

FASCIOLIASIS TANISINDA ERİŞKİN ANTİJENİ İLE PBS VE RPMİ 1640'DA ELDE EDİLEN EKSKRESYON/SEKRESYON ANTİJENLERİNİN ELISA YÖNTEMİYLE KARŞILAŞTIRILMASI**Ayşegül TAYLAN ÖZKAN¹**
Hasan AYÇİÇEK²**Metin KORKMAZ¹**
Mehmet TANYÜKSEL²**Aydinten KUMAN¹****ÖZET**

İnsanda fascioliasis hepaticanın akut döneminde spesifik tanı koydurucu, kronik anjiokolit döneminde ise tanıyı destekleyici ve doğrulayıcı olarak serolojik tanı yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Çalışmada *Fasciola* enfeksiyonunun tanısında parazitin erişkin antijeni ile PBS ve RPMİ-1640'da elde edilen ekskresyon/ sekresyon (ES) antijenleri karşılaştırılmış kesin ve şüpheli *Fasciola* olgularının yanısıra toxocariasis, schistosomiasis, ascariasis, echinococcosis ve sağlıklı yetişkinlerden elde edilen serumlar çapraz reaksiyonlar açısından incelenmiştir. Kesin fascioliasis olduğu bilinen olgularda testin duyarlılığı her üç antijenle de %100 olarak bulunmuştur. Testin özgüllüğü ise erişkin antijeni ile %90.6, PBS-ES ve RPMİ-ES ile %95.3 olarak saptanmıştır. Varyans analizi ile antijenler arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$). Her üç antijenle de hazırlanan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yönteminden insan fascioliasis olgularının tanısında yararlanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Fasciola spp.* tanı, seroloji, ELISA

COMPARISON OF SOMATIC AND EXCRETION/SECRETION ANTIGENS OBTAINED IN PBS AND RPMİ 1640 BY ELISA METHOD FOR THE SERODIAGNOSIS OF FASCIOLIASIS**SUMMARY**

Serodiagnosis of fascioliasis hepatica in humans is used for the diagnosis during the acute phase of the disease and a supporting and confirming method for the diagnosis during the chronic phase. Somatic antigens of *Fasciola spp.* and antigens obtained from the excretions/secretions (ES) of the parasite, extracted in RPMİ 1640 medium and PBS were compared by ELISA for the diagnosis of this infection. Sera from patients with confirmed or suspected infection with *Fasciola* as well as sera from patients infested with toxocariasis, schistosomiasis, ascariasis, echinococcosis and from healthy individuals were compared for evaluation of cross-reactivity. The sensitivity of the tests in patients with confirmed fascioliasis was 100% for all three antigens and extraction modalities used. The specificity of the somatic antigens was 90.6%, while those of PBS-ES and RPMİ-ES were 95.3%. Using variance analysis, no significant difference was found among the three antigens ($p>0.05$). It appears that all three antigens could be used in the serodiagnosis of human fascioliasis.

Key Words: *Fasciola hepatica*, diagnosis, serology, ELISA

GİRİŞ

Ülkemizde koyun ve sığırlarda *Fasciola hepatica* olgularına oldukça sık rastlanmakta (1-3) ve bu parazitin ara konağı olan *Lymnaea truncatula* her yörede bulunmaktadır (4). Buna

karşın, Ülkemizde insan fascioliasis olgularına oldukça nadir rastlandığı ve bildirilen olguların büyük bir çoğunluğunun operasyon sırasında saptandığı belirtilmiştir (5-14).

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İZMİR

²Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, ANKARA

Yazışma adresi: Dr.Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Parazitoloji Lab., 06100, Sıhhiye-ANKARA
Tel: +90 312 458 21 69 e-posta: aysegul.taylanozkan@saglik.gov.tr

Fascioliasisde çoğunlukla tipik tanı koydurucu bulgular olmaması nedeniyle, klinik olarak olgularının saptanması güç olabilir. Bu nedenle günümüzde, bu hastalığın tanısında seroloji temel yöntem olarak değerlendirilmektedir. Avrupa ülkelerinden Fransa'da çok fazla olgu bildirilmesinin serolojik testlerin yaygın olarak kullanılmasına bağlı olduğu, insan olguları coğrafi dağılımının hastalıklı hayvan sayısı ile paralel olduğu belirtilmiştir (15 - 17). Dışkıda yumurtaların görülmediği ıvegen dönemde serolojik yöntemler kullanılarak tanıya gidilebileceği ve özellikle ekstresyon/sekresyon (ES) antijenlerle hazırlanmış olan ELISA yönteminin hızlı, duyarlı (%98-100) ve özgül (%93) olduğu bildirilmiştir (18-20).

Ülkemizde hayvanlarda bu hastalığa oldukça yüksek oranlarda rastlanması ve arakonağının bulunması yanı sıra, hastalığın bulaşımında önemli rol oynayan su bitkilerini yeme alışkanlığının halk arasında yaygınlığı, fascioliasisin bildirilen sayıdan daha fazla olabileceğini düşündürmektedir. Araştırmamızda *Fasciola spp.* ES ve erişkin antijenleri ELISA yöntemi kullanılarak, saptanamayan fascioliasis olgularının tanısına yardımcı olunması, bu hastalığa hekim ve araştırmacıların dikkatinin çekilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Örneklerin Toplanması ve Seçimi :

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarına ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalına başvuran 22 fascioliasis kuşkulu olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Bu 22 olgunun 11'inde dışkı ve duedonal tubaj materyalinde yumurta saptanarak veya biyopsi materyali patolojik kesitlerinde erişkin görülerek *F.hepatica* varlığı kanıtlanmıştır. Diğer 11'i ise klinik ve radyolojik olarak şüphelenilen ancak fascioliasis varlığı daha önceden kanıtlanmamış olgulardan oluşmaktadır.

