanların dışkı muayeneleri yapılmış, 20 gün ara ile kanları alınıp indirek immunofloresan (IFAT) ve immunoperoksidaz (IPT) testleri ile yapılan serolojik yoklamalarında *F. hepatica* antikorları taşımadıkları saptandıktan sonra denemeye alınmışlardır.

2- Enfeksiyon materyali olan *F. hepatica* metaserkerleri Hoechst firmasından temin edilmiş olup, enfeksiyon zamanında 15 günlük idiler.

3- Deney hayvanları 3 gruba ayrılmış, bunlardan I. gruptaki 6 kuzuya 75 er, II. gruptaki 6 kuzuya 225 er adet *F. hepatica* metaserkeri, canlılık kontrolleri yapıldıktan sonra ağız yoluyla verilmiş, III. gruptaki 2 kuzu enfekte edilmeksizin kontrol olarak bırakılmıştır.

4- Her iki metodda da antijen olarak 10 ar adet metaserker ile enfekte edilen farelerden elde edilen 20-25 günlük genç *F. hepatica*'lar kullanılmıştır. Bunlar, otopsi yapılan farelerin karaciğerinden çıkarıldıktan sonra 3-4 defa buffer'de yıkanmış, boyutları takriben 1 cm. olan

küp şeklindeki sıçan karaciğerlerine gömülmüş ve sıvı CO₂ gazı ile dondurulmuştur. Bu bloklardan dondurma mikrotomunda 5 mikron kalınlığında kesitler yapılmış ve lâm üzerine alındıktan sonra tesbit edilip, kesitlerin etrafı tırnak cilâsı ile çevirildikten sonra kullanılmaya kadar -20 °C. de dipfrizde saklanmıştır.

5- Konjugat olarak: İmmunofloresan testinde Difco laboratuvarlarının "2356 Bacto-FA sheep globulin antiglobulin Rabbit" konjugatı 1/10 sulandırılarak, immunoperoksidaz testinde ise Cappel laboratuvarının "Peroxydase conjugated anti-sheep IgG" konjugatı 1/20 sulandırılarak kullanılmıştır.

6- Menfi Kontrol Serumu: Enfekte edilmeksizin kontrol olarak bırakılan 2 deney kuzusundan elde edilen serumlar ile, Hür Berlin Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Enstitüsünden temin edilen helmintlerden ari koyun serumu kullanılmıştır.

7- Kuzuların enfeksiyonundan sonra birer hafta ara ile kontrolle birlikte enfekte hayvanlardan kan alınmış, serumları 1/2 den 1/512 ye kadar sulandırılarak her iki metodla ayrı ayrı muayene edilmişlerdir. Hemen muayene edilemeyen serumlar -20°C. de dipfrizde saklanmışlardır.

8- Dışarıdan getirilen ve temini güç olan konjugatların fazla sarfiyatları önlemek amacı ile son iki dilusyonu negatif olan serumların daha yüksek sulandırmalarının muayenesine gidilmemiştir.

9- Enfeksiyonun 60. gününden itibaren dışkı muayeneleri yapılmaya başlanmış, enfekte hayvanların tümünde F. hepatica yumurtaları tesbit edildikten sonraki hafta kuzular 25 mg. /kg. hexachlorophen ile tedavi edilmişlerdir.

10- Tedaviyi müteakip I. haftadan itibaren ve birer hafta ara ile hayvanlardan tekrar kan alınmaya başlanmış ve serolojik muayenelere 1/2 den sonraki sulandırmalar son iki hafta menfi bulununcaya kadar devam edilmiştir.

11- Serolojik muayenelere son verildikten sonra tüm hayvanların otopsi yapılmış ve karaciğerleri F. hepatica yönünden muayene edilmişlerdir.

12- İndirekt floresan antikor testine ait teknik Tınar (24)'a göre, İmunoperoksidaz testine ait teknik ise Grelck ve Hörchner (10)'in bildirdikleri prosedüre göre uygulanmıştır.

