

1-1-2003

Comparison of IFAT and ELISA Results in Mice Experimentally Infected with *Toxocara canis*

HASAN AYÇİÇEK

MEHMET TANYÜKSEL

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary>



Part of the [Animal Sciences Commons](#), and the [Veterinary Medicine Commons](#)

Recommended Citation

AYÇİÇEK, HASAN and TANYÜKSEL, MEHMET (2003) "Comparison of IFAT and ELISA Results in Mice Experimentally Infected with *Toxocara canis*," *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*: Vol. 27: No. 4, Article 14. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol27/iss4/14>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact academic.publications@tubitak.gov.tr.

***Toxocara canis* ile Deneysel Olarak İnfekte Edilen Farelerde ELISA ve IFAT Sonuçlarının Karşılaştırılması**

Hasan AYÇİÇEK

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Mehmet TANYÜKSEL

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.04.2002

Özet: Toxocariasis, genellikle *Toxocara canis*, daha az sıklıkla *Toxocara cati* infektif yumurtalarının esas konakçı olmayan insanlarca ağız yoluyla alınmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır.

Çalışmada *T. canis* infektif yumurtalarıyla deneysel infekte edilen farelerden, farklı günlerde elde edilen serum örnekleriyle IFAT ve ELISA çalışılmıştır. Deneysel grubunda 15. ve daha ileri günlere ait serum örnekleri dikkate alındığında, erişkin ve larval kesit antijenleriyle yapılan IFA testinde sırasıyla % 70 ve % 73,3, TES-ELISA ile % 96,7 oranında seropozitiflik bulunmuştur. Kontrol grubunda erişkin ve larval kesit antijenleriyle yapılan IFA testiyle sırasıyla % 81,4 ve % 85,1, *T. canis* Ekskretuar/Sekretuar-ELISA (TES-ELISA) ile % 98,1 oranında seronegatiflik tespit edilmiştir. Gerek kontrol grubundaki seronegatifliği, gerekse deney grubundaki seropozitifliği belirleyebilme oranları değerlendirildiğinde, ELISA'nın IFA testinden daha değerli olduğu gözlenmiş, istatistiksel olarak da iki test sonuçları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Anahtar Sözcükler: *Toxocara canis*, IFAT, ELISA, fare

Comparison of IFAT and ELISA Results in Mice Experimentally Infected with *Toxocara canis*

Abstract: Toxocariasis is a disease which indicates a wide symptomatic spectrum and occurs usually by the ingestion of infective *Toxocara canis* (rarely *Toxocara cati*) eggs by humans as a paratenic host.

In this study, the sera samples of experimentally infected mice were evaluated on different days by IFAT and ELISA. Regarding the sera samples obtained on the 15th and following days of the study, the groups seropositivity in IFAT by adult and larval sectional antigens and in TES-ELISA were 70, 73.3 and 96.7%, respectively. In the control group, seronegativity in IFAT by adult and larval sectional antigens, and in *T. canis* Excretuar/Secretuar-ELISA, was 81.4, 85.1 and 98.1%, respectively. When comparing the detection of seronegativity in the control group and seropositivity in the study group, ELISA was found to be more reliable than IFAT and there was a statistically significant difference between these two tests ($P < 0.05$).

Key Words: *Toxocara canis*, IFAT, ELISA, mice

Giriş

Toxocariasis, özellikle çocuklarda görülen hipereozinofili, hepatomegali, ateş, geçici pulmoner infiltrasyon ve hipergammaglobulinemi ile karakterize bir hastalıktır. *Toxocara canis*'in Visceral Larva Migrans'in (VLM) en önemli etkenlerinden biri olması nedeni ile toxocariasis ismi VLM ile özdeşleşmektedir (1-4).

