

## KOYUNLARDAKİ PARAMPHİSTOMUM CERVI SCHRANK, 1790 ENFEKSİYONUNUN İMMUNOPEROKSİDAZ VE İNDİ- REKT FLORESAN ANTİKOR TEKNİKLERİYLE KARŞILAŞ- TIRMALI TEŞHİSİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR\*

Metin Alabay\*\*

**Summary:** *The diagnosis of experimental Paramphistomum cervi infections, in 1 to 1.5 year old akkaraman sheep, was investigated comparatively by using the indirect immunofluorescence (IFAT) and indirect immunoperoxidase (ELISA) tests.*

12 animals were used in this study. Groups 1, 2, 3 and 4 (control) received 5000, 10000, 15000 and zero *P.cervi* metacercariae, respectively.

Using the IFAT test, specific antibodies were first detected by day 14 in group 1 and 2, and by day 18 in group 3. With the ELISA test, specific antibodies were first detected by day 18 in all the groups. No significant differences in antibody titres were seen among the groups. But group 3 sheep showed a higher antibody level than the other groups by the IFAT test.

At the end of the prepatent period, sheep were treated with an anthelmintic and tests performed for 2 months. Antibody titres (IFAT test) decreased gradually after treatment and were too low to be of use for diagnosis by day 40 in group 1 and by day 20 in groups 2 and 3. Using the ELISA test, antibody levels were considerably lower than those which occurred during the prepatent period in each of 3 groups.

High rates of false positive reactions were seen in both tests in controls. Also, the antibody titres tended to be rather low during all the experiments. For these reasons, it was considered that both tests are not sufficiently reliable and sensitive for the diagnosis of *P.cervi* infections.

\* Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından VHAG-501 Nolu proje ile desteklenmiştir.

\*\* Dr. med. vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi. Parazitoloji Kürsüsü. Ankara-Türkiye.

**Özet:** *Paramphistomum cervi* ile yapay olarak enfekte edilen 1-1,5 yaşlı akkaraman koyunlarında, bu parazitin teşhisi, indirekt floresan antikor (IFAT) ve indirekt immunoperoksidaz (ELISA) testleri ile karşılaştırılmış olarak araştırılmıştır.

Bu amaçla, üçer hayvanlık dört gruba ayrılan koyunlardan, 1. gruba 5000, 2. gruba 10.000 ve 3. gruba da 15.000 adet *P.cervi* metaserkeri

Bu amaçla, üçer hayvanlık dört gruba ayrılan koyunlardan, 1. gruba 5000, 2. gruba 10.000 ve 3. gruba da 15.000 adet *P.cervi* metaserkeri verilmiş son grup ise kontrol olarak bırakılmıştır.

Enfeksiyondan sonra her iki test ile yapılan serolojik yoklamalarda IFAT testi ile en erken, 1. ve 2. gruplarda 14. günde, 3. grupta 18. günde ve ELISA testi ile tüm gruplarda 18. günde antikor tesbit edilmiştir.

Değişik sayıda metaserkerle enfekte gruplar arasında antikor düzeyi yönünden belirgin farklılıklar görülmemiş ancak, 15.000 metaserkerle enfekte grupta IFAT testinde diğer gruplara oranla daha yüksek bir antikor düzeyi saptanmıştır.

Prepatent süre sonunda enfekte koyunlar sağlanmış ve iki ay süre ile testlere devam edilmiştir. Sağıtımı izleyerek enfekte hayvanlarda, IFAT testi antikor titrelerinde giderek düşme görülmüş ve 1. grupta 40., 2 ve 3 gruplarda ise 20. günden itibaren teşhis için yeterli olmayacak düzeylerde oldukları belirlenmiştir. ELISA testi antikor titreleri ise, her üç grupta da prepatent periyoda oranla oldukça düşük düzeylerde seyretmiştir.

Kontrol grubu koyunlarında her iki teste de düşük sulandırılmalarda yüksek oranlarda yanlış pozitif reaksiyonların görülmesi ve genel olarak tüm deneyler süresince antikor titrelerinin yüksek düzeylere erişmemesi gibi nedenlerle her iki testin de *Paramphistomum cervi* enfeksiyonlarının teşhisinde hassas ve güvenilir olmadıkları kanısına varılmıştır.

## Giriş

Koyunlarda, Paramphistomidae familyasına bağlı *P.cervi*'den ileri gelen paramphistomiasis olayları dünyada oldukça yaygın olup Asya, Afrika ve Avrupa gibi çeşitli kıtalarda birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (2, 3, 5, 9, 13, 14, 15, 25).

Yurdumuzda ise *P.cervi*'nin yayılışı ile ilgili yayınlar oldukça azdır. Güralp (12), yurdumuzda Paramphistomum'ların koyunlarda en yaygın bulunduğu yerin Eskişehir'e bağlı Çifteler Harası olduğunu ve enfeksiyonun % 57,7-100 arasında değiştiğini kaydetmiştir. Burgu

(5), aynı yörede *P.cervi*'nin biyolojisi ile ilgili yaptığı bir çalışmada ise enfeksiyon oranının ortalama % 80.76 olduğunu saptamıştır.

Son konakçı koyunların enfeksiyonu, *P.cervi* metaserkerlerinin ağızdan alınması, duodenumda genç parazitlerin kistten çıkması, bunların bir süre burada kalarak beslenip büyümesi ve daha sonra da reticulum yoluyla rumene gelip yerleşmesiyle olmaktadır. Parazitin olgunlarının çoğuna reticuluma yakın rumen bölgesinde, ruminal papillere tutunmuş şekilde, bir kısmına rumen boşluğunda, çok azına da reticulumda rastlanmaktadır (5, 12).

