

283923

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji Bölümü

TOKSOPLAZMOZİS TEŞHİSİNDE
HEMAGLÜTİNASYON VE FLORESAN ANTİKOR
TEKNİKLERİNİN DEĞERİ

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Şefik Şanal Alkan

Mart
1969
ANKARA

Ö N S Ö Z

Son yıllarda toksoplazmozise karşı gittikçe artan bir ilgi gösterilmektedir. Bunun nedeni enfeksiyonun sanılandan daha yaygın olduğunu gösteren kanıtların ortaya çıkarılmasıdır. Toksoplazmozis tanınması güç bir hastalıktır. Daha çok serolojik metodlarla teşhis edilir. 1948 den beri bu amaçla kullanılan Sabin-Feldman Testi birçok bakımlardan güçlükler yarattığından onun yerine geçmek üzere birkaç metod ileri sürülmüştür. Bunların başında Pasif Hemaglutinasyon ve Floresan Antikor Teknikleri gelmektedir. Ancak, hastalığın rutin teşhisinde hangi testin kullanılması gerektiği konusunda, araştırmacılar arasında fikir birliği yoktur.

Bizim bu çalışmayı yapmaktaki amacımız toksoplazmozisin teşhisinde kullanılması teklif edilen pasif hemaglutinasyon ve floresan antikor teknikleri sonuçlarının standart Sabin-Feldman Testi sonuçlarıyla paralel gidip gitmediğini araştırmak ve buna göre ülkemizde kullanılacak testi seçip, geliştirmektir. Bunun için Ankara'da toksoplazmozis şüpheli olan ve olmayan toplam 338 insan serumunda her üç test ile toksoplazma antikorları aranmış, alınan sonuçlar karşılaştırılarak hangi testin Sabin-Feldman Testi yerine kullanılabileceği tartışılmıştır. Ayrıca serumlar, toksoplazmozisin ülkemizdeki durumu yönünden de incelenmiştir.

Bu çalışmanın yapılmasına önyak olan Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji Profesörü Dr. Ekrem Gülmezoğlu'na, toksoplazma suşunu Danimarka'dan gönderen Parazitoloji ve Viroloji Bölümü Başkanı Dr. J. C. Siim'e ve Amerika'dan standart serumları göndermek lütfunda bulunan Bulaşıcı Hastalıklar Merkezi, Parazitoloji Başkanı Dr. Kenneth W. Walls'a teşekkür ederim.

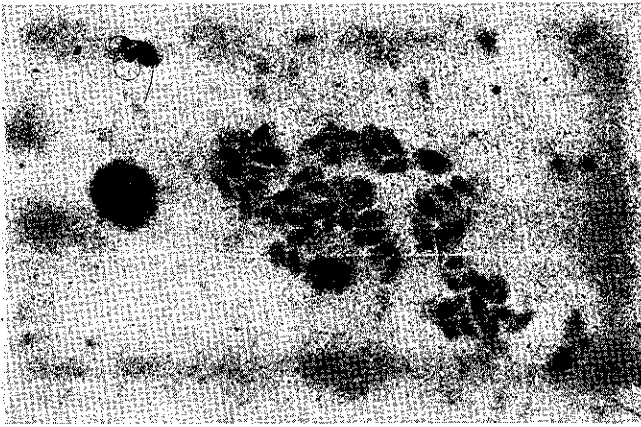
İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sahife</u>
GENEL BİLGİ	1-7
MATERYAL VE METOD:	8-15
Sabin-Feldman Testi	8-10
Pasif Hemaglütinasyon	11-14
İndirekt Floresan Antikor Tekniği	14-15
B U L G U L A R	16-20
Test Sonuçlarının Karşılaştırılması	16-18
Toksoplazma Antikorlarının Ülkemizdeki Yaygınlığı	19-20
TARTIŞMA VE SONUÇ	21-26
Ö Z E T	27-28
K A Y N A K L A R	29-34

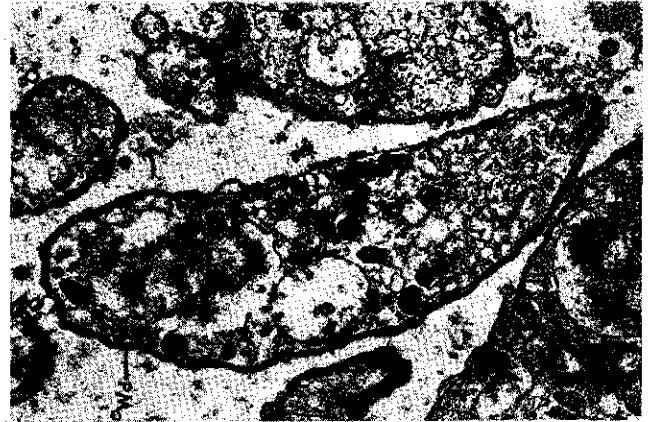
G E N E L B İ L G İ

Toksoplazma enfeksiyonlarının etkeni olan "Toxoplasma gondii", ilk kez 1908 senesinde Nicolle ve Manceaux tarafından Tunus'ta "gondii" denilen bir kemiriciden izole edilmiştir. Parazit yarım ay ya da muz şeklindedir. Oldukça büyüktür; 2-4 mikron eni, 4-8 mikron boyu vardır. Giemsa ve Wright boya ile iyi boyanır. Stoplazması mavi, çekirdeği kırmızı renk alır, (Şekil 1.a, b.). Parazit konuk olduğu hayvan türüne ya da içinde bulunduğu organa göre biraz şekil değiştirir.^{1,2} Aynı zamanda zorunlu hücre-içi parazitidir. Genellikle bir protozoa olduğu kabul edilmektedir.³ T.gondii'nin üreyebileceği yapay bir besiyeri bulunamamıştır. Yalnız deney hayvanları⁴, döletli yumurta⁵, ve doku kültürlerinde⁶ üretilebilmektedir. Parazit dış etkilere dayanıklı değildir. Bilinen antiseptikler, kuruluk ve yüksek ısı organizmayı çabucak öldürür.⁷

T.gondii ne özel bir konakçı, ne de vücuda yerleşirken özel bir organ seçmez. En çok görüldüğü yerler R.E.S., akciğer, beyin, kas ve sinir hücreleridir.^{8,9} Parazitin konakçı hücrelerine ne şekilde zarar verdiğini bilmiyoruz. Toksoplazma enfeksiyonlarında organizmin salgıladığı toksotoksinin rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bazılarına göre böyle bir toksin yoktur. Ancak, hücre içinde sayıca artan parazitlerin mekanik basınçla hücreyi parçaladığı sanılmaktadır.¹⁰



Şekil 1.a.
T.gondii, fare periton sıvısından,
Giemsa ile boyanmıştır.



Şekil 1.b
T.gondii, fare beynindeki kistten
E/M resmi, (kaynak 2 den alındı).