Toxocara canis gerçekte bir köpek ascaridi olup, daha az sıklıkta da olsa kedilerde de bulunduğu bildirilmektedir (5-7). Toxocariasis'in, kesin konak olmayan insanlar tarafından infektif *T. canis* yumurtalarının sindirim yoluyla alınmasıyla başladığı, yumurtadan çıkan larvaların genel dolaşıma katılarak göç ettikleri, dokularda uzun süre canlı kalabildikleri ve bu dokularda hasar meydana getirdikleri belirtilmektedir (1,4).

* Bu çalışma Gülhane Askeri Tıp Akademisi AR-GE Merkez Başkanlığı'nın 97/2 no.'lu projesi olarak kabul edilmiştir. 11. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (Sivas) sözlü bildiri olarak yayınlanmıştır.

Toxocariasis'in serolojik tanısında ELISA yönteminin oldukça duyarlı ve özgül olduğu bildirilmektedir (8,9). Diğer helmint hastalıklarına bağlı olarak görülebilen çapraz reaksiyonların Western blotting yöntemiyle elenebildiği vurgulanmaktadır (10).

Beyaz farelerin toxocariasis için paratenik arakonak olma özelliği, söz konusu hastalıkta ortaya çıkan bulgular ve kanın biyokimyasal tablosu ile insan toxocariasis'inin değerlendirilmesinde iyi bir deneysel model olduğu bildirilmektedir (11,12). Ayrıca deneysel olarak geliştirilen infeksiyon sayesinde çok sayıda toxocariasis'li pozitif grup elde etme olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı toxocariasis'in tanısına yönelik, otopsi ile toplanan olgun *T. canis*'lerden toplanan yumurtaların infektif hale getirilmesinden sonra farelere verilerek oluşturulan deneysel infeksiyondan sonra (otopsi ile de doğrularak) IFAT ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda günümüzde toxocariasis'in serolojik tanısında önemi vurgulanan *T. canis* larval ekskretuar/sekretuar (ES) antijenleri ile ELISA testinin, ülkemize ait *T. canis* antijenleri ile standardize edilmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Metot

Keçiören Belediyesi itlaf ekiplerince itlaf edilen sokak köpeklerin bağırsaklarından temin edilen dişi *T. canis*'lerin uteruslarından toplanan yumurtaların, % 6 sodyum hipoklorit ile 20 dk süreyle kabukları inceltildikten sonra 5 dk süreyle 1000 g'de % 0,85'lik fizyolojik tuzlu suyla 5-6 kez santrifüj edilerek yıkanmıştır. Embriyonizasyon 26 °C'lik etüvde 4 hafta süreyle, içerisinde % 0,5 formol bulunan petri kaplarında gerçekleştirilmiştir (13,14). Yumurtalar içerisinde larva geliştikten sonra tekrar yıkanmış ve içerisinde 100 U/ml penicillin, 250 µg/ml streptomycin ve 50 µg/ml amphoteresin B içeren 20 ml Modifiye Eagle MEM (Sigma, Katalog No: M 4655) besiyeri bulunan steril bir erlenmayer içerisine alınmıştır. Süspansiyon bir gece magnetik karıştırıcıda karıştırılarak larvaların yumurtalardan çıkmaları sağlanmıştır (15). Oaks ve Kayes'in (16) yöntemine göre larvalar toplanmış ve modifiye Eagle MEM kültür ortamı bulunan 25 cm²'lik flasklara 5000 larva/ml olacak şekilde aktarılarak % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüve kaldırılmıştır. Flasklardaki supernatant her hafta steril şartlarda alınarak yerine yukarıda sözü edilen besiyeri ve katkı maddeleri eklenmiştir.