Sağlıklı, parazitolojik hiçbir yakınması olmayan 29 olgu ve daha önce paraziter bir hastalık saptan 35 olgu da (schistosomosisli 5,

toxocariasisli 10, kist hidatikli 10 ve ascariasisli 10 hasta) çapraz reaksiyonları değerlendirebilmek için kontrol grubu olarak alınmıştır.

Toplam 86 olgudan 5 ml düz kan alınarak serumları ayrılmış ve kullanılıncaya kadar -60°C'de saklanmıştır.

2. Antijenlerin Elde Edilmesi :

a) Erişkin antijenin elde edilmesi : Mezbahada yeni kesilmiş koyun karaciğeri safra kanallarından erişkin *Fasciola spp.* canlı olarak çıkarılıp serum fizyolojik bulunan petri kutusuna alınmış, oda ısısında iki üç saat bekletildikten sonra serum fizyolojik ile 9-10 kez yıkanmış ve -20°C de dondurulmuştur. Dondurulmuş 10 adet erişkin *Fasciola spp.* 50 ml 0.01 M PBS (Fosfat Tampon Solusyonu) (pH 7.0) solusyonu içerisine alınmış ve doku homojenizatörü (Ultra-tutrex t25 Janke & Kunkel IKA labortechnik, Germany) yardımıyla 15 dakika homojenize edilmiştir. Önce 5000 devir/dakika bir saat, daha sonra da 14000 devir/dakika'da 30 dakika santrifüje edildikten sonra, üst sıvı 0.2 mm filtreden (MFS, katalog no.25 CS020AS) geçirilmiştir (21-23). Elde edilen protein miktarı, erişkin antijen için 1.57 mg/ml olarak bulunmuş, kullanılıncaya kadar -60°C'de saklanmıştır.

b) ES antijeninin elde edilmesi : Mezbahada yeni kesilmiş koyun karaciğeri safra kanallarından erişkin *Fasciola spp.*'ler canlı olarak çıkarılmış, petri kutusuna alınarak serum fizyolojik ile 9-10 kez yıkanmıştır. Erişkin *Fasciola spp.* ler *in vitro* canlılıklarının devam ettirilmesi amacıyla 10'ar erişkin 50 ml RPMİ 1640 (RPMİ) veya 50 ml PBS içine bırakılmıştır. Bu ortamlar, 24 saat içerisinde ayrı ayrı toplanıp önce 5000 devir/dakika bir saat, daha sonra da 14000 rpm'de 30 dakika santrifüje edilmiştir. Alınan üst sıvı 0.2 mm filtreden (MFS, katalog no. 25 CS020AS) geçirilmiş, elde edilen protein miktarı PBS içinde elde edilen ES (PBS-ES) için 0.44 mg/ml olarak ölçülmüştür. RPMİ 1640 ortamında elde edilen ES antijeni moleküler ağırlığı 12 KD ve üzeri proteinleri tuttuğu belirtilen selüloz membran (Sigma, 0-9527) ile diyaliz edilmiş ve RPMİ 1640'da elde edilen ES (RPMİ-ES) antijen diyaliz öncesi 1.46 mg/ml, diyaliz sonrası ise 0.55 mg/ml

olarak hesaplanmıştır (19,24,25). Elde edilen antijenler kullanılıncaya kadar -60°C'de saklanmıştır.

3. ELISA Yönteminin Uygulanması :

Pozitif ve negatif kontroller ile yapılan titrasyon değerlendirmelerinde alınan sonuçlar ışığında; ELISA plakları 100 ml 0.1 M carbonatte buffer ile RPMI-ES antijeni için 275 mg/ml, PBS-ES antijeni için 220 mg/ml, erişkin antijen için de 393 mg/ml olacak şekilde sulandırılmış, 4°C 'de bir gece bekletilerek kaplanan plaklar, PBS-Tween 20 (PBS-T) ile 6'şar kez yıkanmış, hemen kullanılmayan plaklar 4°C'de 3 haftayı geçmeyecek şekilde saklanmıştır.

%2 'lik sığır serum albumini ile 30 dakika blokla işlemi yapılan plaklar süre sonunda PBS-T solüsyonu ile 6 kez yıkanmıştır. İkinci aşamada; pozitif ve negatif kontrol serumlar ve test edilecek serum örnekleri 1/100 oranında PBS-T ile sulandırılmış ve her test örneği için 2 çukur olmak üzere her çukura 100 ml olacak şekilde konulmuş, 37°C 'de 60 dakika inkübasyon için bekletilmiştir. PBS-T solüsyonu ile yıkanan çukurlara daha önce 1/5000 sulandırımında çalıştığı belirlenen alkalen fosfataz işaretli anti-insan IgG konjuge (Sigma), PBS-T ile sulandırımı yapıldıktan sonra her çukura 100 ml olacak şekilde konmuştur. 37°C'lik etüvde 60 dakika bekletilen plaklar, süre sonunda PBS-T solüsyonu ile 6 kez yıkanmıştır. Çukurlara taze olarak hazırlanan pNPP substrattan (Sigma) 100 ml ilave edilerek, 30 dakika karanlıkta oda ısısında

bekletilmiştir. 2 M NaOH ile durdurulan reaksiyonun değerlendirilmesinde Organon Teknika Microwellsystem Reader 230S spektrofotometresi kullanılmış, çalışmaya alınan olguların serumlarındaki antikor düzeylerinin optik dansite (OD) değerleri 405 nm dalga boyunda okunmuştur.