Hayvan ve insanlar üzerinde yapılan serolojik ve parazitolojik çalışmalarda enfeksiyonun yaygın bulunmasına karşılık, hastalık halinin sık olmadığına inanılmaktadır.¹¹ Hayvanlara toksoplazma türlü yollardan bulaştırılabilir. Parazitin şırınga edilmesiyle bir kaç gün içinde parazitemi meydana gelir. Bu durum fare, tavşan, köpek ve tavuklarda gösterilmiştir.¹⁰

Toksoplazmozisin başlıca şu şekilleri vardır:

1. Akut enfeksiyon: Bu tipte parazitemi vardır ve dokularda organizmin proliferatif şekli bulunur.

2. Subakut enfeksiyon: Bu şekilde parazitin proliferasyonu merkezi sinir sisteminde uzun zaman sürer.

3. Kronik enfeksiyon: Beyinde parazitin kistik şekli bulunur. Bunlar patlayınca açığa çıkan proliferatif şekiller, yakın hücrelere girerek yeni kistler meydana getirirler.¹² İnsanlarda görülen toksoplazma enfeksiyonları şu şekilde sınıflandırılabilir:

I. Doğuştan Toksoplazmozis

a. Nörolojik belirti verenler: Bu belirtilerin, bebeğin anakarnında geçirdiği enfeksiyona ait olduğu sanılmaktadır.¹³ Bu gruptaki, hastaların %94 ünde korioretinitis tesbit edilmiştir. Ayrıca kol-bacak kasılması, beyin-içi kireçlenme, hidro ve mikrosefali başlıca belirtilerdendir.

b. Genelleşmiş belirti verenler: Anemi, karaciğer-dalak büyüklüğü, sarılık ve lenfadenopati bu grubun belirtileridir.

c. Belirtisiz enfeksiyonlar: Hiç bir klinik belirti vermeyen, fakat serumlarında belirli titrede toksoplazma antikoru bulunan gruptur.

II. Sonradan-Kazanılan Toksoplazmozis

a. Ansefalitik şekil

b. Lenfadenitik "

c. Sistemik "

d. Uveitik "

e. Asemptomatik "

Bu şekillerden, lenfadenitik ve uveitik olanlara daha sık rastlanmaktadır.^{14,15}

Toksoplazma enfeksiyonu geçiren organizmada, antikorlar ve bağışıklık oluşmaktadır. Doğal olarak enfekte olan ya da avirulan bir suşla enfekte edilen deney hayvanları, sonradan virulan bir suşla karşılaştıklarında hastalığa oldukça direnç gösterirler.^{10,16} Fakat parazitler konakçının fagositik hücreleri içinde antikorların etkisinden korunup, canlı kalırlar. Yani toksoplazmalar bağışık hayvan vücudunda yaşayabilmektedirler. Bu durum kronik enfeksiyonları ve bu enfeksiyonlarda görülen geç parazitemilerin nedenini açıklamaktadır.

Eskiden beri sulfanomidlerin toksoplazmalar üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Fakat penisilin, streptomisin ve bilinen antiprotozoal ilaçların hiçbiri toksoplazmalara etki etmezler.¹⁷ Hastalığın tedavisinde başlıca iki ilaç kullanılmaktadır. Bunlar sulfadiazin ve pyrimethamine (Daraprin) dir. Daraprin özellikle oküler toksoplazmoziste kullanılmaktadır.¹⁸ Her iki ilaç da parazitin proliferatif tiplerine etkilidir. Onun için kistik şekillerin bulunduğu kronik enfeksiyonlarda hastalığı ilaçla kontrol altına almak mümkün olamamaktadır.¹⁹

İnsan ve hayvanlarda "en başarılı parazitliği" meydana getiren mikroorganizmlerden biri olan toksoplazmaların çeşitli ülkelerdeki dağılımı değişiktir. Serolojik metodlarla yapılan incelemelere göre enfeksiyonun türlü bölgelerdeki durumu şu sonucu vermiştir. Eskimolarda % 0, New-Orleans'ta %31, Tahiti'de % 68, Guetamala'da % 94.^{11,20,21} Enfeksiyonun uzak doğu ülkelerinde de yaygın olduğu bildirilmektedir.^{22,23} Enfeksiyon oranında seks bakımından bir fark bulunamamıştır. Ancak bazı araştırmalarda köylük ve kentlik bölgelerde hastalığın görülme sıklığında fark olmadığı,²⁴ bazılarınca ise fark olduğu ve köylerde daha sık bulunduğu anlaşılmıştır.^{25,26} Enfeksiyon özellikle iklim ile yakın bir ilgi göstermektedir. Sıcak ve nemli yerlerde sık görülürken, kuru ve denizden yüksek bölgelerde az rastlanmaktadır.²⁷ Çok soğuk yerlerde ise hemen hiç görülmez.¹¹

Serolojik metodlarla ya da izolasyon için yapılan çalışmalarda

çok geniş bir hayvan serisinde toksoplazmozis tesbit edilmiştir.^{10,28,29} Et yiyenlerden kedi,köpek ve domuzdan, ayrıca koyun,sığır ve kuşlardan toksoplazma izole edilebilmiştir.^{22,27,29,30} Denebilirki toksoplazma tesbit edilmeyen canlı,yok denecek kadar azdır.

Enfeksiyonun konjenital şekli ve laboratuvar kaza-enfeksiyonu dışında nasıl bulaştığı kesinlikle bilinmemektedir.Bu konu Jacobs¹⁰ ve Hartley²⁷ tarafından geniş olarak tartışılmıştır.Toksoplazmanın kistik şekli mide suyuna dayanıklı olduğundan,sonradan-kazanılmış tip enfeksiyonun enfekte etlerin yenilmesiyle meydana gelebileceği ileri sürülmüş - tür.Trişinozis vak'alarında toksoplazmozisin daha sık görülmesi^{bu} fikri kuvvetlendirmiştir.³¹ Ancak, et yemeyen toplumlarda da bu enfeksiyonun görülmesi,et yemenin hastalığın geçişinde tek yol olmadığını göstermektedir.³² Toksoplazmozisin evcil hayvanlarla yakın ilişkisi olanlarda sık rastlanması hastalığın direkt temasla bulaşabileceğini düşündürmüştür.³⁰ Nitekim Beverley,veteriner operatörlerde,hayvan kesim evlerinde çalışanlarda ve tavşan bakıcılarında yüksek titrede toksoplazma antikoru bulmuştur.³³ Murakami'nin Japonyada köpek bakıcılarında % 90 oranında toksoplazma antikoru bulduğu bildirilmekte ve önceki bulgu desteklenmektedir.²⁷ Toksoplazma kistleri,kronik olarak enfekte bulunan tavukların yumurtalıklarında gösterilmiştir.³⁴ Kistlerin ağız ve solunum yolu mukozası,konjunktiva ve vajinaya yerleşerek enfeksiyon meydana getirebildiği gösterilmiştir.²⁷ Cinsel birleşmenin enfeksiyonun bulaşmasında bir rolü olabilir. Fakat Beverley,kronik toksoplazmozis gösteren erkek farelerin çiftleşme ile enfeksiyonu dişilere bulaştırmadığını saptamıştır.³⁵ Parazitin kistik şekillerinin eklem bacaklı vektörlerle deriden geçebileceği ileri sürülmektedir.³⁶ Doğal enfeksiyonun da bu yolla bulaşma olasılığı vardır.