Bulgular

Immunofloresan metoduyla yapılan muayenelerde *F. hepatica* kesitlerinin kutikülâlarının sarı-yeşil floresans gösterdiği olgular pozitif (Resim 1), sıçan karaciğer dokusuyla birlikte parazit kesitinin tümünün kırmızı görünüm verdiği olgular ise negatif (Resim 2) olarak değerlendirilmiştir.

Immunoperoksidaz metoduyla yapılan muayenelerde ise kuti-lâda daha koyu olmak üzere parazit kesitinin kahverengi görüldüğü olgular pozitif (Resim 3), parazit kesitinin destek dokusuyla birlikte çok açık bir renk gösterdiği olgular negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 4).

Enfeksiyondan sonraki ilk haftada her iki testle yapılan serolojik muayenelerde, deney hayvanlarının hiç birinde antikor saptanamamıştır. Tablo 1, 2, 3 ve 4 den de izlenebileceği gibi 2. haftada IPT ile her iki gruptan birer hayvanda pozitif reaksiyon tesbit edilmiştir. Enfekte hayvanların tümünün antikor taşıdıkları IPT'inde 3. haftada, IFAT'inde ise I. grupta 5., II. grupta 3. haftada saptanmıştır.

Haftalar ilerledikçe daha yüksek sulandırmalarda pozitif reaksiyon veren hayvan sayısında hemen hemen paralel bir artış görülmüştür. En yüksek olan 1/512 sulandırmada antikor tesbiti IPT ile her iki grupta 5 inci, IFAT ile 8 inci haftada mümkün olmuştur.

Enfeksiyondan 60 gün sonra enfekte hayvanların dışkı muayeneleri yapılmaya başlanmış, 62. günde bir, 65. günde üç, 70. günde sekiz ve 74. günde tüm kuzuların dışkılarında *F. hepatica* yumurtası saptanmıştır. Bu suretle 11. hafta sonunda hayvanlardan kan alınma son verilmiş ve 12. haftada sağıtımları yapılmıştır.

Sağıtımdan sonra 225 metaserkerle enfekte 2. gruptan iki kuzu ölmüş, serolojik yoklamalara bu grupta kalan 4 hayvanla devam edilmiştir.

Sağıtımdan 1 hafta sonra tekrar tüm hayvanlardan birer hafta ara ile kan alınma ve serolojik muayenelere başlanmıştır.

Yine tablolardan (1, 2, 3, 4) izlenebileceği gibi sağıtımdan sonraki haftalarda IFAT ile yüksek sulandırmalarda antikor tesbit edilen serum sayısının, IPT ne oranla daha süratle düştüğü, gruplar arasında ise önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür.

Tablo 2: Deneysel olarak F. hepatica ile enfekte edilen koyunlarda immunoperoxidase testinin sonuçları.

Grup : 1																														
Hayvan sayısı : 6																														
Verilen metaserker sayısı : 75																														
Serum sulandırma- maları	Haftalara göre pozitif serum sayısı																													
	Tedaviden önce										Tedaviden sonra																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1:2	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	4	4	3	2	2	1	
1:4	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	3	3	3	1	0	0	
1:8	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	4	5	2	2	2	1	0	0	
1:16	0	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	5	4	4	4	3	3	2	1	0	0			
1:32		1	4	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	4	4	4	3	3	2	2	1	0	0	0			
1:64		0	3	6	6	6	6	6	6	6	6	5	4	3	4	3	3	3	4	2	2	1	0	0	0					
1:128		0	1	4	4	5	5	6	6	6	6	4	2	1	3	3	2	2	3	1	1	0	0	0	0					
1:256			0	3	3	3	5	6	6	6	5	4	1	0	2	2	2	1	1	0	0	0								
1:512			0	1	1	1	2	2	3	4	3	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0									

Tablo 4: Deneysel olarak F. hepatica ile enfekte edilen koyunlarda immuno floresan testinin sonuçları.