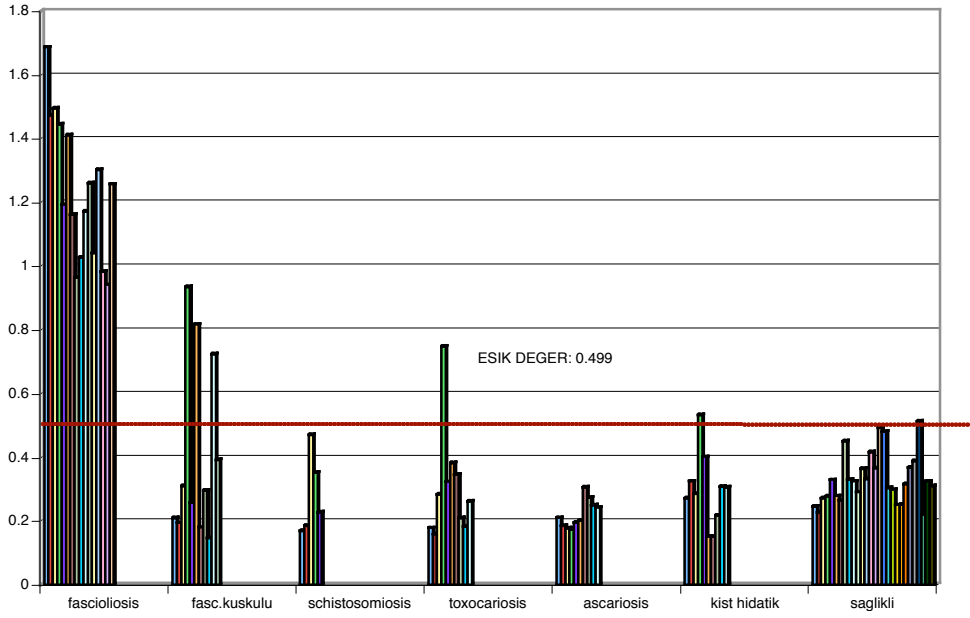
Herhangi bir paraziter yakınması olmayan 26 olgunun standart sapma (SD) sonuçları hesaplanmış ve PBS-ES için SD: 0.083, RPMI-ES için SD: 0.112, erişkin için de SD: 0.075 olarak bulunmuştur. Eşik değerler ise (Negatif OD ortalama + 2 SD = eşik değeri) formülüne göre PBS-ES için 0.499; RPMI-ES için 0.530; erişkin için 0.475 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin üstündeki OD düzeyleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

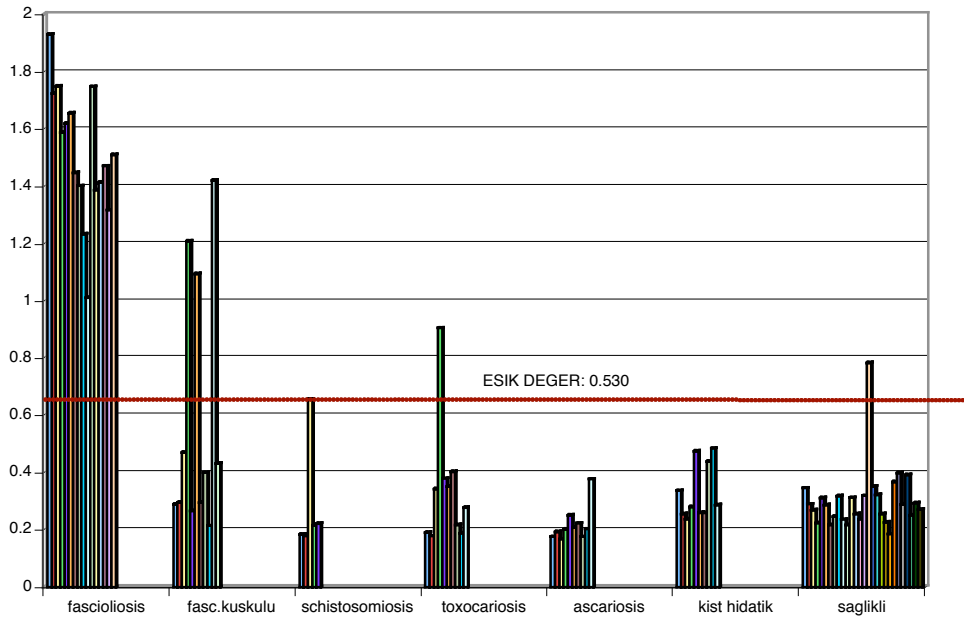
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalına başvuran hastalar arasında, patolojik kesitlerinde *F.hepatica* görülerek, duodenal tubaj materyalinde veya dışkıında yumurta saptanarak fascioliasis hepatica varlığı daha önceden kanıtlanmış 11 olgunun tümü (%100) erişkin, PBS-ES ve RPMI-ES yöntemleri ile pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 1). Varlığı kesin kanıtlanmayıp klinik olarak kuşkulu 11 olgunun üçü de (%27) de erişkin, PBS-ES ve RPMI-ES antijenleri ile hazırlanan her üç ELISA yöntemi de pozitif olarak bulunmuştur (Şekil 1-3).