Konjenital toksoplazmoziste enfeksiyon,yavruya anakarnında geçmektedir.İnsanlardaki doğuştan sanılan bazı hastalıkların önceden var olan "gizli bir enfeksiyonun" alevlenmesiyle ortaya çıkabileceği de savunulmaktadır.³⁷ Ancak deneysel olarak saptanan tek buluşma yolu anakarnıdır.Beverley gebe fareleri toksoplazma kistleri ile enfekte ederek beşinci kuşağa

kadar doğan farelerde enfeksiyonu tesbit edebilmiştir.³⁵

Enfeksiyonun lkemizdeki durumuna gelince:Parazit ilk kez Akçay ve ark.tarafından bir Amerikalının kpeğinde grlmř³⁸, daha sonra Unat ve ark.tarafından bir insanın lenf düğümünde mikroskopik olarak tesbit edilmiştir.³⁹ Fakaelli'nin⁴⁰ ve Yenermen'in⁴¹ çocuklarda toksoplazma grdklerine ait ve Tüzmen'in⁴² Türkiye'de kronik toksoplazmik korioretinitis sorunu üzerinde yayınları vardır.Son zamanlarda Ekmen'in koyun ve sığır serumlarıyla yaptığı çalışmalar enfeksiyonun ülkemizde yaygın olduğunu göstermektedir.^{43,44}

Klinik belirtileri karışık olduğundan toksoplazmozisin teşhisi daha çok laboratuvar deneylerine dayanır.Bu amaçla kullanılan metodlar şunlardır:

I. D i r e k t M e t o d l a r

- a.Organizmin şüpheli maddeden izolasyonu
- b.şüpheli maddeden direkt mikroskobi

II. İ n d i r e k t M e t o d l a r

- a.Sabin-Feldman Testi
- b.Kompleman birleşmesi testi
- c.Pasif hemaglütinasyon "
- d.Floresan antikor tekniği
- e.Latex aglütinasyonu
- f.Direkt aglütinasyon
- g.Flokülasyon testi
- h.Presipitasyon testi

Enfeksiyonun kesin teşhisi parazitin izolasyonu ile mümkündür.

Ancak bu her zaman kolaylıkla yapılamamaktadır.Direkt mikroskobide ise parazit başkari ile kolaylıkla karıştırılabilir.Onun için serumdaki antikorların yükseldiğini göstermek, en çok kullanılan teşhis metodudur.Serumdaki antikorların tesbitinde kullanılan testlerin başında Sabin-Feldman testi gelir.^{45,46} Daha sonra kompleman birleşmesi testi,^{47,48} Pasif hemaglütinasyon,^{49,50} ve floresan antikor tekniklerinin^{51,52} kullanılması teklif edilmiştir.

Latex⁵³ ve direkt aglütinasyon,⁵⁴ flokulasyon⁵⁵ ve presipitasyon⁵⁶ testlerini ileri sürenler de vardır. Deri testi ise geçirilmiş enfeksiyonun bıraktığı aşırı duyarlılığı göstermektedir ve daha çok toplum çalışmalarında yararlı olmaktadır.^{57,58}

Sabin-Feldman Testi 1948 de Sabin ve Feldman tarafından bulunmuştur; esası şudur: Enfekte farenin periton sıvısından elde edilen toksoplazmalar normalde metilen mavisi ile boyanırlar. Fakat bunlar boya ile karıştırılmadan önce anti-toksoplazma serumu ile muamele edilirse, boyanma özelliğini kaybederler.⁴⁶ Antikorlar parazitin metilen mavisi ile boyanmasını önlemektedirler. Bu özellikten yararlanarak hasta serumundaki antikorların titresi bulunmaktadır. Bu test akut toksoplazmozis teşhisinde kullanılan en güvenilir testtir. Ancak canlı parazitlerle yapılması, aktivatör denilen yardımcı bir maddeye ihtiyaç göstermesi ve mikroorganizmlerin 3-4 günlük fare pasajları ile devam ettirilmesi gibi zorlukları, her laboratuvarda yapılabilmesini kısıtlamaktadır.⁵²

Ülkemizde de enfeksiyonun bulunduğu gösterildikten sonra, toksoplazmozise karşı ilgi artmaya başlamıştır. Fakat bugünkü laboratuvar koşullarında bu hastalığın teşhis edilmesi çok zor, hatta imkânsızdır. Nitekim Sabin-Feldman Testinin sadece Hacettepe ve Ankara Tıp Fakültesinde yapılabilmesi ve daha çok araştırma için kullanılması bunun bir kanıtıdır. Bunun yanında pasif hemaglütinasyon ve floresan antikor testleri ülkemizde her laboratuvarında kolaylıkla yapılabilecek testlerdir. Ancak her ikisi de teklif edildiklerinden buyana sonuçlarının standart Sabin-Feldman Testi ile uyummadığı gerekçesiyle rutin olarak kullanılamamaktadır. Bu konuda yeterince araştırma yapılmış değildir.

Bizim bu çalışmayı yapmaktaki amacımız toksoplazmozisin serolojik teşhisinde kullanılması teklif edilen pasif hemaglütinasyon ve floresan antikor testleri sonuçlarının standart Sabin-Feldman Testi sonuçları ile paralel gidip gitmediğini araştırmak ve buna göre ülkemizde kullanılabilir test seçip, geliştirmektir. Bunun için Ankara'da toksoplazmozis şüpheli olan ve olmayan toplam 338 insan serumunda üç test ile toksoplazma

antikorları aranmış, alınan sonuçlar karşılaştırılarak hangi testin Sabin-Feldman Testi yerine rutin olarak kullanılabileceği tartışılmıştır.

Ayrıca toksoplazmozisin ülkemizdeki durumuyla ilgili araştırmaların çok az olduğu -sadece iki yayın vardır- göz önüne alınarak 338 serum içinde toksoplazma antikorlarının bulunma sıklığı - üç testle karşılaştırmalı olarak - araştırılmıştır. Türkiye 'de toksoplazmozis konusunda bizim kullandığımız metodlarla , insan serumları üzerinde yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tezimizin bu bakımdan ileriki araştırmacılara yararlı olacağını umuyoruz.

.....

M A T E R Y A L V E M E T O D

Standart metodlarda değişiklikler yapıldığından, araştırmada kul-
landığımız teknikler burada ayrıntıları ile verilecektir.

SERUMLAR: Çalışmada toplam olarak 338 insan serumu kullanılmış
olup, bunlar üç gruba ayrılmıştır:

1. Şüpheli serumlar: Hacettepe hastanesinin kadın doğum, göz, çocuk
ve bulaşıcı hastalıklar bölümlerinden gelen, klinik olarak toksoplazmozis
düşünölen hastaların serumlarıdır, (138 adet).

2. Gelişmiş güzel seçilmiş serumlar: Aynı hastanenin klinik patoloji
laboratuvarına VDRL için gelen serumlardır, (150 adet).

3. Normal serumlar: Sağlam insanlardan toplanan serumlardır, (50-
adet). Serumların hepsi 56° C de yarım saat inaktive edilmiş ve kullanı-
lıncaya dek -20° C de saklanmıştır. Kullanılacağı zaman 1/16, 1/64 vel/256
oranında sulandırılmıştır.

SABİN-FELDMAN TESTİ : (SFT)

Standart teknik,⁵⁹ değiştirilerek uygulanmıştır.

1. Organizm: Danimarka , Statens Serum Institut 'den getirttiğimiz Toksop-
lazma gondii'nin RH suşu kullanılmıştır.

2. Deney hayvanı: Hem suşun devam ettirilmesi, hem de testler için 12-15
gramlık (35-45 günlük) Allington swisse albino fareleri kullanılmıştır.

3. Tamponlar: a) TTS-7.2: pH sı 7.2 olan tamponlu tuzlu su her üç testte de
kullanılmıştır. NaHPO_4 ve KH_2PO_4 dñn 0.15 M.lik solusyonları hazırlandı.⁵⁰
Bunlar 3:1 oranında karıştırılıp, karışım hacminin 3 katı tuzlu su (TS: %0.9
luk NaCl) ilâve edildi.