Grup : 2																										
Hayvan sayısı : 6																										
Verilen metaserker sayısı : 225																										
Serum Sulandır- maları	Haftalara göre pozitif serum sayısı																									
	Tedaviden önce										Tedaviden sonra															
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1:2	3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	2	
1:4	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	2	1	0	0
1:8	2	5	5	5	6	6	6	6	6	6	4	4	3	4	4	4	4	3	3	2	2	2	1	0	0	0
1:16	1	4	5	5	6	6	6	6	6	6	4	4	3	4	4	4	2	2	1	2	1	1	0	0		
1:32	0	1	2	3	6	4	6	6	6	6	4	3	3	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0			
1:64	0	0	1	3	4	3	6	6	6	6	4	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0				
1:128		0	0	0	1	2	6	6	6	6	3	0	0	0	0	0	0									
1:256			0	0	0	2	3	3	6	5	2	0	0	0												
1:512					0	0	2	1	3	2	0	0														

Sağıtımdan sonra IFAT ile yapılan muayenelerde 1/2 den daha yüksek sulandırmalardaki negatif reaksiyonlar 1. grupta 14. haftada, II. grupta 15. haftadan sonra görülmeye başlanmış ve 16. haftadan sonra bu testle yapılan serolojik yoklamalara son verilmiştir.

IPT ile, 1/2 den daha yüksek sulandırmalarda negatif reaksiyonlar 1. grupta 18. haftada, II. grupta ise 19. haftada görülmüş ve muayenelere 19. haftadan sonra son verilmiştir.

Enfekte edilmeksizin kontrol olarak bırakılan III. gruptaki 2 kuzudan deney süresince her iki test ile yapılan serolojik yoklamaların tümü negatif olarak kalmıştır.

Serolojik yoklamalara son verildikten sonra deney hayvanları kesime tabi tutulmuş ve F. hepatica yönünden muayene edilen karaciğerlerin hiç birinde bu parazite rastlanmamıştır.

Tartışma

F. hepatica ile yapay enfeksiyonu müteakip tüm kuzularda olmamakla beraber her iki test ile antikor en erken 2. haftadan itibaren saptanmıştır. Movsesijan ve Borojevic (17) ile Koch (14)'un sırasıyla yapay enfekte kuzu ve sığırlarda IFAT ile 14. günde antikor tesbit etmeleri, bizim bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

Tablolardan (1,2,3,4) da izlenebileceği gibi gruplar, yani 75 ve 225 metaserkerle enfekte edilen kuzular arasında IPT ile yapılan muayenelerde antikor seviyesi bakımından kayda değer bir fark görülmemiş olup, buna karşın IFAT ile 2. gruptaki tüm hayvanlarda antikor 3. haftada, 1. grupta ise 5. haftada tesbit edilmiş, bu ufak farktan başka önemli bir ayrılık görülmemiştir. Benzeri bir çalışmada Tınar (24), farklı sayıda F. gigantica metaserkeri ile enfekte ettiği kuzunlarda IFAT ile yaptığı serolojik muayenelerde, antikor seviyeleri bakımından önemli bir fark bulunmadığını kaydetmektedir. Koch (14) ise aynı sayıda metaserker ile enfekte hayvanlar arasında antikor teşekkülünün ve titresinin farklılıklar gösterdiğini bildirmektedir. Bu bulgular enfeksiyon şiddetinin serumdaki antikor seviyesi üzerine paralel bir etki yapmadığı sonucunu vermektedir.