Tablo 1. Çalışma ve kontrol grubu serumlarında IHA ve ELISA yöntemleri ile alınan sonuçların değerlendirilmesi

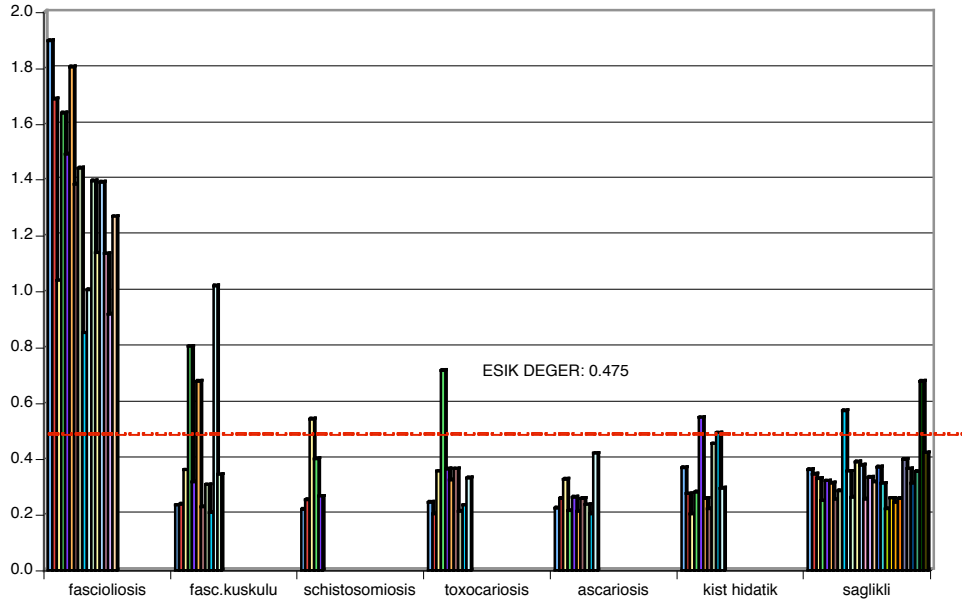
Çalışma ve kontrol grubu serumları	Toplam	PBS-ES		RPMI-ES		Erişkin	
		pozitif	negatif	pozitif	negatif	pozitif	negatif
Fascioliasis	11	11 %100	0	11 %100	0	11 %100	0
Fascioliasis kuşkulu	11	3 %27	8 %73	3 %27	8 %73	3 %27	8 %73
Schistosomiasis	5	0	5 %100	1 %20	4 %80	1 %20	4 %80
Toxocariasis	10	1 %10	9 %90	1 %10	9 %90	1 %10	9 %90
Ascariasis	10	0	10 %100	0	10 %100	0	10 %100
Kist hidatik	10	1 %10	9 %90	0	10 %100	2 %20	8 %80
Sağlıklı erişkin	29	1 %3	28 %97	1 %3	28 %97	2 %7	27 %93
TOPLAM	86	17 %20	69 %80	17 %20	69 %80	20 %23	66 %77



Şekil 1. Tüm olgu gruplarında elde edilen PBS-ES ELISA OD değerleri



Şekil 2. Tüm olgu gruplarında elde edilen RPMI-ES ELISA OD değerleri



Şekil 3. Tüm olgu gruplarında elde edilen erişkin-ES ELISA OD değerleri

Kontrol grubu olarak alınan hiç bir paraziter yakınması olmayan sağlıklı erişkin grubundaki 29 olgudan erişkin antijen ile hazırlanan ELISA (erişkin-ELISA) yönteminde iki olguda (%7), PBS-ES ELISA, RPMI-ES antijenleri ile hazırlanan ELISA yöntemleriyle birer olguda (%3) pozitif yanıt saptanmıştır (Şekil 1-3).

Diğer parazitler enfeksiyonlarla çapraz reaksiyon araştırılmasında; schistosomiasis'li olgularda erişkin antijen ve RPMI-ES antijeni ile hazırlanan ELISA yönteminde bir olguda (%20) pozitiflik bulunurken, PBS-ES antijeni ile hazırlanan ELISA yönteminde hiçbir serumda pozitiflik gözlenmemiştir (Şekil 1-3). Toxocariasis'li olgularda her üç antijenle hazırlanan ELISA yönteminde birer olgu (%10) pozitif saptanırken, ascariasis olgularında pozitiflik gözlenmemiştir. Kist hidatikli olgularda erişkin-ELISA yöntemiyle iki olgu (%20), PBS-ES'li ELISA yönteminde bir olgu (%10) pozitif bulunmuş olup, RPMI-ES ELISA yöntemiyle pozitiflik saptanamamıştır. Kontrol grubu olarak alınan sağlıklı erişkin ve diğer parazitlerle enfekte hasta gruplarından

alınan serumlarda ELISA yöntemleriyle saptanan OD değerlerinin fascioliasis hepatica olduğu kesin olarak kanıtlanmış hastalardan elde edilen OD değerlerine göre daha düşük olduğu görülmüştür.

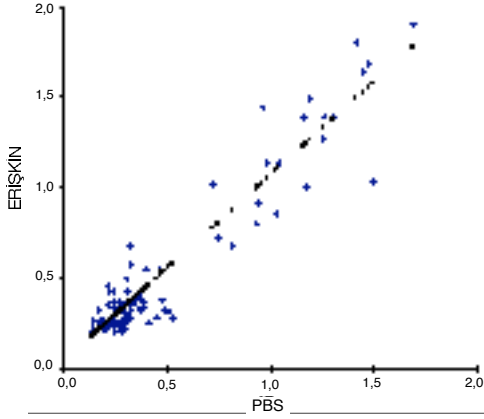
Erişkin-ELISA, PBS-ES ELISA ve RPMI-ES ELISA yöntemlerinin duyarlılığının %100 olduğu, özgüllüğün ise erişkin-ELISA'da %90.6, PBS-ES ve RPMI-ES antijenli ELISA'ların her ikisinde %95.3 olduğu bulunmuştur.