A	100 cc damıtık su	B	100 cc damıtık su
	2.04 gr. KH_2PO_4		2.145 gr. Na_2HPO_4
	25 cc A		100 cc AB
	<u>75 cc B</u>		<u>300 cc TS</u>
	100 cc AB		400 cc TTS-7.2

b) SBT-11: pH sı 11 olan soda boraks tamponu şu şekilde hazırlandı:

Stok solüsyonlar: a. % 0.53 Na_2CO_3
 b. % 1.91 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
 c. Alkolde doymuş metilen mavisi

a. 200 cc TS
 1.060 gr. Na_2CO_3
 b. 200 cc TS
 3.820 gr. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
 c. 100 cc Etil alkol
 10 gr. Metilen mavisi
 Bunlardan a ve b buz dolabında, c ise oda ısısında, karanlıkta saklandı.

SBT-11, günlük olarak aşağıdaki gibi hazırlandı:

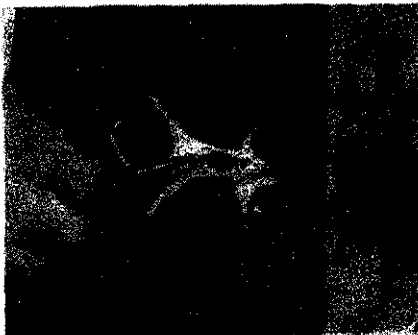
9.73 cc a
 0.27 cc b
 10 cc ab
 3 cc c

13cc SBT-11. Her seferinde pH sı ölçülmüştür.

4. Aktivatör: Hacettepe hastanesi kan bankasının devamlı kan vericilerinden 35 kişinin serumu denendi; içlerinden ikisi aktivatör olarak seçildi. Vericilerden 4 ay ara ile 100-150 cc kan alınıp serumu ayrıldı. 2 şer cc tüplere dağıtılıp -20°C ye kondu. 2 aydan eski serumlar kullanılmadı.

5. Kontroller: Her deneyde titresi belli müsbet ve menfi serumlar kullanıldı. Bu serumlar "Dr. K.W. Walls, National Communicable Disease Center, Atlanta, U.S.A" dan temin edilmiştir.

6. Toksoplazma suspansiyonun hazırlanması: 35-45 günlük 3 ya da 4 fareye üçüncü günde hastalık belirtileri meydana getirecek miktarda T.gondii periton içi yolla şırınga edilmiştir. Enfeksiyonun üçüncü gününde periton sıvısı % 3.8 lik sodyum sitrat eriyiği ile (100 cc TTS-7.2 ya 3.8 gr sodyum sitrat ilave edilerek hazırlandı) Şekil 2 a, b, c de görüldüğü gibi toplanmıştır.



Şekil 2.a
 Fare peritonunun iki pensle açılması.



Şekil 2.b
 Periton sıvısının pas-tör pipetiyle çekilmesi

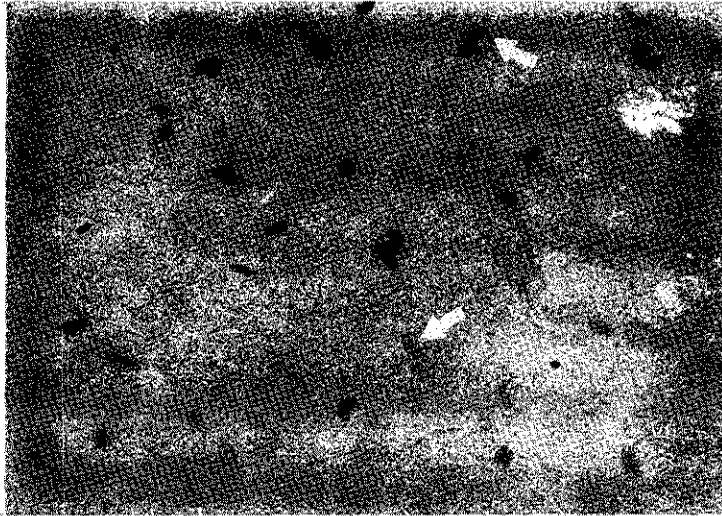


Şekil 2.c
 Periton sıvısının tüpte toplanması.

Önce akyuvar ayırımı için 500 devirde 5 dk çevrilmiş, sonra TTS-7.2 ile 1-2 kere yıkanmıştır. Çöküntü TTS-7.2 ile mikroskop alanında (400 büyütme ile) ortalama 50 organizm bulunacak şekilde sulandırılmıştır.

7. Testin yapılışı: Her serum için 10x100 mm lik üç tüp alınıp her birine sırasıyla 0.10 cc aktivatör, 0.05 cc ilgili serum sulandırımı ve 0.05 cc toksoplazma suspansiyonu konmuştur. Tüpler 37°C lik su banyosunda 30 dk enkübe edildikten sonra her tüpe metilen mavisi solusyonundan (SBT-11) 0.05 cc ilâve edilmiştir. 37°C lik su banyosunda 15 dk daha tutulduktan sonra okumaya geçilmiştir.

8. Testin okunması: Her tüpten bir damla sıvı bir lâm üzerine konup, üzeri lamelle kapatıldıktan sonra adi ışık mikroskopunda 400 büyütme ile incelenmiştir. Alanda görülen organizmlerin % 50 sinden çoğu boyayı almamış ise serumun o titresini müsbet olarak değerlendirilmiştir.^{59,60} Toksoplazmaların % 50 sinden çoğu boyanmışsa serum, menfi sayılmıştır. Her testte müsbet serumun iki sulandırımı, bir menfi ve bir aktivatör kontrolü yapılmış, bunlardan biri uygun sonuç vermediği zaman o test tekrarlanmıştır. (Şekil 3) de menfi halde toksoplazmalar görülmektedir. Okla işaretli iki tanesi boyayı almamıştır.



Şekil 3.

SFT ile menfi halde toksoplazmalar. Okla işaretli iki tanesi boyayı almamıştır.

PASİF HEMAGLÜTİNASYON TESTİ : (PHA)

Bu testin esası Jacobs ve Lunde'den alınmıştır.⁴⁹

1. Cam malzeme:PHA testinde kullanılacak cam malzemenin temizliğine ayrı bir önem verilmiştir.Sabunlanmış cam eşya bir gece sülfirik-dikromik asit karışımında bırakılmıştır.Yıkamanın son kademesinde damıtık sudan geçirilen malzeme, pastör fırınında kurutulmuş kullanılmıştır.

2. Tamponlar:PHTestinde şu tamponları kullandık:

a.TTS-7.2

c.NTS-TTS-7.2

b.TTS-6.4

d.TS (% 0.9 NaCl)

TTS-6.4 şu şekilde hazırlandı: TTS-7.2 hazırlanırken (Lütfen sayfa 8 e bakınız) artakalan A ve B solusyonları bu kez 1:3 oranında karıştırıldı.

75 cc A
25 cc B
 100 cc AB

100 cc AB
300 cc TS
 400 cc TTS-6.4

NTS-TTS-7.2:Normal tavşan serumlu tampondur.Toksoplazma antikoru ihtiva etmediği gösterilen tavşan serumu,kobay alyuvarı ile absorbe edildikten sonra -20°C de saklandı.Kullanılacağı zaman 100 cc TTS-7.2 ye 0.5 cc katı olarak % 0.5 lik NTS-TTS-7.2 hazırlandı.