Paramphistomum'ların rumende bulunan olgun şekillerinin fazla sayıda olsalar dahi patojen kabul edilmediği, bunların kommensal olarak içerikle beslendiği, ince barsaklarda bulunan genç şekillerinin ise gerçek parazit olduğu ve konakçının dokusuyla beslendikleri belirtilmiştir (7, 12, 13).

Klinik olarak, genç parazitlerden ileri gelen paramphistomiasis olaylarında ağır ve sulu bir ishal, ileri zafiyet, ödem, anemi ve ölüm görülmektedir. Bu parazitlerden ötürü mortalite % 80-90'ı bulabilmektedir (12).

Koyunlarda, enfeksiyondan sonra 7 hafta içinde hemoglobinin, hematokrit değeri, total protein, albümin ve alfa globulin düzeyleriyle, inorganik fosfor ve demir düzeylerinde bir azalma ve eritrosit sayısında bir düşme görüldüğü bildirilmiştir (26). Enfeksiyonun ilk döneminde ölen hayvanların otopsilerinde ise duodenum ve bazende jejunum barsak bezlerinin tahribatı, lenf bezlerinin dejenerasyonu, kataral ve hemorajik yangılar görüldüğü, yaygın patolojik değişikliklerin hydropericardium, hydrothorax, karında su toplanması, mesenterium ve mediastinal lenf bezlerinde ödemler ve karaciğerde yağ infiltrasyonu olduğu bildirilmektedir (12).

Histolojik kesitlerde genç fakat büyük parazitlerin barsak yüzeyine tutundukları küçük olanların ise muscularis mucosa tabakasına kadar gömüldükleri, mükoza parçacıklarının Paramphistomum'ların acetabulumları içinde olduğu, bu durumdaki parazitlerin nekroz, hemoraji ve yangılara neden oldukları kaydedilmiştir (12, 13).

Paramphistomum'ların gelişmeleri bütün türlerde birbirine benzemekte ve birçok trematod'da olduğu gibi tatlısu sümüklülerini arakonakçı olarak kullanmaktadırlar. *P.cervi*'nin arakonakçısı olan sümüklü; Kenya'da *Bulinus syngenes* ve *B.alluaudi*, Irak ve Mısır'da *B.truncatus*, Bulgaristan'da *Planorbis planorbis*, Hindistan'da *Indop-*

lanorbis exustus, İtalya'da P.planorbis, B.contortus ve B.truncatus, Almanya'da P.planorbis, Anisus vortex, A.leucostomus, Bathyomphalus contortus, Hippeutis complenatus ve Armiger crista olarak bildirilmektedir (2, 3, 5, 9, 18).

Yurdumuzda, Eskişehir yöresinde yapılan bir araştırmada (5), P.cervi'nin arakonakçı tatlusu sümüklüsünün Planorbis planorbis olduğunu belirtmiştir.

Nath (20), koyunlarda Cotylophoron cotylophorum'un tanısında, antijen olarak parazitin alkol veya tuzlu su'daki ekstraktını kullanarak uyguladığı intradermal allerjik, testte, çabuk veya geç tipte allerjik reaksiyonların görülmediğini bildirmiştir. Horak (13) ise, gene koyunlarda P.microbothrium, P.ichikawai, C.cotylophorum ve Calicophoron calicophorum'un tanısında immatüre parazitlerin ve meta-serkerlerin tuzlu su ekstraktları ile olgun ve immatüre parazitlerin alkoldeki ekstraktlarını antijen olarak kullanarak uyguladığı intradermal allerjik testte, antijenlerin spesifik olmadığını, Fasciola hepatica ve Schistosoma matthecei gibi parazitlerle enfekte koyunlarında pozitif reaksiyonlar verebildiğini belirtmiştir. Gene aynı araştırmacı koyunlarda bu parazitlerin teşhisinde, komplement birleşmesi ve canlı parazit etrafında serum presipitatları testlerini, antijen olarak olgun ve immatüre parazitler kullanarak uygulamış, ancak başarılı sonuçlar almadığını bildirmiştir.

Bütün literatür araştırmalarımıza rağmen ELISA ya da IFAT serolojik tanı yöntemleriyle P.cervi'nin tanısı konusunda bir çalışmaya rastlayamadık. Bununla beraber bu tekniklerle diğer helmintler üzerinde yapılmış birçok araştırmalar vardır.

### Meteryal ve Metod

P.cervi'nin arakonakçısı sümüklüböcekler (P.planorbis), Eskişehir Çifteler Harasındaki başlıca kanal, akarsu ve su yalaklarından toplanmış, su ile dolu kavanozlar içinde laboratuvara getirilmiştir.

Aynı yörede kesilen koyunlarda doğal P.cervi enfeksiyonu araştırılmış, laboratuvar çalışmaları için gerekli P.cervi yumurtaları sağlamak amacı ile enfekte hayvanların rumenlerinden toplanan P.cervi'ler, içinde fizyolojik su bulunan kaplarda kesimin yapıldığı gün laboratuvara getirilmiştir.

Bu P.cervi'ler 37°C deki etüvde 1 gece bırakılarak henüz canlı olan parazitlerin yumurtlaması sağlanmış, ertesi gün bir süzgeçle pa-

razitler yumurtaları içeren sudan ayrılmıştır. Süzgeçteki parazitler bir blender tarafından iyice parçalanarak tekrar süzölmüş ve parazitin uterusunda bulunan yumurtaların da elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen tüm yumurtalar temizleninceye kadar birçok defa distile su ile yıkanmıştır.