Tedaviden sonra haftalar ilerledikçe yüksek sulandırmalarda negatif reaksiyonların artması kanda antikor seviyesinin giderek azaldığını göstermiştir. IPT de yüksek titrasyonlarda antikor tesbitleri IFAT ne oranla daha uzun süre yapılabilmektedir. Nitekim 1/2 sulandır-

madan sonraki negatif reaksiyonlar IPT ile 18. haftadan, IFAT ile birinci grupta 14., ikinci grupta 15. haftadan itibaren görülmeye başlanmıştır. IFAT ile yaptıkları serolojik yoklamalarda Ambroise Thomas (1), insan fasciolosis'inde tedaviden sonra ilk iki ay içinde antikor seviyesinin yükseldiğini, daha sonra tedricen düşerek 7. aydan itibaren bazı vakalarda antikor tesbitinin mümkün olmadığını, Tınar (24), *F. gigantica* ile enfekte koyunların tedavisinden 150 gün sonra antikorların kanda saptanamadığını, Grelck (9) ile Hörchner ve arkadaşları (12) ise sığırlarda sağtımdan sonra 4. haftadan itibaren belirgin bir şekilde düştüğünü, 10. haftada ise tamamen negatif olduğunu belirtmişlerdir. Biz yaptığımız araştırmada Ambroise-Thomas (1) in bildirdiği şekilde antikor seviyesinde bir artışa rastlayamadık. Ayrıca Hörchner ve arkadaşları (12) ile Grelck (9) in belirttiğinin aksine 10. haftadan daha uzun süre kanda antikor tesbit etmiş bulunuyoruz. Bulgularımız daha çok Tınar (24)'in bulgularına benzer bir görünüm arz etmiştir. Biz bu farklı bulguların daha çok konakçıların değişik olması ile bircylerin antijenlere karşı farklı immunolojik yanıt vermesinden ileri geldiği kanısındayız.

Yapılan araştırmalar sonunda bir çok araştırmacı (5, 10, 18, 19)'nın belirttiği gibi biz de her iki testin *F. hepatica*'nın serolojik teşhisinde başarı ile kullanılabileceğini, yalnız IPT nin adi ışık mikroskobunda değerlendirilmesi gibi önemli bir kolaylığa sahip olduğunu saptamış bulunuyoruz. Bizim denememiş olmamıza rağmen IPT ile formalinde tesbit edilmiş, veya parafine batırılmış materyalin boyanabileceği, preparatların daha uzun süre saklanabileceği ve testin elektron mikroskop için uygun olduğunun bildirilmesi (18, 19, 20 22), bu testin IFAT'ne olan diğer üstünlükleridir.

Literatür

- 1- **Ambroise-Thomas, P.** (1969): *Etude sero-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence*. These Doct. Sci., Lyon.
- 2- **Coons, A.H., H.J. Creech, R.N. Jones and E. Berliner** (1942): *The demonstration of pneumococcal antigens in tissues by the use of fluorescent antibody*. J. immun., 45, 159-170.
- 3- **Coudert, J., P. Ambroise-Thomas, T. Kien-Truong et Mile S. Terreno** (1968): *Diagnostic serologique des filarioses par immuno-fluorescence sur cupes de *Dirafilaria immitis* et de *Dipetalonema viteae**.

Resultats préliminaires portant sur 200 examens. Bull. Soc. Path. exot., 61, 435-441.