3. Alyuvarlar:Çalışmamızda kobay alyuvarı kullanılmıştır.Kobayın kalbin den 5 cc kan alınıp,heparinli bir tüpe kondu.1500 devirde 10 dk çevrilmek suretiyle üç kere TTS-7.2 ile yıkandı.Son çevirmedeki alyuvar çöküntüsünden 1 cc alındı,40 cc TTS-7.2 içine konarak % 2-2.5 luk suspansiyon hazırlandı.Araştırma boyunca alyuvar konsantrasyonunu sabit tutmak amacıyla her seferinde optik dansite tayini yapıldı: 1 cc alyuvar suspansiyonu 5 cc damıtık suda eritildi ve kolorimetride 560 milimikronda optik dansitesi ölçüldü.0.5-0.6 ,O.D. veren suspansiyonlar testte kullanıldı.

4. Antijen:Fare peritonunda çoğaltılan toksoplazmalardan aşağıdaki şekilde hazırlandı:100-150 fareye 4. günde öldürecek miktarda T.gondii,(0.2 cc) periton içi yolla şırınga edildi.Enfeksiyonun 3. gününde periton sıvıları % 3.8 lik sonyum sitrat ile toplandı ve 2 kere soğuk TTS-7.2 ile yıkandı.(Kanlı periton sıvıları kullanılmadı)Sonra akyuvar ayırımı yapıldı.Bunun için iki metod geliştirildi.a.Periton sıvısındaki akyuvarları parçalamak

amacıyla % 0.1 den % 0.9 a kadar NaCl eriyikleri hazırlandı. Her birine eşit miktarda toksoplazma suspansiyonu ilâve edildi. Çeşitli zaman aralıklarında akyuvarların ve toksoplazmaların parçalanma durumları incelendi. % 0.4 lük NaCl eriyiği akyuvarların daha çok parçalandığı, fakat toksoplazmaların sağlam kaldığı eriyik olarak seçildi. b: Periton sıvısındaki akyuvarları ayırmak için suspansiyon içindeki akyuvar miktarına ve kullanılan tüpün uzunluğuna göre 20-40 dk dikey olarak soğukta bekletildi. Bu şekilde sıvının üst kısmından oldukça saf toksoplazma elde edildi. Araştırmamızda bu metod kullanıldı. Antijen hazırlamak için de üç metod denenmiştir:

1. Yukardaki şekilde akyuvardan temizlenen toksoplazma suspansiyonu darası alınmış bir tüpe kondu. 2000 devirde 15 dk çevrildikten sonra tüp tartılarak, toksoplazmanın yaş ağırlığı bulundu. Sonra bu tüpe toksoplazma ağırlığınının 10 katı soğuk damıtık su ilâve edildi. Bir gece buz dolabında bekletildikten sonra üzerine konan damıtık su kadar % 1.7 lik -çift kuvvetli-TS ilâve edilerek eriyiğin izotonisitesi sağlandı.⁴⁹ Bu sıvı ultra santrifüj ile 30.000 devirde 60 dk çevrildi. Üst kısmı antijen olarak kullanılmak üzere -20°C ye kaldırıldı.⁵⁰

2. İzotonisitesi sağlanan toksoplazma antijeni 8-10 kere dondurulup-çözülerek işleme devam edildi.

3. Yaş ağırlığı bulunan toksoplazmaların üzerine, ağırlığın 20 katı TTS-7.2 ilâve edilip, parazitler ultrasonik vibrasyonla parçalandı.⁶¹ Bunun için Ankara Tıp Fakültesindeki "Branson Sonifier Model S 75" aleti kullanıldı. Kısa ve kalın çeperli bir tüp içinde 5-10 cc lik suspansiyon, buzlu ortamda 7 KC de 2-4 dk işleme tabi tutuldu. Sonra 30.000 devirde 60 dk çevrilerek üst sıvı antijen olarak ayrıldı. Araştırmamızda PHA testi yapılırken daha çok tarafımızdan geliştirilen 2. şıktaki karma metod kullanıldı.

5. Serumlar: Önceden inaktive edilmiş serumlar PHA testinde kullanılırken 56°C de 10 dk daha inaktive edildi. Ayrıca bazı serumların kobay alyuvarı ile absorpsiyonu yapıldı.

6. Tannik asit: Önce tannik asidin (Merck) % 1 lik solusyonu stok olarak hazırlandı. Test yapılacağı gün stoktan TTS-7.2 ile 1/20.000 lik eriyik hazırlandı.

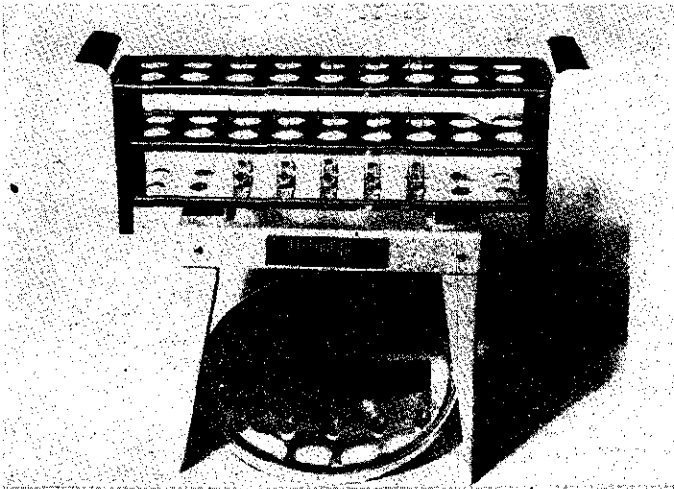
Elde edilen bu sulandırım, daima günlük olarak kullanıldı.

7. Teste hazırlık: a) Alyuvarların tannik asitle duyarlaştırılması: % 2 lik 5 cc kobay alyuvarı 1:20.000 lik 5 cc tannik asitle karıştırılıp, 37°C lik su banyosunda 15 dk bekletildi. Bundan sonra 1200 devirde 10 dk çevrilerek, çöküntü TTS-7.2 ile bir kere yıkandı ve sonunda 5 cc TS ile sulandırıldı.

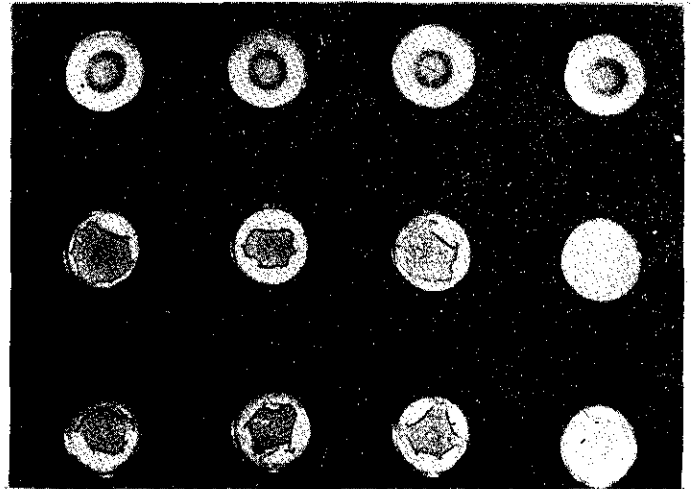
b) Duyarlı alyuvarlara antijen yapıştırılması: Bir tüpe sırasıyla 8 cc TTS-6.4, 2 cc antijen, ve 2 cc duyarlı alyuvar kondu. Karıştırıldıktan sonra oda ısısında 15 dk bekletildi. Sonra 1200 devirde 10 dk çevrilerek, iki kere NTS-TTS-7.2 ile yıkandı. Sonunda 2 cc NTS-TTS-7.2 ile sulandırıldı.