Elde edilen *P.cervi* yumurtaları, petri kutuları içerisinde 25-26°C deki etüve konarak gelişmeye bırakılmış, petrilerin suları gün aşırı değiştirilerek yumurtalar fırçalanmış ve miracidium gelişimi sık sık stereomikroskopta izlenmiştir. Miracidiumların gelişimi genellikle 13-15 gün arasında tamamlanmış, içlerinde tam gelişmiş miracidiumlar bulunan yumurtaları içeren petri kutuları, 150 watt'lık ışık kaynağı altına, 30 cm uzaklığa yerleştirilerek yumurtalar tamamen boşalınca kadar miracidium çıkışı sağlanmıştır.

Sümüklüböceklerin yapay enfeksiyonlarında 5-10 miracidium kullanılmıştır. Miracidiumlar küçük lastik puvarlı bir pipetle sayılarak alınmış ve hemaglutinasyon levhalarının yuvalarına konmuş, daha sonra her yuvaya bir adet sümüklüböcek yerleştirilmiştir. Bir gece bu şekilde miracidiumlarla birlikte tutulan sümüklüböcekler daha sonra tekrar kaplara alınmıştır.

Laboratuvarda yaklaşık 1-1,5 ay sonra enfekte sümüklüböceklerde serkerler oluşmuştur. Bu sümüklüböcekler, içi naylon ile kaplanmış büyük petri kutularına alınarak, 150 watt'lık ışık kaynağı altında, yaklaşık 30 cm uzaklığa konmuş ve serkerlerin naylon üzerine kistlenmeleri sağlanmıştır.

Araştırmada dency hayvanı olarak 12 adet 1-1,5 yaşlı erkek akkaraman koyunu kullanılmıştır. Deneme hayvanlarının, bu trematodla ve diğer helmintlerle daha önce enfekte olup olmadığı flotasyon ve sedimentasyon dışkı bakıları ile belirlenmiştir. Koprolojik ve serolojik incelemelerden sonra *P.cervi* ile enfekte olmadıkları anlaşılan hayvanlar, mide-barsak ve akciğer nematodları bakımından 20 mg./kg. Tetramisole ve *Dicrocoelium* yönünden de 50 mg./kg. Hetolin ile sağlanmışlardır.

Enfeksiyonlarda yaşları 7-60 günlük olan metaserkerler kullanılmıştır. Metaserkerlerin canlılık kontrolü, aynı gün toplanan metaserkerlerin bulunduğu her naylon üzerinden 10 metaserkerin lam ve lamel arasında, mikroskopta içlerindeki hareketliliğin bulunmasına bakılarak yapılmıştır. Muayenelerde canlı bulunan metaserker oranına göre sayımlar yapıldıktan sonra denemeye alınmıştır.

Enfeksiyon için 12 deneme hayvanı 3'er koyunluk 4 gruba ayrılmış, birinci gruba 5000, ikinci gruba 10.000 ve üçüncü gruba da 15.000 P.cervi metaserkerleri jelâtin kapsüller içerisinde yutturularak verilmiştir. Dördüncü grup ise kontrol olarak bırakılmıştır.

Enfeksiyonu izleyerek 14.günde ve daha sonra her 4 günde bir, her koyundan yaklaşık 10 cc. kan örnekleri alınmış, serumları çıkarılarak her iki testte de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 . . . . . 1/256'ya kadar sulandırılmalar yapıldıktan sonra ilk antikor saptanmasına değin indirekt immunofloresan ve indirekt immunoperoksidaz testlerine tabi tutulmuştur. Alındığı gün muayeneye tabi tutulmayan serumlar —25°C de muayene zamanına kadar muhafaza edilmişlerdir. İlk antikor saptanmasından sonra 8-11 gün aralıklarla koyunlardan kan alınarak, prepatent süre sonuna kadar testlere devam edilmiştir.

Prepatent süre, sedimentasyon dışkı muayeneleriyle, dışkıda P.cervi yumurtalarının görülmesiyle belirlenmiştir. Muayenelere 97.günden itibaren başlanmış, prepatent süre I. ve II. gruplarda 108, III. grupta 106 gün olarak saptanmış, bu süre sonunda hayvanlar 65 mg./kg. Terenol ile sağıtılmış ve sağıtımı izleyen 2 ay boyunca antikor düzeyinde oluşabilecek değişiklikler her iki testle'de incelenmiştir. Bu süre sonunda otopsi yapılan deney hayvanları parazitolojik yönden muayene edilmiştir.

Antijen olarak P. cervi ile enfekte edilen tavşanlardan elde edilen genç Paramphistomumlar kullanılmıştır.

Bu amaçla tavşanlara 200 P.cervi metaserkeri verilmiş, 8-9 hafta sonra tavşanlar otopsi yapılarak ince barsakları açılıp genç Paramphistomumlar, stereomikroskop altında veya çıplak gözle ılık fizyolojik su içinde toplanmıştır. Toplanan parazitler eni, boyu ve derinliği yaklaşık 0,5 cm. olan rat karaciğeri parçacıklarına dikine saplanarak bloklar hazırlanmıştır. Bu bloklar sıvı CO<sub>2</sub> gazı ile dondurulduktan sonra, parafilm'le sarılarak —25°C de difrizde saklanmıştır. Daha sonra bu bloklardan dondurma mikrotomunda 5 mikron kalınlığında kesitler yapılarak lamlara monte edilmiştir. Bu kesitler 5 dakika Carnoy solusyonunda, üç defa 1'er dakika alkol absolünde tutularak tesbit edilip kullanılmaya dek lam kutuları içinde —25°C de difrizde saklanmıştır.