Regresyon analizi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede de, PBS-ES ELISA ile erişkin-ELISA yöntemleri arasında %89.54 ($r=0.9462$, $p<0.0001$) (Şekil 4); RPMI-ES ELISA ile erişkin ELISA yöntemleri arasında %90.57 ($r=0.9517$, $p<0.0001$) (Şekil 5); PBS-ES ELISA ile RPMI-ES ELISA yöntemleri arasında %92.69 ($r=0.9627$, $p<0.0001$) oranlarında istatistiksel olarak anlamlı benzerlik olduğu bulunmuştur (Şekil 6).

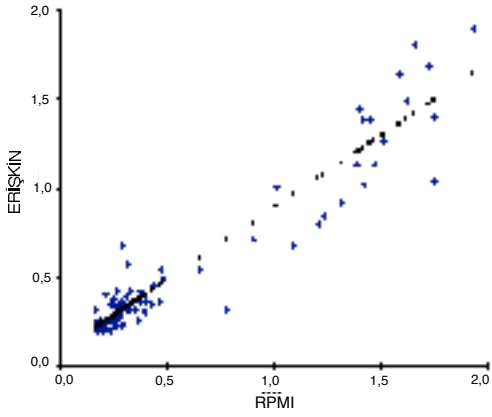
Varyans analizi ile her üç yöntem arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$).

Genel toplamda ise 86 olgu serumundan Erişkin ELISA yöntemi ile 20'si (%23), PBS-ES

ve RPMI-ES ELISA yöntemleri ile de 17 'şer olgu (%20) fascioliasis hepatica yönünden pozitif bulunmuşlardır.



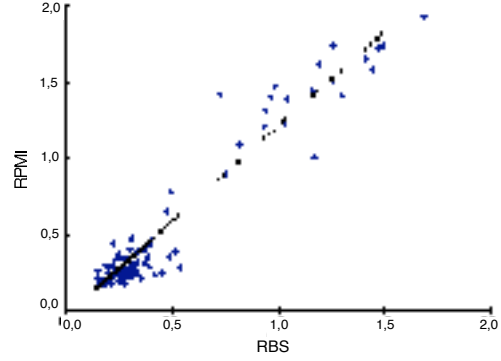
Şekil 4. Erişkin ELISA ve PBS-ES ELISA regresyon grafiği



Şekil 5. Erişkin ELISA ve RPMI-ES ELISA regresyon grafiği

TARTIŞMA

İnsanlarda fascioliasis tanısı genel olarak dışkıda yumurtaların saptanmasına dayanmaktadır. Ancak, bu yöntemlerde duyarlılığının düşük olduğu, ıvegen dönemde yumurtaların ancak 6-8 haftada görülebileceği, süregen olgularda da tekrarlayan dışkı bakılarına rağmen yumurtaların saptanamayabileceği bildirilmiştir



Şekil 6. RPMI-ES ELISA ve PBS-ES ELISA regresyon grafiği

(18,26). Kesin fascioliasis olduğu tesbit edilen insan olgularının ELISA yönteminde de seropozitif bulunması yanı sıra, önce seropozitif olduğu saptanan olguların da bir süre sonra dışkısında, duedonum aspirasyonu sıvısında, balgamında parazit yumurtalarına ya da ektopik bir kaynaktan parazitin kendisine rastlanıldığı bildirilmiştir (19,27-31).

İnsanlarda kanıtlanmış fascioliasis olgularında uygulanan ELISA yöntemlerinde saptanan pozitif sonuçlara uyumlu olarak, çalışmamıza aldığımız 11 fascioliasis olgusunda da PBS-ES, RPMI-ES, erişkin antijenleri ile hazırlanan üç ayrı ELISA yönteminde de pozitif sonuç alınmış, bu olgularda alınan OD değerlerinin eşik değerlerin yaklaşık iki katının üzerinde olduğu gözlenmiştir.

ES antijeni ile hazırlanan ELISA yöntemleri, ıvegen ve süregen fascioliasis tanısında kullanılmakta, duyarlı ve özgül bulunmaktadır (25). Hillyer ve ark. (32) tarafından, fascioliasis hepaticanın endemik olduğu Bolivya'da insanlarda bu enfeksiyonun dışkı bakısı ile %27, serumda EITB (Enzyme-linked immunotransfer blotting) yöntemi ile %42, FAST-ELISA (Fast Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile de %53 olarak saptandığı belirtilmiştir. Stark ve ark. (33), yüksek ateş, karın ağrısı şikayetiyle gelen bir kadın hastanın dışkı bakılarında *F.hepatica* yumurtalarına rastlanmamasına karşın, ES ELISA ile pozitif bulunduğu, Western blot yöntemiyle hastalık