8. Testin yapılışı: PHA testi için serumlar NTS-TTS-7.2 ile sulandırıldı. 10x100 mm lik tüplere ilgili sulandırımlardan 0.5 şer cc kondu. Üzerine 0.05 şer cc antijen yapıştırılmış alyuvar ilâve edildi. Hafife sallanan tüpler 37°C lik etüve kaldırıldı. 2 saat bekletildikten sonra okundu. Her de - neyde normal, tannik asitli ve antijen yapıştırılmış alyuvarların kontrol - leri yapıldı.

9. Testin okunması: Tüplerin dip kısmı ya Şekil 4, a da görülen ayna yardımı ile ya da tüplüğü yukarı kaldırarak incelendi. Okuma Stavitsky'e göre yapıldı.⁶² Şekil 4. b de 4+, 3+, 2+ ve menfi sonuçlar görülmektedir.



Şekil 4.a
PHA testinin yapıldığı tüplük ve okunmasına yarayan ayna.



Şekil 4.b
PHA testindeki müsbet ve menfi görünüşler. Üst sıra menfi, alt sıra müsbettir. Orta sıranın en sağındaki tüp iki müsbettir.

10. Araştırmaya geçmeden önce PHA testinde kullanılmak üzere hazırladı - ğımız antijenin standartlaştırılması gerekmiştir. Çünkü farklı zamanlarda değişik metodlarla hazırlanan antijenlerin antijenik kuvveti farklı çıkmıştır. PHA testinin araştırma boyunca standart olabilmesi için hazırladığımız her yeni antijenin aşağıdaki şekilde en uygun sulandırımı bulundu. Antijen 1/100, 1/200, 1/800 e kadar sulandırıldı. Her sulandırım, titresi bizce bilinen müsbet ve menfi serumlar kullanılarak hemaglutinasyon yapıldı. Antijenin en uygun sulandırımı (sayfa 12 de anlatılan) hazırlanış tekniğine göre 1/40 ile 1/400 arasında değişti.

PHA testinde kobay alyuvarlarının da kullanılabileceği görüldü. Test yapıldıktan sonra tüplerin 37°C de enkübe edilmesinin hemaglutinasyonu çabuklaştırdığı anlaşıldı. Ayrıca testte kullanılan tüplerin çapı küçüldükçe - 10x100 mm yerine, 7x100 mmlik tüp kullanılırsa - aglutinasyonun daha çabuk meydana geldiği görüldü.

FLORESAN ANTİKOR TEKNIĞİ: (FAT)

Çalışmamızda ,indirekt floresan antikör tekniği (İFAT) kullanıldı.⁵¹

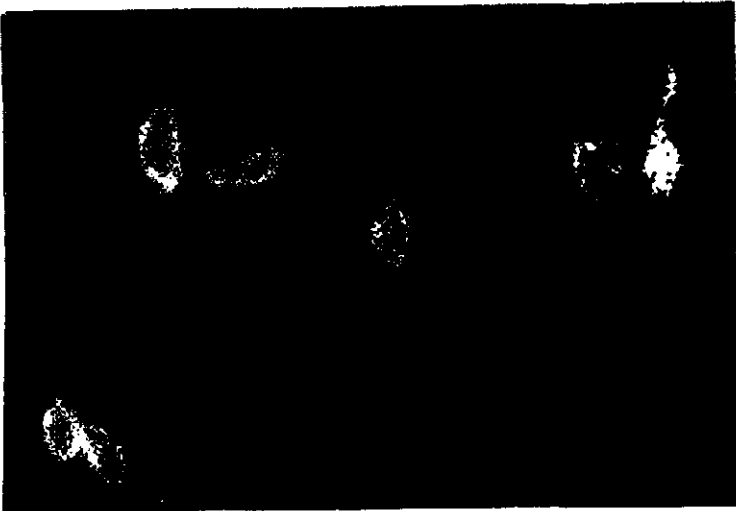
1. Toksoplazma suspansiyonunun hazırlanması: Akyuvar ayırımı yapılmış toksoplazma suspansiyonundan 1 cc alınıp, 9 cc % 1 lik formaldehit (TS içinde) ile karıştırıldı ve oda ısısında 30 dk bekletildi. 1500 devirde 10 dk çevrilerek elde edilen çöküntü 1 cc TTS-7.2 ile sulandırıldı.
2. Preparatların hazırlanması: FAT için özel lâmlar üzerine üç daire çizildi, her birine pastör pipeti ile bir damla toksoplazma suspansiyonu damlatılıp, daire içine yayıldı. Oda ısısında ya da etüvde kurutuldu. ve hemen kullanılmayacak olanlar -20°C ye kaldırıldı.
3. Serumlar: SFT için hazırlanan serumlar kullanıldı.
4. İşaretli serum: (Konjuge serum) Fluorescein isothiocynat ile işaretlenmiş (boyanmış) anti-insan gama globulini Difco Firmasından temin edildi. (katolog No: 2449-59, Bacto-FA Human globulin, Anti-globulin (rabbit) dir.) Çalışmamızda bu antiserumun 1/20 lik sulandırımı kullanıldı.
5. Mikroskop: Wrihart'ın Osram HB 200, civa buharlı lâmbalı mikroskobu kullanıldı. Preparatlar BG 12, OG 1 filtreleri ve aydınlık alan kondansörü kullanılarak incelendi.

6. Testin yapılması: Hazırlanan preparatların işaretli yerlerine 1/16 , 1/64, ve 1/256 serum sulandırımından birer damla kondu. Sonra lâmlar, içinde ıslak süzgeç kağıdı bulunan petri kutularına yerleştirildi, ve oda ısısında 30 dk bekletildi. Ardından TTS-7.2 ile 3 dk da bir suyu değiştirilmek suretiyle 10 dk yıkandı. Oda ısısında kurutulduktan sonra, tekrar petrilere yerleştirildi ve her daireye bir damla işaretli serum damla - tıldı. Oda ısısında 30 dk daha bekletildikten sonra yukardaki şekilde yıkandı. Yalnız son yıkama soğuk damıtık su ile yapıldı. Hemen okunmayacak preparatlar buz dolabına kaldırıldı.

7. Testin okunması: Preparatlar immersiyon objektifi ile incelendi. Mikroskop alanında, ortası hafif çevresi parlak floresan hâleli tipik toksoplazma şekli veren organizmlerin görülmesi, müsbet olarak değerlendirildi.

(Şekil 5) te İFAT ile müsbet halde toksoplazmalar görülmektedir. Çevresel boyanma vermeyen, soluk ya da kutupsal boyanan organizmlerin görülmesi menfi kabul edildi.

8. İFAT araştırmada kullanılmadan önce işaretli serumun "en uygun" şekilde sulandırılması gerekmiştir. İşaretli serum sulandırılmadan kullanıldığında, toksoplazma antikoru ihtiva etmediğini bildiğimiz -menfi- serumla yapılan test, müsbet sonuç veriyordu. Bu sorun şu şekilde çözüldü: İşaretli serum 1/5, 1/10 dan 1/40 a kadar sulandırıldı. Titresi belli müsbet serumla, müsbet sonuç veren ve aynı zamanda menfi serumla menfi sonuç veren sulandırım, 1/20 olarak bulundu. Çalışmamızda işaretli serumun 1/20 sulandırımını kullanmamızın nedeni budur.



Şekil 5.
İFAT de müsbet halde
toksoplazmalar.