Araştırmada, indirekt immunofloresan testi için Cappell laboratuvarlarının; "13422 Fluorescein Conjugated IgG Fraction Rabbit Anti-Sheep IgG" konjugatı, indirekt immunoperoksidaz testi için

ise gene aynı laboratuvarların "11483 Peroxidase Conjugated IgG Fraction Rabbit Anti-Sheep IgG" konjugatı kullanılmıştır. Konjugatlar eşit miktarda steril distile suyla sulandırıldıktan sonra 0,5cc. lik tüplere 100 er mikrolitre konarak kullanılıncaya dek  $-25^{\circ}\text{C}$  de difrizde saklanmıştır.

Kontrol serumları olarak, enfekte edilmeksizin kontrol olarak bırakılan gruptaki 3 koyunun kan serumları kullanılmıştır.

ELISA testi, Oğuz ve arkadaşlarının (21) ve IFAT testi de Tınar'ın (24) bildirdikleri prosedürlere uygun olarak yapılmıştır.

Sonuçların istatistik değerlendirmelerinde, her muayenede enfekte her gruptaki koyunların antikor titrelerinin geometrik ortalamaları GMRT-Antilog  $f(\log x)/N$  formülünden yararlanılarak elde edilmiş ve tablolarda gösterilmiştir. Burada (x) değişik antikor titrelerini, (f) bu titreleri veren serum sayısını ve (N) toplam muayene sayısını ifade etmektedir.

### Sonuçlar

Teşhis, indirekt immunofloresan testinde, P.cervi kesitlerinin kütikülasının ve iç organlarının parlak sarı-yeşil floresan renk vermesiyle konmuştur. Negatif durumlarda parazitin kesiti floresan renk göstermemiş, rat karaciğer dokusu ile birlikte kırmızı bir görünüm vermiştir.

İndirekt immunoperoksidaz testinde ise, parazit kesitinin koyu kahverenkli, rat karaciğer dokusunun çok açık kahverenkli olduğu durumlar pozitif, buna karşın parazit kesiti ve karaciğer dokusunun birlikte çok açık kahverenkli olduğu durumlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3 ve 4 den de görüleceği gibi, kontrol grubundaki koyunlar tüm deneyler boyunca ve her iki testte de düşük sulandırmalarda büyük ölçüde yanlış pozitif reaksiyonlar vermiştir. Bu nedenle pozitif reaksiyonlar için, ELISA testinde 1/16, IFAT testinde ise 1/8 ve daha yüksek serum dilüsyonlarının esas alınması gerektiği ortaya çıkmıştır.

*5000 Metaserkerle Enfekte 3 Koyunun IFAT ve ELISA Testleri ile Elde Edilen Titrasyon Değerlerinin Geometrik Ortalamaları :*

Bu gruptaki koyunların IFAT testindeki titrasyon değerlerinin geometrik ortalaması sağıtım öncesinde en erken 14. günde 1/8 olarak

saptanmıştır. Bu titrasyon giderek yükselmiş ve 39. günde  $1/12$  olarak sağıtım öncesi en yüksek ortalamaya erişmiştir. 49. günde  $1/10$  olan titre, prepatent süreye kadar önemli bir değişiklik göstermeden devam etmiş, bu süre sonunda yani 108.günde  $1/10$  değeri elde edilmiştir (Tablo 1). Sağıtımı izleyen 10.günde  $1/10$  olan titre, 20, 30 ve 40. günlerde  $1/8$  olmuş ve 40. günden sonraki muayenelerde de menfi sonuçlar alınmıştır.

Aynı grubun ELISA testi ile elde edilen antikor titrelerinin geometrik ortalaması, sağıtım öncesinde en erken 18.günde  $1/16$  olmuştur. Bu titre 39.günde  $1/50$  ile en yüksek değere ulaşmıştır. 59, 70 ve 80.günlerde  $1/32$  olan titrasyon, prepatent süre sonunda yani 108. günde  $1/10$  olarak saptanmıştır (Tablo 1). Sağıtım sonrası 10.günde  $1/10$  olarak belirlenen titrasyon, daha sonraları hafif yükselmeler göstererek son muayene günü olan 60.günde  $1/16$  ile sonuçlanmıştır (Tablo 2).

Yukarda belirtilen değerler, 5000 metaserker ile yapılan enfeksiyonda, IFAT testi, sağıtım öncesinde, antikor düzeyinin çok az yükseldiğini ve güvenilir bir teşhis olanağı sağlamadığını göstermiştir. Sağıtımı izleyen 40.günden sonraki muayenelerde ise antikor titresinin  $1/8$  in altına düştüğü yani negatif sonuçların alındığı görülmüştür.

ELISA testi ise IFAT'a oranla daha yüksek dilusyonlarda pozitif reaksiyonlar vermiş olmakla beraber titrenin yüksek düzeylere ulaşmadığı, sağıtım sonrasında ise oldukça düşük düzeylerde kaldığı görülmüştür. Bu da bize bu grupta antikor düzeyinin çok fazla artmadığını ve her iki testin de teşhis için uygun olamayacaklarını göstermektedir.

#### *10.000 Metaserkerle Enfekte 3 Koyunun IFAT ve ELISA Testleri ile Elde Edilen Titrasyon Değerlerinin Geometrik Ortalamaları :*

Bu gruptaki koyunların IFAT testindeki titrasyon değerlerinin geometrik ortalaması, enfeksiyonu izleyen 14.günde  $1/12$  olarak tesbit edilmiştir. 18 ve 29.günlerde en yüksek titrasyon  $1/16$  olarak bulunmuştur. 29.günden sonra 70.güne kadar  $1/10-1/12$  arasında değişen titre, 80 ve 88.günlerde  $1/8$  ve prepatent periyod sonunda da  $1/6$  olarak saptanmıştır (Tablo 1). Sağıtım sonrası 10 ve 20.günlerde  $1/8$  titresi elde edilmiş, sonraki muayenelerde ise çok düşük titreler, yani menfi sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 2).