tanısının onaylandığını bildirilmişlerdir. Price ve ark. (17), Amerika'da ağrı, ateş, kilo kaybı şikayetiyle başvuran iki olgudan yalnızca birisinde yumurtaya rastlarken, ES-ELISA yöntemiyle her iki olgunun da pozitif bulunduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda klinik olarak fascioliasis kuşkulu (karın ağrısı, ateş, hepatomegali, eozinofili klinik bulguları olup, yumurta saptanamayan) 11 olgudan üçünde PBS-ES, RPMI-ES ve erişkin antijenleri ile hazırlanan üç ayrı ELISA yöntemiyle pozitif sonuçlar bulunmuştur. Dışkıında, duedonal tubaj materyalinde yumurtalar saptanarak, patolojik kesitlerde erişkinleri görülerek kanıtlanmış 11 olgumuzda her üç ELISA yöntemiyle de pozitif sonuçlar almamız, Hillyer ve ark. (32), Stark ve ark. (33), Price ve ark. (17) yayınlarında dışkıında yumurta rastlanmadığı halde bazı olgularda serolojik yöntemlerle tanıya gidildiğini belirtmeleri, kuşkulu olgulardan üçünde de ELISA yöntemlerinin paralel pozitif sonuçlar vermesi, bu üç olgunun büyük olasılıkla fascioliasis olduğu kanısını vermiştir.

Farklı ELISA yöntemleri ile hayvanlarda yapılan serolojik araştırmalarda schistosomiasisli olgularla çapraz reaksiyon gözleendiği bildirilmiştir (25, 27). Espino ve ark. (19), *F.hepatica* ES-ELISA yöntemiyle 20 fascioliasisli olgunun hepsinin pozitif bulunduğunu, schistosomiasis, ascariasis, trichuriasis, filariasis, clonorchiosis, amebiasis, necatoriosisli hastalar ve sağlıklı kontrol gruplarıyla çapraz reaksiyona rastlanmadığını bildirmiştir. Zeinab ve ark. (20), tarafından, ELISA yöntemiyle 21 fascioliasisli hastanın tamamı, 21 schistosomiasisli hastadan biri, başka parazitlerle enfekte 50 hastadan dördü pozitif bulunurken, 18 sağlıklı erişkinde pozitif olarak saptanan sonuç olmadığı bildirilmiştir.

Çapraz reaksiyonlar açısından değerlendirilen 10 ascariasisli hastadan PBS-ES, RPMI-ES ve erişkin antijenleri ile hazırlanan ELISA yöntemlerinde hiçbir olguda pozitiflik gözlenmemiştir. Kist hidatikli 10 olgudan ikisinde erişkin antijeni ile hazırlanan ELISA yöntemlerinde, diğer bir olguda da sadece PBS-ES antijeniyle hazırlanan ELISA yönteminde düşük

OD değerlerinde pozitif çapraz reaksiyon sonuçları alınmıştır. Çapraz reaksiyonlarda elde ettiğimiz OD değerlerinin, kanıtlanmış fascioliasis olgularında tüm ELISA yöntemleriyle saptadığımız OD değerlerinin altında olduğu gözlenmiştir. Kist hidatik olgularında RPMI-ES antijeniyle hazırlanan ELISA yönteminde pozitiflik saptanamamıştır. Toxocariasisli 10 hastadan sadece birinde çalıştığımız tüm serolojik yöntemlerle pozitif sonuç alındığı, diğer toxocariasisli olgularında tüm serolojik yöntemlerle olumsuz bulunduğu görülmüştür. Schistosomiasisli 5 olgudan birinde RPMI-ES ve erişkin antijenleriyle hazırlanan ELISA yöntemleri ile de pozitiflik saptanmış, PBS-ES antijenleri ile hazırlanan ELISA yönteminde pozitif sonuç alınamamıştır. Kontrol için toxocariasisli ve schistosomiasisli olgu serumları yurt dışından getirildiğinden, pozitif sonuç aldığımız toxocariasis ve schistosomiasisli birer olguda fascioliasis açısından araştırma yapma olanağımız bulunamamıştır. Tüm bu çapraz reaksiyonların, Mansour ve ark. (21), Shaheen ve ark. (27), Zeinab ve ark.'nın (20) yaptıkları çalışmalarla uyumlu olduğu, Espino ve ark.'nın (19) saptadıkları schistosomiasis, ascariasis, trichinosis, filariasis, clonorchiosis, amebiasis, necatoriosisli olgularında hiçbir çapraz reaksiyon saptamadıklarını bildirimleri kuşkulu olabileceği kanısına varılmıştır. Zeinab ve ark. (20), sağlıklı erişkin olgularının hiçbirinde pozitif sonuç saptamadıklarını bildirişiyle, bizim sağlıklı erişkin olgularımızda aldığımız sonuçların uyumlu olmadığı görülmüş, 29 sağlıklı erişkin kontrol grubundaki olgumuzdan bir olguda RPMI-ES antijeni ile ELISA'da, bir olguda PBS-ES antijeni ile ELISA'da pozitif bulunurken, iki olguda erişkin antijeni ile hazırlanan ELISA yönteminde pozitif sonuç alındığı görülmüştür. Serolojik olarak pozitif sonuç veren olgularda diğer parazit enfeksiyonların araştırılmasına olanak bulunamamıştır.

Tavşanlarda ELISA yönteminde akut dönemde *F.hepatica* tegument ve ES antijenlerinin 3. haftadan itibaren antikorları yakalayabildiği ve aralarında belirgin bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (24). Erişkin ve ES antijenlerle

hazırlanan ELISA yöntemlerinde sığırlarda 2. haftadan, koyunlarda ise 4. haftadan itibaren antikorların saptandığı ve antikor kinetiği açısından iki antijen arasında fark bulunmadığı vurgulanmıştır (34).