B U L G U L A R

I. Test Sonuçlarının Karşılaştırılması :

Her üç testte de serumların 1/16 sulandırımı müsbetlik için alt sınır olarak kabul edildi. Araştırmada kullanılan 338 serumun üç testle sadece müsbet ve menfi olarak alınan sonuçları, tablo 1,3,5 te ikişer ikişer karşılaştırılmıştır. Serumların üçsulandırımı ile her üç testle alınan sonuçlar ise tablo.2,4,6 da özetlenmiştir.

1. SFT ile PHA sonuçlarının karşılaştırılması :Tablo 1 de görüldüğü gibi 338 serumun 194 ü her iki testle menfi bulunmuştur. İkişer de müsbet sonuç veren 104 serum vardır. Bunların 72 sinde iki testle aynı titre tesbit edilmiştir, (tablo 2). Müsbet olupta titreleri arasında fark olan serum sayısı da 72 dir. Bunlardan 62 sinde PHA ile bir üst titrede müsbetlik, 7 serumda SFT ile bir üst titrede müsbetlik bulunmuştur. 3 serumla ise PHA ile iki üst titrede müsbetlik tesbit edilmiştir. PHA ile 1/16 müsbet okuduğumuz 33 serum SFT ile menfi, SFT ile 1/16 müsbet olan 4 serum PH testinde menfi bulunmuştur. Bu duruma göre serumların titreleri göz önüne alınmadan, müsbet ve menfi olarak 338 sonucundan 298 inde her iki test ile birbirine uygun sonuç alınmıştır. Bu, % 88.1 uygunluğu ifade eder, (tablo 1).

İstatistik olarak (Khi kare analiziyle) SFT ve PHA testi arasında bağımsızlık kontrolü yapılmış, $p < 0.05$ bulunmuştur.

		P H A	
		Müsbet	Menfi
SFT	Müsbet	104	4
	Menfi	36	194

Tablo 1.

338 serumun sulandırılmaları dikkate alınmadan SFT ve PHA ile alınan sonuçların karşılaştırılması. $p < 0.05$

		P H A			
		Menfi	1/16	1/64	1/256
SFT	Menfi	194	33	3	
	1/16	4	34	22	
	1/64		2	27	7
	1/256			1	11

Tablo 2.

338 serumun üç sulandırımından SFT ve PHA ile alınan sonuçların karşılaştırılması.

2.SFT ile İFAT sonuçlarının karşılaştırılması :

İncelenen 338 serumdan 92 si her iki testle müsbet,207 tanesi her ikisiyle de menfi bulunmuştur,(tablo 3).Müsbet olan 92 serumdan 70 tanesinde her iki testle aynı titre tesbit edilmiştir,(tablo 4).Müsbet olduğu halde titreleri arasında fark bulunan 61 serum vardır.Bunlardan 31 inde İFAT ile bir üst titrede müsbet,20 serumda ise SFT ile bir üst titrede müsbetlik tesbit edilmiştir.Geri kalan 7 serumun 5 inde İFAT ile iki üst titrede müsbetlik, 2 sinde ise SFT ile iki üst titrede müsbet sonuç alınmıştır.İFAT ile 1/16 müsbet okuduğumuz 20 serum SF testinde menfi SFT ile 1/16 müsbet olan 14 serum İFAT ile menfi bulunmuştur.Bu duruma göre müsbet serumların titreleri dikkate alınmadan,müsbet ve menfi olarak 338 serum sonucundan 299 unda her iki test ile birbirine uygun,39 unda ise farklı sonuç elde edilmiştir,(tablo 3).Bu sonuç % 88.4 uygunluğu ifade eder.

İstatistik olarak iki test arasında yapılan bağımsızlık kontrolü , $p < 0.05$ sonucunu vermiştir.

		İFAT	
		Müsbet	Menfi
SFT	Müsbet	92	16
	Menfi	23	207

Tablo 3.

338 serumun sulandırılmaları dikkate alınmadan, SFT ve İFAT ile alınan sonuçların karşılaştırılması. $p < 0.05$

		İ F A T			
		Menfi	1/16	1/64	1/256
SFT	Menfi	207	20	3	
	1/16	14	38	5	2
	1/64	2	7	22	6
	1/256			2	10

Tablo 4.

338 serumun üç sulandırımından SFT ve İFAT ile alınan sonuçların karşılaştırılması.

3. PHA ile İFAT sonuçlarının karşılaştırılması :

(Tablo 5)te görüldüğü gibi 338 serumdan 184 ü her iki testle menfi bulunmuştur.İki testle müsbek sonuç veren 101 serum vardır. Bunların 68 inde iki testle aynı titre tesbit edilmiştir,(tablo 6).Müsbet oldukları halde titreleri arasında fark bulunan 86 serum vardır.Bunlardan 21 inde İFAT ile bir üst titrede , bir tanesinde iki üst titrede müsbetlik,geri kalan 59 unda PHA testinde bir üst titrede , 5 tanesinde iki üst titrede müsbetlik bulunmuştur. PHA testi ile 1/16 müsbet okuduğumuz 34 serum İFAT ile menfi , fakat aynı testle müsbet okunan 13 serumda PHA testinde menfi bulunmuştur. Müsbet serumların titreleri göz önüne alınmadan, müsbet ve menfi olarak 338 serum sonucundan 285 inde her iki test ile birbirine uygun sonuçlar alınmıştır.Bu durum, % 84.3 uygunluğu göstermektedir,(tablo 5).

İstatistik olarak iki test arasında yapılan bağımsızlık kontrolü, $p < 0.05$ sonucunu vermiştir.

		İFAT	
		Müsbet	Menfi
PHA	Müsbet	101	39
	Menfi	14	184

Tablo 5.

338 serumun sulandırılmaları dikkate alınmadan, PHA ve İFAT ile alınan sonuçların karşılaştırılması. $p < 0.05$

		İ F A T			
		Menfi	1/16	1/64	1/256
PHA	Menfi	184	13	1	
	1/16	34	32	2	
	1/64	5	18	25	6
	1/256			7	11

Tablo 6.

338 serumun üç sulandırımından PHA ve İFAT ile alınan sonuçların karşılaştırılması.

4.Ayrıca üç test ikişer ikişer gruplar halinde karşılaştırılmış ve gruplar arasındaki farkın önemli olup olmadığı araştırılmıştır.İstatistik analizde SFT-PHA, SFT-İFAT ve PHA-İFAT grupları arasındaki farkın önemsiz olduğunu gösteren $p > 0.05$ değeri bulunmuştur,(tablo 7),

TEST GRUPLARI	Her iki testle titreleri		TOPLAM
	aynı çıkan serum sayısı	farklı çıkan serum sayısı	
SFT-PHA	266	72	338
SFT-İFAT	277	61	338
PHA-İFAT	252	86	338

Tablo 7.
SFT-PHA , SFT-İFAT ve PHA-İFAT gruplarının herbiri ile 338 serumdan alınan sonuçların karşılaştırılması.

II. Toksoplazma Antikorlarının Ülkemizdeki Yaygınlığı :

Şüpheli,gelişi güzel seçilmiş ve kontrol grubu serumları ile her üç testle alınan sonuçlar(tablo 8)de sunulmuştur.Üç testte de 1/16 serum sulandırımı müsbetlik için sınır kabul edilmiştir.Buna göre toplam olarak 338 serumda SFT ile % 31.9, PHA ile % 41.4, İFAT ile %34.0 müsbetlik elde edilmiştir.