Aynı koyunlar ELISA testinde enfeksiyondan 18 gün sonra  $1/16$  titrede pozitif reaksiyon vermişlerdir. Daha sonra titre yükselerek



Table 1. 5000, 10.000, 15.000 P.cervi metaserkeri ile enfekte gruplarda prepatent süreye kadar saptanan antikor titreleri.

Enfeksiyon sonrası günler	5000 metaserkerle enfekte grup								10.000 metaserkerle enfekte grup								Enfeksiyon sonrası günler	15.000 metaserkerle enfekte grup									
	IFAT				ELISA				IFAT				ELISA					IFAT				ELISA					
	Koyun no.			Grubun GMRT'si	Koyun no.			Grubun GMRT'si	Koyun no.			Grubun GMRT'si	Koyun no.			Grubun GMRT'si		Koyun no.			Grubun GMRT'si	Koyun no.			Grubun GMRT'si		
	852	857	868		852	857	868		856	870	871		856	870	871			859	860	865		859	860	865			
	14	1/8	1/8	1/8	1/8	-	-	-	-	1/16	1/8	1/16	1/12	-	-	-		-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1/8	1/8	1/8	1/8	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	18	1/4	1/8	1/4	1/5	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	
29	1/16	1/8	1/8	1/10	1/32	1/32	1/64	1/40	1/16	1/16	1/16	1/16	1/64	1/64	1/32	1/50	28	1/4	1/8	1/8	1/6	1/64	1/16	1/16	1/16	1/25	
39	1/16	1/8	1/16	1/12	1/64	1/32	1/64	1/50	1/8	1/16	1/16	1/12	1/32	1/64	1/64	1/50	36	1/4	1/8	1/8	1/6	1/64	1/16	1/64	1/40		
49	1/8	1/8	1/16	1/10	1/64	1/16	1/64	1/40	1/8	1/16	1/8	1/10	1/32	1/64	1/128	1/64	46	1/16	1/16	1/16	1/16	1/64	1/16	1/32	1/32		
59	1/8	1/8	1/16	1/10	1/32	1/16	1/64	1/32	1/16	1/16	1/8	1/12	1/32	1/32	1/64	1/40	56	1/16	1/16	1/16	1/16	1/8	1/8	1/32	1/25		
70	1/8	1/8	1/16	1/10	1/32	1/16	1/64	1/32	1/16	1/16	1/4	1/10	1/32	1/32	1/64	1/40	67	1/32	1/32	1/16	1/25	1/64	1/8	1/32	1/25		
80	1/4	1/8	1/16	1/8	1/32	1/16	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/8	1/32	1/32	1/64	1/40	77	1/32	1/32	1/32	1/32	1/128	1/16	1/32	1/40		
88	1/4	1/8	1/16	1/8	1/16	1/16	1/64	1/25	1/16	1/8	1/4	1/8	1/16	1/16	1/32	1/20	88	1/16	1/16	1/16	1/16	1/128	1/32	1/32	1/50		
98	1/4	1/16	1/16	1/10	1/16	1/8	1/32	1/16	1/8	1/8	1/4	1/6	1/16	1/16	1/16	1/16	98	1/8	1/16	1/16	1/12	1/64	1/32	1/32	1/40		
108	1/8	1/16	1/8	1/10	1/8	1/8	1/16	1/10	1/8	1/8	1/4	1/6	1/32	1/16	1/8	1/16	106	1/8	1/16	1/16	1/12	1/64	1/16	1/32	1/32		

Tablo 2. 5000, 10.000 ve 15.000 P.cervi metaserkeri ile enfekte gruplarda sağıtım sonrası saptanan antikor titreleri.

Sağıtım sonrası günler	5000 metaserkerle enfekte grup								10.000 metaserkerle enfekte grup								15.000 metaserkerle enfekte grup										
	IFAT				Grubun GMRT'si	ELISA				IFAT				Grubun GMRT'si	ELISA				IFAT				Grubun GMRT'si	ELISA			
	Koyun no.			Grubun GMRT'si		Koyun no.			Grubun GMRT'si	Koyun no.			Grubun GMRT'si		Koyun no.			Grubun GMRT'si	Koyun no.			Grubun GMRT'si		Koyun no.			Grubun GMRT'si
	852	857	868		852	857	868	856		870	871	856		870	871	859	860		865	859	860		865				
10	1/8	1/16	1/8	1/10	1/8	1/8	1/16	1/10	1/8	1/8	1/8	1/8	1/64	1/16	1/8	1/20	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/8	1/8	1/32	1/16		
20	1/8	1/8	1/8	1/8	1/16	1/8	1/16	1/12	1/16	1/8	1/4	1/8	1/64	1/16	1/8	1/20	1/8	1/16	1/8	1/10	1/8	1/16	1/16	1/16	1/12		
30	1/8	1/8	1/8	1/8	1/16	1/8	1/16	1/12	1/4	1/8	1/4	1/5	1/64	1/16	1/16	1/25	1/4	1/8	1/4	1/5	1/8	1/8	1/16	1/10			
40	1/8	1/8	1/8	1/8	1/16	1/8	1/32	1/16	1/4	1/8	1/4	1/5	1/128	1/16	1/16	1/32	1/4	1/8	1/4	1/5	1/16	1/8	1/16	1/12			
50	1/4	1/4	1/8	1/5	1/16	1/16	1/32	1/20	1/2	1/16	1/8	1/6	1/64	1/32	1/16	1/32	1/4	1/4	1/4	1/4	1/32	1/8	1/16	1/16			
60	1/4	1/2	1/2	1/3	1/8	1/16	1/32	1/16	1/4	1/4	1/4	1/4	1/16	1/32	1/16	1/20	1/4	1/4	1/4	1/4	1/32	1/8	1/16	1/16			