Sekiz hafta süre ile toplanan supernatantların selüloz membran (Sigma, Katalog No: 0-9527) ile diyalizinden sonra 20.000 g'de 20 dk süreyle santrifüj edilmiş protein miktarı belirlenmiştir (17). ELISA'nın uygulamasına geçilmeden önce yapılan checkerboard titrasyonunda uygun ES antijen miktarı 12,5 µg/ml, serum dilüsyon oranı 1:100, konjugat (Anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate, Sigma A 4416) dilüsyonu ise 1:1000 olarak belirlenmiştir. ELISA testinde antijen kaplama işlemi +4 °C'de bir gece inkübasyon ile, bloking işlemi % 2 Bovine Serum Albumin (BSA) ile oda sıcaklığında 10 dk, serum ve konjugat inkübasyonları 37 °C'de 1 saat, substrat (OPD fast, Sigma, P9187) inkübasyonu ise 30 dk süre ile gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri 450 nm'de alınmıştır. Eşik değeri (0,337) ortalama negatif absorbans değerine 2 Standart Sapma (SD) değeri eklenmek suretiyle belirlenmiştir (9,12,13,18).

İmmün Floresan Antikor testinde kullanılacak antijen preparatları, erişkin ve larvaların kryostat ile 8 mm kalınlığında kesildikten sonra lamlara yapıştırılıp aseton ile 10 dk süreyle fikse edilerek hazırlanmıştır. IFA testinde 1:10-1:1280 serum dilüsyonu ile çalışılmış, uygun konjugat (Anti-mouse IgG, whole molecule, FITC Conjugate, Sigma, F-0257) dilüsyonu 1:40 olarak belirlenmiştir. Serum ve konjugat basamaklarında 37 °C'de 30 dk süreyle inkübasyon uygulanmıştır. Pozitiflik, yeşil floresan ışımının kuvvetine göre bir pozitif ile üç pozitif, şüpheli preparatlar (+), kırmızı ışımaya görülen preparatlar negatif olarak değerlendirilmiştir (19-21).

Çalışmada deney hayvanı olarak Gülhane Askeri Tıp Akademisi Deney Hayvanları Bölümü'nden temin edilen, 4-6 haftalık 108 adet erkek beyaz fareler (Balb/c) kullanılmıştır. Deney grubundaki dokuz ayrı grupta toplam 54 adet fareye oral olarak (küt uçlu eğri kanüllü enjektör kullanılarak) içerisinde yaklaşık 1000 infekte yumurta bulunan 0,5 ml fizyolojik tuzlu su verilirken, kontrol grubundaki aynı sayıdaki fareye yalnızca 0,5 ml fizyolojik tuzlu su verilmiştir (14).

Deneysel infeksiyondan sonraki 1., 4., 7., 10., 15., 25., 40., 60. ve 90. günlerde farelerin kalplerinden yaklaşık 1 ml kan alınarak serumları ayrılmıştır. Ayrıca her farenin beyin, karaciğer, akciğer ve kasları çıkarılarak larval göç yönünden incelenmiştir (14). Yine her farenin çıkarılan bağırsak içerikleri, testlerde alınan çapraz reaksiyonları değerlendirmek amacıyla parazit yönünden incelenmiş ve sonuçları kaydedilmiştir.

İstatistiksel Analiz: IFAT ve ELISA'da elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması Mann-Whitney U testine göre yapılmıştır. 0,05'den küçük "P" değerleri anlamlı, 0,05'den büyük "P" değerleri anlamsız olarak değerlendirilmiştir (22).

Bulgular

IFA testinde kontrol grubunda dokuz ayrı grupta bulunan toplam 54 adet fare serumundan erişkin kesit antijenleriyle 10 adet, larval kesit antijenleriyle sekiz adet seropozitiflik alınmıştır. Yine kontrol grubundaki fare serumlarının erişkin kesit antijenleriyle 44'ünün, larval kesit antijenleriyle 46'sının seronegatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Gerek erişkin, gerekse larval kesit antijenleriyle yapılan IFA testinde alınan sonuçlar karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testine göre yapılan istatistiksel analizinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($P > 0,05$).

Gruplardaki toplam 108 adet farenin 100 tanesinin *Syphacia spp.*, *Aspicularis tetraptera*, *Hymenolepis nana* ve

H. diminuta gibi helmint türlerinden biri veya birkaçı ile doğal infekte olduğu tespit edilmiştir. IFA testinde kontrol grubundaki seropozitif reaksiyon veren serumların bir veya birden fazla helmint türü ile infekte olan farelere ait serumlar olduğu görülmüştür.