Regresyon analizi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, PBS-ES ELISA ile erişkin ELISA yöntemleri arasında %89.54 oranında ($r=0.9462$, $p<0.0001$), PBS-ES ELISA ile RPMI-ES ELISA yöntemleri arasında %92.69 oranında ($r=0.9627$, $p<0.0001$), RPMI-ES ELISA ile erişkin ELISA yöntemleri arasında %90.57 oranında birbirine paralel sonuçlar verdikleri saptanmış ve istatistiksel olarak bu değerler anlamlı bulunmuştur ($r=0.9517$, $p<0.0001$). Bu yöntemler arasında varyans analizi ile anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0.05$). En yakın paralel sonuçlar PBS-ES ELISA ile RPMI-ES ELISA yöntemleri arasında bulunmuş ve bu yöntemlerden birisinin diğerinin yerine seçenek olarak kullanılabilmesi ve göreceli olarak daha az olmakla beraber erişkin antijenle uygulanan ELISA yöntemiyle de diğer ELISA yöntemleri arasında oldukça yüksek oranda bir paralellik bulunduğu ve her üç ELISA yöntemi arasında belirgin bir fark bulunmadığı birinin diğerinin yerine kullanılabilmesi kanısına varılmıştır. Bulgularımızın Santiago ve ark. (24, 34) bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

DOT-ELISA yönteminin insan fascioliasis olgularında %100 duyarlı, %97.8 özgül olduğu belirtilmiştir (27). *F.hepatica*'nın endemik olduğu Boliviya'da insan olgularında FAST-ELISA yönteminin %95 duyarlılıkta bulunduğu bildirilmiştir (32). İnsan olgularında saflaştırılmış erişkin antijeni ile ELISA yönteminin %100 duyarlı, %93 özgül, %96.5 tanısal değeri olduğu, buna karşın EITB yönteminde ise tüm değerlerin %100 olduğu, ELISA'nın hastaların yakalanması,

EITB'nin de onay için kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (20).

Araştırmamızda uyguladığımız PBS-ES, RPMI-ES, erişkin antijenleri ile hazırlanan ELISA yöntemlerinin duyarlılıkları %100 olarak bulunmuştur. Özgüllükleri ise PBS-ES ve RPMI-ES antijenleri ile hazırlanan her iki ELISA yönteminde %95.3, erişkin antijeni ile hazırlanan ELISA yönteminde ise %90.6 olarak saptanmıştır. Shaheen ve ark. (27), Zeinab ve ark.'nın (20) insan fascioliasis olgularında ELISA yöntemleri ile %100 duyarlı sonuç verdiği bildirmelerinin, bizim araştırmamızdaki tüm serolojik yöntemlerde elde ettiğimiz %100 duyarlılık sonucuyla uyumlu bulunmuştur. ELISA duyarlılık sonuçlarımızın Hillyer ve ark.'nın (32) bulgularına uyumsuz bulunmasının nedeninin, farklı bir ELISA yönteminden yararlanılmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Tüm ELISA yöntemleriyle aldığımız özgüllük sonuçlarımızın da Shaheen (27), Hillyer ve ark. (32) ve Zeinab ve ark.'nın (20) özgüllük sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; PBS-ES, RPMI-ES, erişkin antijenleri ile hazırladığımız ELISA yöntemlerinin duyarlılıkları %100, özgüllükleri de %90.6 ile %95.3 gibi yüksek oranlarda saptanmış ve kanıtlanmış 11 fascioliasis olgusunda uyguladığımız tüm serolojik yöntemlerde yüksek pozitif değerler elde edilmiştir. Fascioliasis olgularında hastalığın akut döneminde dışkıda *F.hepatica* yumurtalarının görülebilmesi, süregen dönemde ise yumurta atılımının dönemsel seyir göstermesi nedeniyle, dışkı ve duodenal tubaj materialinde yumurta görülmesi de fascioliasisten kuşku edilen olguların serolojik tanısında her üç antijenle de hazırlanan ELISA yöntemlerinden yararlanılabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