sağıtım öncesi 49.günde  $1/64$  ile en yüksek değer elde edilmiştir. 59, 70 ve 80.günlerde ise  $1/40$  ile aynı düzeyde kalan titrasyon giderek düşmüş ve prepatent süre sonunda  $1/16$  olarak kaydedilmiştir (Tablo 1). Sağıtımdan sonra 10.günde  $1/20$  olan titrasyon 20-50.günlerde yükselmeler göstermiş ve son muayenede ise gene  $1/20$  olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Yukarıda belirtilen değerler, 10.000 metaserkerle enfekte grupta, IFAT testinde, antikor titresinin, enfeksiyonun 29.gününe kadar çok az artmakla beraber genel olarak düşük düzeylerde kaldığını ve 98. ve 108.günlerde ise negatif sayılabilecek kadar düştüğünü bu nedenlerle teşhisde başarılı olmadığını göstermektedir. Sağıtım sonrası ise antikor titresinin 20.günden başlayarak teşhis için yeterli olmayacak düzeylerde olduğu, yani  $1/8$  in altına düştüğü görülmektedir.

ELISA testinde ise sağıtımdan önce 29-80.günler arasında titrenin nisbeten yüksek olduğu ancak gene de titrenin  $1/64$  den daha yüksek değerlere ulaşmadığı görülmüştür. Sağıtım sonrası ise, sağıtım öncesine oranla daha düşük düzeylerde antikor saptanabilmiş, fakat tamamen negatif sonuçlar alınmamıştır. Bu değerlendirmeler, ELISA testinin IFAT'a oranla daha yüksek bir hassasiyeti olduğunu, ancak her iki testte de titrelerin çok yüksek düzeylere erişmediğini bu nedenlerle teşhisde pratik değerleri olmadıklarını göstermektedir.

*15.000 Metaserkerle Enfekte Edilen 3 Koyunun IFAT ve ELISA Testleri ile Elde Edilen Titrasyon Değerlerinin Geometrik Ortalamaları :*

15.000 P.cervi metaserkeri ile enfekte edilen bu gruptaki koyunlarda, IFAT testi ile elde edilen titrasyon değerlerinin geometrik ortalaması, enfeksiyonu izleyen 18.günde  $1/5$  olmuştur. Daha sonra, titre gidercek yükselmiş ve 80.günde  $1/32$  ile en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu düzey, prepatent süre sonuna kadar düşmeler göstermiş, sağıtım öncesi son muayene gününde ise  $1/12$  olmuştur (Tablo 1). Sağıtımdan sonra 10.günde  $1/16$  olan titrasyon, 20.günde  $1/10$  olmuştur. Bu muayeneden sonraki testlerde antikor titreleri çok düşük düzeylerde bulunmuştur (Tablo 2).

Aynı grupta ELISA testi, enfeksiyondan 18 gün sonra  $1/16$  titrede pozitif reaksiyonlar vermiştir. 18-108.günler arasındaki diğer muayenelerde titrelerde bazı iniş çıkışlar gözlenmiş, ancak bu grupta 39.günde  $1/40$  ve 88.günde  $1/50$  olarak en yüksek antikor titreleri elde edilmiştir (Tablo 1). Sağıtımdan sonra, sağıtım öncesine oranla oldukça düşük antikor titreleri saptanmış, son muayene günü olan 6. günde bu titre  $1/16$  olarak kaydedilmiştir (Tablo 2).

Yukarıda belirtilen değerler, 15.000 metaserkerle enfekte bu grupta, IFAT testinde, antikor titresinin ancak 46.günden itibaren yükseldiğini ve diğer gruplara oranla bu grupta daha yüksek bir titrasyon görüldüğünü belirtmektedir. Bununla beraber bu grupta da genel olarak antikor düzeyi çok yüksek olmamıştır. Sağıtım sonrasında ise 20.günden sonra negatif sayılabilecek yani teşhis için yeterli olmayan değerler elde edilmiştir.

ELISA testi ise IFAT'a oranla daha yüksek titreler vermiş olmakla beraber gencde fazla güvenilir bir teşhis olanağı sağlayacak sonuçlar elde edilememiştir. Sağıtımdan sonra ise, sağıtım öncesine oranla daha düşük antikor titreleri bulunmuş ve bunlar hep 1/16 veya daha düşük düzeylerde kalmıştır.

Genel olarak değişik sayıda metaserkerler ile enfekte 3 grupta da antikor düzeyleri yönünden önemli farklılıklar görülmemiştir. Ayrıca, özellikle IFAT olmak üzere her iki testte de antikor titreleri dar sınırlar içinde kalmıştır. Sağıtım sonraları ise bu antikor titrelerinin sağıtım öncesine oranla daha düşük bulunmuş olması, parazitlerin konakçı dışına atılmasının antikor titrelerini etkileyerek düşürdüğünü göstermektedir.

Sonuç olarak, her iki testin de Paramphistomum cervi enfeksiyonlarının teşhisinde güvenilir ve pratik metodlar olmadıkları kanısına varılmıştır.