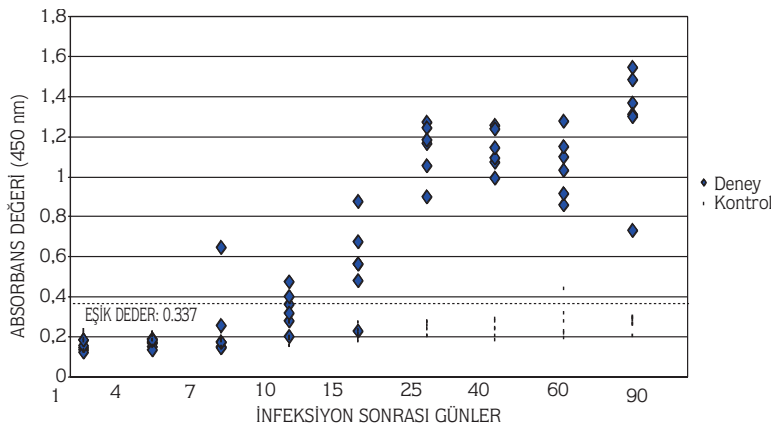
IFA testinde seronegatif sonuçlar değerlendirildiğinde, 1/10 dilüsyonda şüpheli reaksiyonlar alınsa bile dilüsyon oranı 1/20'ye çıktığında seronegatifliğe dönüştüğü görülmüştür. Larval kesit antijenleriyle seropozitifliğin görüldüğü son dilüsyon basamağı (anlamlı sulandırım) 1/160 iken, aynı serumun erişkin kesit antijenleriyle yapılan çalışmada bu oranın 1/80 olduğu belirlenmiştir. ELISA ve IFA testlerinde kontrol ve deney gruplarında elde edilen seropozitiflik ve seronegatiflik oranları Tablo 1'de sunulmuştur.

ELISA'da deney grubuna ait fare serumlarından alınan absorbanslar değerlendirildiğinde, 15. güne ait serumlardan eşik değerinin (0,337) yaklaşık iki katı, 25. günden itibaren ise yaklaşık üç katı düzeyinde absorbans değerleri alınmıştır. En yüksek absorbans değerleri ise 90. güne ait fare serumlarından elde edilmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. IFAT ve ELISA ile kontrol ve deney gruplarında belirlenen seropozitiflik ve seronegatiflik sayı/oranları.

Test	Kontrol farelerine ait serumlar			Deney* farelerine ait serumlar		
	Negatif (%)	Pozitif (%)	Toplam (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	Toplam (%)
IFAT Erişkin Ag	44 – (81,4)	10 – (18,6)	54 – (100)	9 – (30)	21 – (70)	30 – (100)
IFAT Larval Ag	46 – (85,1)	8 – (14,9)	54 – (100)	8 – (26,7)	22 – (73,3)	30 – (100)
TES-ELISA	53 – (98,1)	1 – (1,9)	54 – (100)	1 – (3,3)	29 – (96,7)	30 – (100)

*: 15., 25., 40., 60. ve 90. günlere ait serumlar



Şekil 1. Deney ve kontrol gruplarındaki farelere ait farklı günlerde alınan serumlardan ELISA ile elde edilen absorbans değerleri.

Dolayısıyla 15. günden itibaren seropozitifliğin kesin olarak alınabileceği tespit edilmiştir. ELISA testinde deney grubundaki toplam 30 adet fare serumunun sekizinden seronegatiflik alınırken, kontrol grubundaki toplam 54 adet fare serumunun sadece birinde seropozitiflik alınmıştır.