- 4- **Coudert, J., P., Ambroise-Thomas, T. Kien-Truong et M.A. Pothier** (1967): *Premiers resultats concernant le diagnostic serologique du kyst hdatique par une nouvelle technique d'immuno-fluorescence sur lames.* Bull. Soc. Path. exot., 60, 555-563.
- 5- **Dorling, J., G.D. Johnson, J.A. Webb anol M.E. Smith** (1971): *Use of peroxidase-Conjugated antiglobulin as an alternative to Immunofluorescence for the detection of antinuclear factor in serum.* J. clin. Path., 24, 501-505.
- 6- **Engvall, E. and P. Perlmann** (1972): *Enzyme-Linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.* J. Immunol., 109, 129-134.
- 7- **Ferreira, A.W., M.E. Camargo and O.S. Nakahara** (1975): *Trypanosoma cruzi: Immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis.* Expl. Parasit. 37, 131-137.
- 8- **Gore, R.W., E.H. Sadun and R. Holl** (1970): *Echinococcus granulosus and E. multilocularis soluble antigen fluorescent antibody test.* Expl. parasit., 28, 272-279.
- 9- **Grelck, H.** (1976): *Beurteilung der koproskopischen und serologischen Methoden zur Diagnose der Rinderfasciolose.* Diss. FU Berlin.
- 10- **Grelck, H. und F. Hörchner** (1977): *Vergleichende Untersuchungen Zur Serodiagnostik der Rinderfasciolose mit dem indirekten immuno-fluoreszans-und immunoperoxidase test (ELISA).* Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. 90, 332-335.
- 11- **Güralp, N.** (1974): *Helmintoloji.* Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları 307.
- 12- **Hörchner, F., H. Grelck und F.G. Flasshoff** (1976): *Zur Diagnostik der Rinderfasciolose.* Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. 89, 296-300.
- 13- **Jackson, G.J.** (1959): *Fluorescent antibody studies of Trichinella spiralis infection.* J. Infect. Dis., 105, 97-118.
- 14- **Koch, H.W.** (1969): *Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Haemagglutination flocculation, Mikro-Agar-Prazipitation und der immunofluoreszens zum frühzeitigen Nachweis der Fasciolose des Rindes.* Diss. FU Berlin.

- 15- **Mantovani, A. and A.J. Sulzer** (1967): *Indirect fluorescent antibody technique for diagnosis of canine filariasis*. Am. J. Vet. Res., 28, 351-354.
- 16- **Mitchell, J.R.** (1964): *Detection of Toxocara canis antibodies with the fluorescent antibody technique*. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 117, 267-270.
- 17- **Movsesijan, M. and D. Borojevic** (1970): *Primena fluorescentne mikroskopije u dijagnozi nekih parazitskih infekcija ovaca*. Vet. Glasn., 1019-1022.
- 18- **Nakane, P.K. and G.B. Pierce** (1966): *Enzyme-labelled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens*. J. Histochem. Cytochem., 14, 929-931.
- 19- **Nakane, P.K. and G.B. Pierce** (1967): *Enzyme-labelled antibodies for the light and electron Microscopic localization of tissue antigens*. J. Cell. Biol., 33, 307-318.
- 20- **Palmer, P.E., R.A. Delellis, H.J. Wolfe** (1971): *Immunohistochemistry of liver in Alpha-antitrypsin deficiency. A comparative study*. A.J. Clin. Path., 62, 350-354.
- 21- **Sadun, E.H.J.S. Williams and R.I. Anderson** (1960): *A fluorescent antibody technic for sero-diagnosis of schistosomiasis in human*. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 105, 289-291.
- 22- **Teufel, P., W. Miels und W. Becker** (1974): *Die Immunoperoxidase-Methode zum Nachweis von Virus- und Chlamydien-Antigenen*. Zbl. Vet. Med., 21, 37-47.
- 23- **Thorpe, E.** (1965): *Immunocytochemical study with Fasciola hepatica*. Parasitology, 55, 209-214.
- 24- **Tınar, R.** (1976): *Floresan antikor tekniği ile koyunlarda Fasciola gigantica'nın erken teşhisi üzerinde araştırmalar*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları 328, çalışmalar 228.
- 25- **Voller, A., G. Huldtt, C. Thors and E. Engvall** (1975): *New serological test for malaria antibodies*. Br. med. J., 1, 659-661.
- 26- **Voller, A., A. Bartlett and D. E. Bidwell** (1976): *Enzyme immunoassays for parasitic diseases*. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 70, 98-106.