İstatistiksel değerlendirmeler için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Cumhur GÜNDÜZ'e katkılarından ötürü teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. El-Metanawy T, Vuruşaner C. İstanbul'da kesilen sığırlardaki karaciğer kelebekleri üzerine bir araştırma. *İnfeksiyon Dergisi* 1991; 5(3), 203-5.
2. Celep A, Açıcı M, Çetindağ M. Samsun yöresi sığır ve koyunlarında paraziter epidemiyolojik çalışmalar. 8. Ulusal Parazitoloji Kongresi bildiri özetleri kitabı 1993: 91.
3. Vuruşaner C, Çetin B, Akkaya H, Gökçe R. İstanbul'da kesilen koyunlardaki karaciğer kelebekleri üzerine bir araştırma. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997; 22(4): 432-7.
4. Şeşen R, Yıldırım M. Parazitolojik önemi olan Türkiye tatlısu salyongozları üzerine bir çalışma. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1993; 17(3-4): 138-47.
5. Boyacıoğlu S, Dalay R, Hilmioğlu F, Akoğlu M, Şahin B. The cholangiographic findings of human fascioliasis: A report of two cases. *Gastroenteroloji* 1991; 2(2): 130-2.
6. Kayabali İ, Gökçora İ.H, Yerdel M.A, Örmeci N. Hepatic fascioliasis and biliary surgery. *Int Surg.* 1992; 77: 154-7.
7. Atalay F, Kırımlıoğlu V, Dağlı Ü, Akıncıoğlu T, Akaoğlu M. Seven C. Human fascioliasis. *Surgery Today* 1993; 23: 366-9.
8. Tetik A, Türkkani I, Bilgen K, Yandakçı K. Mekanik iktere neden olan beş *Fasciola hepatica* vakası. *Klinik ve Deneysel Cerrahi Dergisi* 1995; 3(4): 229.
9. Savaşçın B, Savan B, Aydede H, Arıcı A. Dış safra yollarının paraziter hastalıkları. *Klinik ve Deneysel Cerrahi Dergisi* 1995; 3(4): 212.
10. Büyükbaba Ö, Özkan E, Büyükuncu Y, Büğet E. *Fasciola hepatica*'ya bağlı bir kolesistit olgusu. *Klinik Dergisi* 1996; 9(2): 98-9
11. Demir A, Cümşüdoğru C, Topgöl K, Baydar B, Hasiroğlu F, Taner Ş, Şahin H.C. Koledokta *Fasciola hepatica*. *Gastroenteroloji* 1996; 7(1ek): 90.
12. Perek A, Perek S, Sonsuz A. İnsanda fascioliasis. *Çağdaş Cerrahi Dergisi.* 1996; 10(4): 228-229.
13. Akdeniz H, İrmak H, Buzgan T, Seçkinli T, Demiröz A.P. Van yöresinde karşılaşılan paraziter enfeksiyonlar. 10. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. 1997: 153.
14. Yılmaz H, Çöz Y, Güdücüoğlu H, Gül A. Van'ın Erciş ilçesinde Parazitosis sorunu. 10. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. 1997: 136.
15. Pulpeiro J.R, Armesto V, Varela J., Corredoira J. Fascioliasis: findings in 15 patients. *The British J.Radiology* 1991; 64: 798-801.
16. WHO Division of Control of Tropical Diseases. Fascioliasis. *Weekly Epid. Record* 1992; 44: 326-9.
17. Price T.A, Tuazon C.A, Simon G.L. Fascioliasis: Case reports and review. *Clin. Infec. Diseases* 1993; 17: 426-30.
18. Arjona R, Riancho J.A, Aguado J.M, Salesa R, Gonzalez-Macias J. Fascioliasis in developed countries: A review of classic and aberrant forms of the diseases. *Medicine* 1995; 74(1): 13-23.
19. Espino A.M, Dumenigo B.E, Fernandez R, Finlay C.M. Immunodiagnosis of human fascioliasis by ELISA using excretory-secretory products. *Am. J.Trop.Med.Hyg.* 1987; 37(3): 605-8.
20. Zeinab A.S, Zeinab A.D, Wafaa A.M, Hanaa I.H, Hanan G.B, Hend I.G. Evaluation of specific *Fasciola* antigen in the immunodiagnosis of human fascioliasis in Egypt. *J.Egypt Soc. Parasitol.* 1994; 24(3): 463-70.
21. Mansour N.S, Youssef F.G, Mikhail E.M, Bector F.N. Use of partially purified *Fasciola gigantica* worm antigen in the serological diagnosis of human fascioliasis in Egypt. *Am. J.Trop.Med.Hyg.* 1983; 32(3): 550-4.
22. Hillyer G.V, Haroun T.M, Hernandez A, Galanes M.S. Acquired resistance to *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1987; 37 (2): 363-9.
23. Zeinab A.S, Zeinab A.D, Wafaa A.M, Hanaa I.H, Mohandes M, Hend I.G. Purification and characterization of a specific *Fasciola* antigen. *J.Egypt Soc. Parasitol.* 1994; 24(2): 309-16.
24. Santiago N, Hillyer G.V, Garcia-Rosa M, Morales M.H. Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infections in rabbit. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1986; 35(1): 135-40.
25. Hillyer G.V, Galanes M.S. Initial feasibility studies of the FAST-ELISA for the immunodiagnosis of fascioliasis. *J. Parasitology* 1991; 77(3): 362-5.

26. El-Shabrawi M, El-Karakasy H, Okasha S, El-Hennawy. Human fascioliasis: Clinical features and diagnostic difficulties in Egyptian Children. *J. Trop. Pediatrics* 1997; 43: 162-6.
27. Shaheen H.I, Kamal K.A, Farid Z, Mansour N, Boctor F.N, Woody J.N. DOT-ELISA for the rapid diagnosis of human fascioliasis. *J.Parasitol.* 1989; 75(4): 549-52.
28. Bechtel U, Feucht H.E, Held E, Vogl T, Nothdruff H.D. Fasciola hepatica- Infektion einer familie. *Dtsch.Med.Wschr.* 1992; 117: 978-82.
29. Laird P.P, Boray J.C. Human fascioliasis successfully treated with triclabendazole. *Aust.NZ. J. Med.* 1992; 22: 45-7.
30. Procriv P, Walker J.C, Whitby M. Human ectopic fascioliasis in Australia: first case reports. *Med. J. Australia,* 1992; 156: 349-51.
31. Cho S.Y, Yang H.N, Kong Y, Kim J.C, Shin K.W, Koo B.S. Intraocular fascioliasis: a case report. *Am. J.Trop.Med.Hyg.,* 1994; 50(3): 349-53.
32. Hillyer G.V, Galanes M.S, Rodriguez-Perez J, Bjorland J, Lagrava M.S, Guzman S.R, Bryan R.T, Use of FAST-ELISA and EITB to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am J.Trop.Med.Hyg.* 1992; 46(5): 603-9.
33. Stark M.E, Herrington D.A, Hillyer G.V, McGill D.B. An international traveler with fever, abdominal pain, eosinophilia and a liver lesion. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1900-8.
34. Santiago N, Hillyer G.V. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with Fasciola hepatica. *J.Parasitol.* 1988; 74(5): 810-8.