Toxocariasis'in serolojik tanısı için günümüzde larval ES antijenleri ile uygulanan ELISA ve IFA testlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri Tablo 2'de sunulmuştur. Buna göre erişkin kesit antijenlerle uygulanan IFA testinde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla; % 70, % 81, % 67 ve % 83 olarak, larval kesit antijenlerle uygulanan IFA testinde; % 73, % 85, % 85 ve % 85 olarak tespit edilmiştir. TES-ELISA'da ise aynı değerler sırasıyla; % 96, % 98, % 96 ve % 98 olarak belirlenmiştir.

Pozitiflik oranı: $\frac{\text{Toplam pozitif serum sayısı}}{\text{Test edilen toplam serum sayısı}} \times 100$
(Duyarlılık)

Negatiflik oranı: $\frac{\text{Toplam negatif serum sayısı}}{\text{Test edilen toplam serum sayısı}} \times 100$
(Özgüllük)

Pozitif Prediktif Değer: $\frac{\text{Deney grubundaki toplam pozitif serum sayısı}}{\text{Deney ve kontrol grubundaki toplam pozitif serum sayısı}} \times 100$
(PPD)

Negatif Prediktif Değer: $\frac{\text{Deney grubundaki toplam negatif serum sayısı}}{\text{Deney ve kontrol grubundaki toplam negatif serum sayısı}} \times 100$
(NPD)

Deney grubunun 1., 4., 7. ve 10. günlerinde IFA testinde erişkin ve larval kesit antijenleriyle aynı sonuçlar (17 seronegatif, 7 seropozitif) elde edilmiştir. ELISA'da ise aynı günlerde 20 seronegatif, 4 seropozitif sonuç alınmıştır. Üç test sonuçlarının birbirleri ile karşılaştırılmasında, Mann-Whitney U testine göre yapılan istatistiksel analizinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P > 0,05$). Deney grubunda 15. ve daha ileri günlere ait IFA (erişkin ve larval kesit Ag) ve ELISA sonuçları sırasıyla 9, 8 ve 1 seronegatif, 21, 22 ve 29 seropozitif olarak bulunmuştur. Bu test sonuçları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Tartışma

Günümüze kadar çeşitli araştırmalarda toxocariasis olgularının tanısında parazitin çeşitli formlarından hazırlanan antijenler kullanılarak birçok serolojik teknikler (IFAT, IHAT, counter-immunoelectrophoresis, ELISA vs.) uygulanmıştır (8,10,19-21,23-25).

Toxocariasis'in serolojik tanısı amacıyla ELISA ve IFA testi uygulanan deneysel nitelikteki çalışmalara sınırlı sayıda rastlanmıştır (11-13,18-21). Annen ve ark. (19), *T. canis* ile deneysel infekte farelerde larva ve infektif yumurta antijenlerini kullanarak, spesifik IgG yanıtını inceledikleri IFAT çalışmasında, 1/20-1/640 arasındaki dilüsyonlarda larval antijenlerin yumurta antijenlerine göre daha yüksek seropozitiflik verdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda farelerle gerçekleştirilen benzer deneysel modelde, Annen ve ark.'nın (19) sonuçlarıyla uyumlu olarak IFA testinde, 1/10-1/640 arasındaki dilüsyonlarda larval antijenlerin, erişkin antijenlere göre daha yüksek seropozitiflik verdikleri tespit edilmiştir. IFA testinde kontrol grubunda görülen seropozitifliklerin, farelerde bulunan diğer helmint türlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, Annen ve ark. (19) negatif kontrollerde, *Ascaris suum* ile infekte farelerde çapraz reaksiyonların görülebileceğini bildirmişlerdir.

Tablo 2. IFAT ve ELISA testlerinde belirlenen duyarlılık, özgüllük, pozitif-negatif prediktif değerler.

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD* (%)	NPD ^ψ (%)
IFAT (Erişkin Ag)	70	81,4	67,7	83
IFAT (Larval Ag)	73,3	85,1	73,3	85,1
TES-ELISA	96	98	96,6	98,1

*: Pozitif Prediktif Değer

ψ: Negatif Prediktif Değer

Baufine-Ducrocq ve ark. (20), *T. canis*'in embriyonlu yumurta kesitlerini antijen olarak kullanarak IFA ve presipitasyon testlerini uygulamışlar ve infeksiyondan 15 gün sonra 1/40-1/80 dilüsyonlarda seropozitif olan titrenin, 30 gün sonra 1/160-1/320'ye çıktığını tespit ederek, IFA testinin presipitasyon testinden daha duyarlı ve kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir.