### Tartışma

IFAT ve ELISA tekniklerinin çeşitli helmint enfeksiyonları üzerinde uygulayan çeşitli araştırmacılar, bu enfeksiyonların en erken IFAT ile 7-28 günde, ELISA ile ise 14-35 günde, genellikle 2.haftadan itibaren tanılarının yapılabileceğini bildirmişlerdir (1, 4, 6, 8, 10, 11, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24). Buna benzer şekilde bizim araştırmamızda da en erken IFAT tekniği ile enfeksiyondan 14, ELISA tekniği ile 18 gün sonra antikorlar saptanabilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar (21, 23, 24), Fasciola gigantica, F.hepatica ve Toxocara canis ile farklı dozlarda enfekte hayvanlar üzerine uyguladıkları her iki testte de, antikor oluşumu ile enfektif doz arasında bir ilişkinin bulunmadığını ve farklılıklar göstermediğini belirtmişlerdir. Bu araştırmada da her iki testte de 5,10 ve 15.000 metaserkerle enfekte gruplar arasında gerek erken teşhis ve gerekse antikor düzeyi

yönünden önemli farklılıklar olmadığı belirlenmiştir. Ancak 15.000 metaserker ile enfekte gruptaki hayvanlar IFAT testinde, prepatent süre boyunca diğer gruplara oranla biraz daha yüksek bir antikor düzeyi göstermişler, buna karşın aynı grubun ELISA değerleri ile diğer gruplar arasında önemli farklılıklar belirlenmemiştir.

Tınar (24), IFAT tekniği ile *F.gigantica*'lı koyunların sağıtılmasından sonra antikor düzeyindeki değişiklikleri araştırmıştır. Araştırmacı sağıtım sonrası antikor düzeyinde düşme görülerek 150.günden itibaren negatif sonuçlar aldığını bildirmiştir. Oğuz ve arkadaşları (21), *F.hepatica* ile yaptıkları çalışmada sağıtımı izleyen 14.haftadan itibaren IFAT ve 18.haftadan itibaren de ELISA testi ile negatif reaksiyonların görüldüğünü belirtmektedirler. Biz *P.cervi* ile enfekte koyunların sağıtılmasından sonra kanlarında antikor düzeyinde oluşan değişimleri incelediğimizde, antikor düzeyinin her iki testte de, sağıtım öncesi periyoduna oranla düşük düzeylerde olduğunu gördük. ELISA testinde her üç grupta da son muayenelerde düşük düzeylerde de olsa müsbet reaksiyonlar görülmüştür. Ancak IFAT testinde 5000 metaserkerle enfekte grupta 40.günden, 10.000 metaserkerle enfekte grupta 20.günden ve 15.000 metaserkerle enfekte grupta da gene 20.günden sonra negatif sayılabilecek sonuçlar alınmıştır.

*P.cervi* ile enfekte koyunlarda ELISA ya da IFAT teknikleri kullanılarak yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Paramphistomidae familyasına bağlı türlerden olan *Cotylophoron cotylophorum*'la deneysel ve doğal enfekte koyunlar üzerinde serolojik çalışmalar yapan Nath (20), antijen olarak parazitlerin alkol veya tuzlu sudaki ekstraktlarını kullanarak uyguladığı intradermal testlerde çabuk ya da geç tip reaksiyonların görülmediğini bildirmiştir. Horak (13), sığır ve koyunlardaki *P.microbothrium*, *P.ichikawai*, *Cotylophoron cotylophorum* ve *Calicophoron calicophorum* enfeksiyonlarında olgun parazitleri veya ekstraktlarını antijen olarak kullanarak; intradermal allerjik, kompleman birleşmesi ve canlı parazit etrafında serum precipitatları testlerini uygulamış ve bu testlerden hiç birinin koyunlarda paramphistomiasis'in teşhisine yardımcı ve pratik metodlar olmadığını belirtmiştir. Yapılan bu araştırmada ise her ne kadar antikor saptanabilmiş ise de, kontrol hayvanlarında düşük sulandırılmalarda yüksek oranda yanlış pozitif reaksiyonlar görülmesi ve genel olarak antikor titrelerinin yüksek düzeylerde olmaması (özellikle IFAT'ta) nedenleriyle her iki testin de *P.cervi* enfeksiyonlarının teşhisinde hassas ve güvenilir teşhis metodları olmadıkları kanısına varılmıştır.

Tablo 3. Kontrol grubu hayvanlarının deneyler süresince gösterdikleri antikor titreleri.

Enfeksiyon sonrası günler	Kontrol grubu					
	IFAT			ELISA		
	Koyun no.			Koyun no		
	867	869	872	867	869	872
14	1/4	-	-	-	-	-
18	1/2	1/2	1/2	1/4	-	1/4
29	-	1/2	1/2	1/8	1/2	1/4
39	1/4	1/2	1/4	1/16	1/8	1/4
19	1/2	1/4	1/4	1/8	1/2	1/4
59	1/4	1/2	1/4	1/4	1/4	1/8
70	1/4	1/2	-	1/16	1/8	1/2
80	-	1/4	1/4	1/4	1/8	1/4
88	1/4	-	1/2	1/4	1/4	1/2
98	1/4	1/8	1/2	1/8	1/2	1/2
108	-	-	1/2	-	1/2	1/8
Sağıtım sonrası.						
10	1/2	1/4	-	1/4	1/2	1/8
20	1/4	1/4	1/2	1/8	1/4	1/8
30	1/4	-	1/4	1/8	1/16	1/8
40	1/4	1/4	1/2	1/4	1/4	1/4
50	1/8	1/2	1/4	1/4	1/4	1/4
60	1/4	1/2	1/4	1/2	1/2	1/4

Tablo 4. Kontrol grubu hayvanlarında deneyler süresince saptanan yanlış pozitif reaksiyonlar (% olarak).