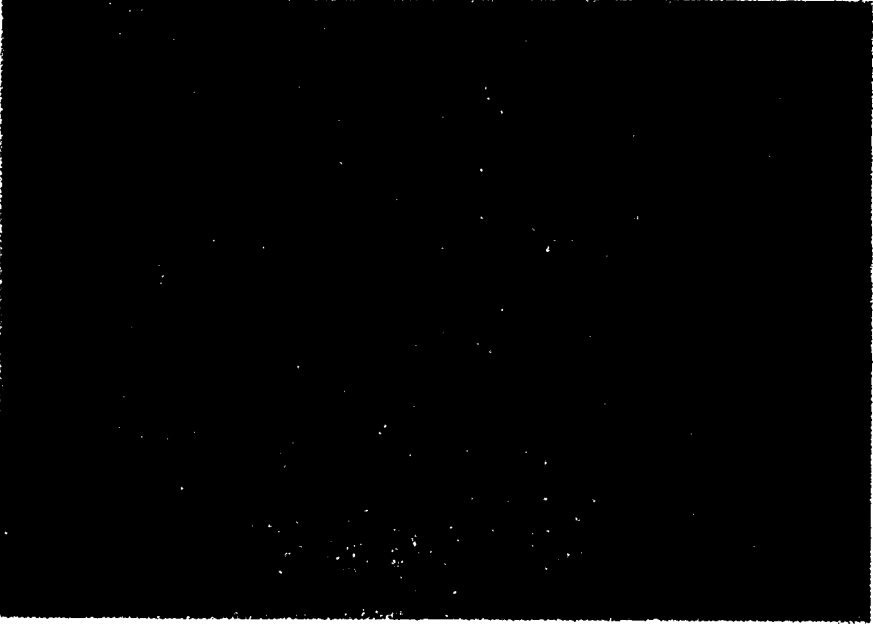
Yazı 16-11-1978 Günü Alınmıştır,



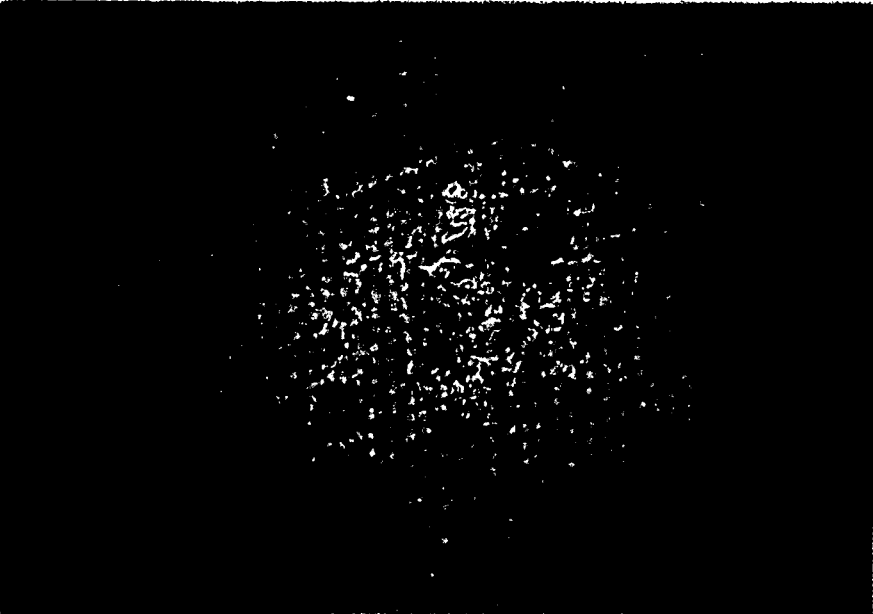
Resim 1. İndirek immunofloresan testinde pozitif reaksiyon. (Positive reaction in IFAT).



Resim 2. İndirek immunofloresan testinde negatif reaksiyon. (Negative reaction in IFAT).



Resim 3. İmmunoperoksidaz testinde pozitif reaksiyon. (Positive reaction in IPT).



Resim 4. İmmunoperoksidaz testinde negatif reaksiyon. (Negative reaction in IPT).