Safar ve ark. (26)'nın, *T. canis*'in erişkin kesit ve larvalı yumurta antijenlerini kullanarak VLM şüpheli kişilerde gerçekleştirdikleri IFA testi çalışmasında embriyonlu yumurtalarla % 52, erişkin kesit antijenleriyle % 48 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada, erişkin kesit antijenleriyle % 70, larval antijenlerle ise % 73 oranında seropozitiflik elde edilmiştir. Buradaki farklılığın çalışmalarda kullanılan örneklerin farklılığından ve IFA testinin subjektif özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sarımehtemoğlu (27), erişkin *T. canis* antijenleriyle gerçekleştirdiği IFA testinde deney grubunda 14. günden itibaren görülmeye başlanan seropozitifliğin 1/128'e kadar olan dilüsyonlarda elde edildiğini ve 18-42. günlerde pik yaptığını bildirmiştir. Çalışmamızda IFA testi ile deney grubunda 1/160'a kadar olan dilüsyonlarda seropozitiflik görülmüş, benzer şekilde 15. günden itibaren seropozitifliğin belirginleşmeye başladığı ve 40. günde pik yaptığı tespit edilmiştir.

Çalışmada uygulanan testlerin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerleri incelendiğinde (Tablo 2), TES-ELISA sonuçlarının larval ve erişkin kesit antijenleriyle uygulanan IFA testlerinden üstün olduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca Tablo 1'den anlaşılacağı üzere deney grubunda yapılan taramada larval kesitlerle % 26,7, erişkin kesitlerle % 30 gibi yüksek oranda yalancı seronegatiflik tespit edilmiştir ki, bu oranlar TES-ELISA sonucu (% 3,3) ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir yalancı seronegatiflik oranıdır. Başka bir ifade ile IFA testi ile yapılacak bir serolojik taramada sonuç seronegatif çıkarsa ELISA testini de eklemeye ihtiyaç duyulacağı söylenebilir. Ayrıca IFA testlerinde negatif prediktif değerlerin düşük oranda olması bu testin iyi bir tarama testi olamayacağını göstermektedir.

Deney grubunun 1., 4., 7. ve 10. günlerinde ELISA ve IFA test sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ($P > 0,05$), deney grubunda 15. ve daha ileri günlerindeki anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Antikor yanıtının ortaya çıktığı 15. ve daha ileri

günlerde erişkin ve larval IFA testleri ile sırasıyla % 70 ve % 73 oranında duyarlılık elde edilmesi, IFA testlerinin hasta grubundaki seropozitifleri belirleyebilme yeteneğinin zayıf olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Deney grubunda % 26,7-30 oranında yalancı seronegatiflik belirlenmesi de IFA testlerinin sonuçlarının güvenilirliğini azaltmaktadır.

Speiser ve Gottstein (8), insanda paraziter hastalıkların tanısında kullanılan serolojik yöntemlerde standardizasyonun önemli olduğunu, iki farklı laboratuvarında hazırlanan ES antijenleri ile ELISA yönteminde benzer sonuçlar alındığını, ES antijeninin insan toxocariasis'i tanısında standardize edilebilecek bir antijen olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde söz konusu antijenin kullanıldığı çalışmamızda da ELISA testiyle başarılı sonuçlar elde edilebileceği ortaya konulmuştur.