Serum Sul.	IFAT	ELISA
1/2	80.3	90.1
1/4	49.0	70.5
1/8	3.9	31.3
1/16	-	5.8

## Literatür

- 1- **Albert, H. und F.Hörchner** (1978): *Zur Bekämpfung und Diagnostik der Rinderfinnen. II. Serologische Untersuchungen mit dem ELISA.* Berl. Münch. tierärztl.Wschr., 92, 189-193.
- 2- **Altaif, K.I, S.N. Al-Abbassy, I.M. Al-Saqur and A.K.Jawad** (1978): *Experimental studies on the suitability of aquatic snails as intermediate hosts for Paramphistomum cervi in Iraq.* Ann.trop.Med. Parasit., 72, 151-155.
- 3- **Arru, E. and P.Muzzetto** (1969): *Infestione sperimentale degli ovini con esemplari immaturi di Paramphistomum cervi.* Atti Soc. ital. Sci vet., 23, 913.
- 4- **Burden, D.J. and N.C. Hammet** (1978): *Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to Fasciola hepatica in cattle.* Vet.Rec., 103, 158.
- 5- **Burgu, A.** (1980): *Eskişehir Çifteler Harası yöresinde koyunlarda Paramphistomum cervi Schrank, 1790'nun biolojisi üzerinde çalışmalar.* Habiltasyon tezi (yayınlanmadı).
- 6- **Calamel, M.** (1977): *The technique of indirect immunofluorescence applied to the epidemiological study of dicrocoeliasis.* Recl.Méd. vét. Ec. Alfort., 153, 343-348 (Ref: Helminth.Abst., 1978, 47, 1632).
- 7- **Cameron, T.D. and W.M. Thomas** (1934): *The internal parasites of domestic animals.* A. and C. Black Ltd., London.
- 8- **Denev, İ. and M.Kolev** (1975): *Fluorescence microscopy in the diagnosis of Dictyocaulus infections in lambs.* Veterinarnomed. Nauki, Sof., 12, 97-100 (Ref: Helminth.Abst., 1976, 45, 723).
- 9- **Dinnik, J.A.** (1951): *An intermediate host of the common stomach fluke, Paramphistomum cervi (Schrank), in Kenya.* E.Afr. agric. J., 26, 124-125.
- 10- **Flentje, B., Buchwalder and T.Hiepe** (1978): *Diagnosis of bovine cysticerciasis by means of the immunofluorescent antibody technique.* Arch.exp. Vet. Med., 32, 205-212 (Ref: Helminth. Abst., 1979, 48, 2863).
- 11- **Cathuma, J.M., A.E. Sollod and P.G. Waiyaki** (1978): *Evaluation of the indirect fluorescent antibody test in diagnosis of Cysticercus bovis infection in cattle.* Kenya vet., 2, 7-11.

- 12- **Güralp, N.** (1974): *Helmintoloji*. Vet.Fak.Yayın. Ankara Üniv., 307.
- 13- **Horak, I.G.** (1971): *Paramphistomiasis of domestic ruminants*. Adv. Parasit., 9, 33-72.
- 14- **Kamburov, P.** (1976): *On the species of paramphistomids occuring in Europe*. Third Int. Symposium, Kosice, Theses of reports.
- 15- **Katiyar, R.D. and T.R. Varshney** (1963): *Amphistomiasis in sheep and goats in Uttar Pradesh*. Indian J.vet.Sci., 33, 94-98.
- 16- **Koch, H.W.** (1969): *Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Haemagglutination, Flocculation, Mikro-Agar-Präzipitation und der Immunofluoreszenz zum frühzeitigen Nachweis der Fasciolose des Rindes*. Diss. Berlin.
- 17- **Komarov, YU.B.** (1977): *The diagnostic efficacy of the immunofluorescence reaction during experimental Cysticercus bovis infection in calves*. Helminth.Abst., 46, 1607.
- 18- **Kraneburg, W.** (1977): *Beiträge zur Biologie und Pathogenität des einheimischen Pansenegels Paramphistomum cervi*. 1. *Entwicklungsstadien in der Aussenwelt und im Zwischenwirt*. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 90, 316-320.
- 19- **Movsesijan, M., D.Sorojevic** (1970): *Primena fluorescentne mikroskopije u dijagnozi nekih parazitnih infekcija ovaca*. Vet. Glasn., 12, 1019-1022.
- 20- **Nath, Dj** (1972): *Observation on allergic skin test for diagnosis of immature-amphistomiasis disease in sheep*. Drissa Vet.J., 7, 30 (Ref: Helminth. Abst., 1973, 42, 3696).
- 21- **Oğuz, T., R.Tınar, A.Burgu ve M.Alabay** (1978): *Deneyssel olarak enfekte edilen koyunlarda Fasciola hepatica'nın immunoperoksidaz ve immunofloresan teknikleri ile mukayeseli teşhisleri*. Vet.Fak.Derg. Ankara Üniv., 15, 537-553.
- 22- **Ruitenber, E.J., P.A.Steeranberg, B.J.M.Brosi and J. Buys** (1974): *Serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays*. Bull.Wld Hlth Org., 51, 108-109.
- 23- **Ruitenber, E.J. and J.Buys** (1976): *An immunofluorescence technique for the detection of Toxocara canis antibodies*. Vet. parasit., 1, 231-237 (Ref: Helminth. Abst., 1976, 45, 6255).



- 24- **Tınar, R.** (1976): *Floresan antikor tekniği ile koyunlarda Fasciola gigantica'nın erken teşhisi üzerinde araştırmalar.* Vet.Fak. Yayın. Ankara Üniv., 328.
- 25- **Willmott, S.** (1950): *On the species of Paramphistomum Fiscoeder, 1901 occuring in Britain and Ireland with notes on some material from the Netherlands and France.* J.Helminth., 24, 155-170.
- 26- **Zajicek, D., M.Marova, W.Zahradnikova and B.Rysavy** (1977): *Experimental paramphistomiasis of lambs.* Vet. Med., Praha., 22, 99-108.

*Yazı 22 Ekim 1981 günü alınmıştır.*