Magnaval ve ark. (10), toxocariasis'li kişilerde hastalığın serolojik tanısında *T. canis* larval-ES antijeni ile uygulanan ELISA testinin kesin önemini vurgulamış, ancak insanlardaki diğer helmint hastalıklarının varlığında özgüllüğünün yetersiz kaldığını bildirmişlerdir. TES-ELISA testinin düşük maliyetli, kolay, kullanışlı ve tanıda ilk basamakta kullanılması gereken test olduğunu; ancak, pozitif veya eşik değere yakın sonuçların Western blotting yöntemi ile doğrulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

ELISA'nın IFA testine göre üstünlüğünde ELISA'da oldukça spesifik özellik gösterdiği bildirilen larval ES antijenlerinin kullanılması, IFA testinde parazitin erişkin formuna ait total antijenik yapıların kullanılması ve testin subjektif özellikte bir test olması gibi faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. IFA testinin uygulama zorluğu, subjektif olması, kesit antijenlerini saklama zorluğu ve ekonomik dezavantajları düşünülecek olursa günümüzde tanı için ELISA ile birlikte kullanılmasının fazla yararlı olamayacağı söylenebilir.

Toxocara canis larval ES antijenleriyle uyguladığımız ELISA sonuçlarının, bu konuda yurt dışında yapılmış çalışmaları destekleyici özellikte olduğu görülmektedir (12,13). Çalışmamız *T. canis* yumurtalarıyla infekte edilen beyaz farelerde sokak köpeklerinden toplanan *T. canis*'lerden elde ettiğimiz larval-ES antijeninin kullanıldığı, ELISA yöntemiyle toxocariasisin serolojik tanısı konusunda deneysel nitelikte olan ilk çalışmadır. Gerek kontrol grubundaki seronegatifliği belirleyebilme, gerekse deney grubundaki seropozitifliği belirleyebilme

oranları değerlendirildiğinde, ELISA sonuçlarının IFA testi sonuçlarından daha değerli olduğu ortaya konulmuştur. Ancak çapraz reaksiyonları en aza indirecek ve alınan sonuçları doğrulayacak test ya da yöntemleri gerçekleştirmenin zorunlu olduğunun unutulmaması gerekmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma doğrultusunda deneysel infekte farelerde ELISA ve IFA testini

karşılaştırıp standardize ederek insan toxocariasis serolojik tanısı için alt yapı oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu sayede ülkemizdeki parazit suşlarından elde edilen özgün *T. canis* larval ES antijenlerini kullanmanın serolojik tanıda duyarlılık-özellikliğini arttıracığı, ayrıca hazırlanan ELISA tanı kitinin ekonomik avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Ash, L.R.: Larva Migrans Then. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1989; 41(3 Suppl): 18-20.
2. Schantz, P.M., Glickman, L.T.: Current Concepts in Parasitology. Toxocaral Visceral Larva Migrans. N. Engl. J. Med., 1978; 298: 436-439.
3. Schantz, P.M.: Toxocara Larva Migrans Now. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1989; 41(3 Suppl): 21-34.
4. Woodruff, A.W., de Savigny, D., Jacobs, D.E.: Study of Toxocaral Infection in Dog Breeders. Br. Med. J., 1978, 2: 1747-1748.
5. Parsons, J.C.: Ascarid Infections of Cats and Dogs. Vet. Clin. N. Am.-Small, 1987; 17: 1307-1339.
6. Sprent, J.F.A., Barrett, M.G.: Large Roundworm of Dogs and Cats. Differentiation of *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*. Aust. Vet. J., 1964; 40: 166-171.
7. Sprent, J.F.A.: Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. Parasitology, 1958; 48: 184-209.
8. Speiser, F., Gottstein, B.: A Collaborative Study on Larval Excretory-Secretory Antigens of *Toxocara canis* for the Immunodiagnosis of Human Toxocariasis with ELISA. Acta Trop., 1984; 41: 361-372.
9. Van Knappen, F., van Leusden, J., Polderman, A.M., Franchimont, J.H.: Visceral Larva Migrans-Examination by Means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Human Sera for Antibodies to Excretory-Secretory Antigens of the Second-Stage Larva of *Toxocara canis*. Z. Parasitenkd., 1983; 69: 113-118.
10. Magnaval, J.V., Fabre, R., Maurières, P., Charlet, J.P., de Larrard, B.: Application of the Western-blotting Procedure for the Immunodiagnosis of Human Toxocariasis. Parasitol. Res., 1991; 77: 697-702.
11. Kayes, S.G., Oaks, J.A.: Development of the Granulomatous Response in Murine Toxocariasis. Am. J. Pathol., 1978; 93: 277-285.
12. Kayes, S.G., Ohmholt, P.E., Grieve, R.B.: Immune Responses of CBA/J Mice to Graded Infections with *Toxocara canis*. Infect. Immun., 1985; 48: 697-703.
13. Bowman, D.D., Mika-Grieve, M., Grieve, R.B.: Circulating Excretory-Secretory Antigen Levels and Specific Antibody Responses in Mice Infected with *Toxocara canis*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1987; 36: 75-82.
14. Oshima, T.: Standardization of Techniques for Infecting Mice with *Toxocara canis* and Observations on the Normal Migration Routes of the Larvae. J. Parasitol., 1961; 47: 652-656.
15. Wade, S.E., Georgi, J.R.: Radiolabeling and Autoradiographic Tracing of *Toxocara canis* Larvae in Male Mice. J. Parasitol., 1987; 73: 116-120.
16. Oaks, J.A., Kayes, S.: Artificial Hatching and Culture of *Toxocara canis* Second Stage Larvae. J. Parasitol., 1979; 65: 969-970.
17. Dawson, M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Kenneth, M.J.: Data for Biochemical Research. Third Edition. Oxford Science Publications. 1986; 542-543.
18. Nicholas, W.L., Stewart, A.C., Mitchell, G.F.: Antibody Responses to *Toxocara canis* Using Sera from Parasite-Infected Mice and Protection from Toxocariasis by Immunisation with ES Antigens. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1984; 62: 619-626.
19. Annen, J.M., Eckert, J., Hess, U.: A Simple Method for the Preparation of *Toxocara canis* Antigen for the Indirect Immunofluorescence Test. Acta Tropica, 1975; 32: 34-47.
20. Baufine-Ducrocq, H., Counzineau, P., Beauvais, B.: Diagnosis of Visceral Larva Migrans by the Immunofluorescent Reaction. Bull. Soc. Path. Exot., 1974; 66: 746-751.
21. Weiland, G., Schwarzhuber, A.: Untersuchungen zum Nachweis von Larva Migrans Visceralis mit dem Peroxydase-Test (ELISA) und der Immunofluoreszenz. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 1978; 91: 209-213.
22. Zar, J.H.: Biostatistical Analysis, 1996, New Jersey, USA, Prentice-Hall.
23. Enayat, M.S., Pezeshki, M.: The Comparison of Counterimmuno-Electrophoresis with Indirect Haemagglutination Test for Detection of Antibodies in Experimentally Infected Guinea Pigs with *Toxocara canis*. J. Helminth., 1977; 51: 143-148.
24. Glickman, L.T., Schantz, P.M., Dombroske, R., Cypess, R.: Evaluation of Serodiagnostic Tests for Visceral Larva Migrans. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1978; 27: 492-498.
25. Gunasseelan, L., Ramadass, P., Raghavan, N.: Serological Diagnosis of *Toxocara canis* Infection in Children. Indian Vet. J., 1986; 63: 828-832.

26. Safar, E.H., Azab, M.E., Khalil ,H.M., Bebars, M.A., El-Hady, H., Khattab, H.M.: Immunodiagnosics of *Toxocara canis* in Suspected Ocular and Visceral Manifestations. *Parasitology*, 1990; 37: 249-254.
27. Sarımehtemtoğlu, H.O.: *Toxocara canis* ile Deneysel Enfekte Farelerde Visceral Larva Migransın İndirekt Hemaglütinasyon ve İndirekt Floresan Antikor Testleri ile Teşisi. Doktora Tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1995.