SERUMLARIN KAYNAĞI	TEST SAYISI	S F T			P H A			İ F A T		
		Müsbet	Menfi	Yüzde	Müsbet	Menfi	Yüzde	Müsbet	Menfi	Yüzde
Toksoplazmozis şüpheli.	138	53	85	38.4	68	70	49.2	56	82	40.5
Gelişi güzel seçilmiş	150	45	105	30	55	95	36.6	50	100	33.3
Kontrol	50	10	40	20	17	33	34	9	41	18
TOPLAM	338	108	230	31.9	140	198	41.4	115	223	34

Tablo 8. Üç grup insan serumunda SFT,PHA,İFAT ile alınan sonuçların karşılaştırılması.

(Tablo 8)de görüldüğü gibi serum gruplarının her birinde üç testle elde edilen sonuçlar değişiktir. Toksoplazmozis şüpheli 138 serumda SFT ile % 38.4, PHA ile % 49.2, İFAT ile % 40.5 müsbetlik bulunmuştur. Gelişi güzel seçilmiş 150 serumdaki müsbetlik oranı üç testle, sırasıyla % 30, % 36.6, % 33.3 tür. 50 normal insan serumunda ise SFT ile % 20, PHA ile % 34.0, İFAT ile % 18 müsbetlik tesbit edilmiştir. Toksoplazmozis şüpheli, gelişmiş, ve kontrol grupları arasındaki müsbetlik farkı, üç testle de -istatistik olarak- önemli bulunmuştur, (tablo 8). $p > 0.05$

.....

T A R T I Ő M A V E S O N U Ğ

Toksoplazma gondii ve yaptığı enfeksiyonlar hakkında birçok çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, bu konuda hâlâ çözülmemiş sorunlar vardır. En başta, enfeksiyonun -anadan çocuğuna geçişi hariç- nasıl bulaştığı kesinlikle bilinmemektedir.²⁷ İkinci olarak, etkili bir tedavi yolu bulunamamıştır.^{17,18,19} Ayrıca hastalığın teşhisi her yerde yapılamamaktadır.^{49,52} Toksoplazmozisin belirtileri çok karışık olduğundan teşhisi için daha çok serolojik testlere baş vurulur. Sabin-Feldman Testi, 1948 den beri bu amaçla standart bir test olarak kullanılmaktadır.^{46,59} "Boya testi" de denilen bu test, toksoplazmozis için özgül, ve duyarlıdır.^{19,49,63} Fakat SFT , teknik yönden bazı zorluklar arz etmektedir.^{49,52,}
⁵⁴ Her laboratuvar da kullanılmasını kısıtlayan nedenleri şu şekilde sıralayabiliriz: a. Canlı parazitlerle çalışma zorunluluğu, enfeksiyona yakalanma riski taşır. b. Parazitin 3-4 günlük fare pasajları ile devam ettirilmesi gerekir. c. Fare periton sıvılarının üçüncü günde toplanması ve bu organizmlerin fareden alındıktan sonra bir saat içinde kullanılma zorunlulukları vardır. d. Test mikroskopik olarak okunur ve doğru okuma, göz alışkanlığı isteyen bir iştir. e. Testin yapılabilmesi için aktivatör denilen bir "yardımcı faktöre" ihtiyaç vardır. Bu maddeyi ihtiva eden normal insan serumu bulmak güçtür. Aktivatör, komplemana benzer bir madde olup ısıya duyarlıdır ve dondurularak saklandığında en fazla 1-2 ay kullanılabilir.⁴⁶

SFT diğer serolojik testlerle karşılaştırıldığında, kompleman birleşmesi testine (KBT) göre daha erken müsbet olan ve müsbetliği daha uzun süre devam eden bir testtir.^{10,47,48} KBT hastalığın başlamasından sonra bir ay içinde müsbet olmamakta ve antikorlar düşük titrede kalmaktadır. Bundan ötürü KBT nin menfi çıkması enfeksiyonun bulunmadığını göstermez.⁴⁶ Deri testinin, akut toksoplazmozis teşhisinde hiçbir değeri yoktur. Çünkü akut enfeksiyona yakalanmış kimselerde deri testinin 4 ay ya da daha sonra müsbetleştiiği gösterilmiştir.^{19,46}

Direkt aglütinasyon testi ,Fulton tarafından denenmiş fakat normal serumlarla müsbet sonuç verdiği için,başka araştırmacılar tarafından ele alınmamıştır.⁵⁴Flokülasyon⁵⁵ ve presipitasyon⁵⁶ testleri üzerinde de fazla çalışılmamıştır.

Pasif hemaglütinasyon testi, canlı parazitlerle çalışma ve mikroskopik okuma zorunlulukları olmayışıyla dikkati çekmektedir.⁴⁹ Ancak SFT ile sonuç uygunluğu % 55 ten⁶⁴, % 100 e⁶⁵ kadar değişmektedir. Bazılarınca PHA testinde SFT ye göre daha yüksek titrede müsbetlik elde edilmektedir.⁶⁶ Diğer bazılarına göre, SFT de daha yüksek titrede müsbetlik bulunmaktadır.⁶⁷ Fakat, PHA nın duyarlı bir test olduğunu kabul edenler çoğunluktadır.^{49,50,66,67}

Bizim çalışmamızda, SFT ile PHA sonuçları arasında % 88.1 uygunluk bulunmuş ve iki test arasında bağ olduğu istatistik olarak da gösterilmiştir. Müsbet serumların titreleri arasındaki farklar incelenmiş ve bu farkların sadece 3 serumda, bir üst sulandırım oranından fazla olduğu görülmüştür. Örneğin PHA ile 1/64 müsbet olan 3 serum SFT ile menfi bulunmuştur. (Tablo 2) de görüldüğü gibi, iki test arasında^a titre farkı olan 72 serumdan 65 tanesinde PHA ile daha yüksek titrede müsbetlik alınmıştır. Çalışmamız Lunde ve ark.nın⁶⁶ bulgusunu bu yönden desteklemektedir.

PHA testinde müsbet sınırın değişmesinde etkili olan en önemli faktör, kullanılan antijenin kuvvetidir. Deneysel bulgularımıza göre, bir toksoplazma suspansiyonu ne kadar çok akyuvar ihtiva ediyorsa, ondan hazırlanan antijen o kadar zayıf olmaktadır. Bu hususu Jacobs ve Lunde de belirtmişlerdir.⁴⁹ Onun için çalışmamızda akyuvar ayırımına önem verilmiş ve bu amaçla iki metod geliştirilmiştir. Akyuvarları parçalama işlemi, biraz da toksoplazma kaybına sebep olduğu için, araştırmada suspansiyonu bekleterek akyuvarları çöktürme usulü tercih edilmiştir. Hazırlanan antijenin "en uygun sulandırımını" bulmak bir zorunluluktur. Çünkü bu işlem yapılmadığı takdirde, aynı serumla yapılan testler, antijenin zayıf veya kuvvetli oluşuna göre düşük ya da yüksek titre vermektedir.

Sonuç uygunsuzluklarının başlıca nedeni bu olsa gerektir. Hemaglutinasyon antijeninin uzun süre saklanabildiği gösterilmiştir. Antijen buz dolabında 3 hafta, -20°C de bir yıl bozulmadan kalmakta ve liyofilize edilebilmektedir.⁶⁸ Bugüne kadar, hemağlutinasyon antijeni koyun,^{49,66} ve insan^{50,67} alyuvarlarına yapıştırılarak test yapılmıştır. Bizim kan aldığımız koyunların-belkide fazla deneye girdiklerinden-alyuvarları çabuk hemolize olmaktadır. Bunun için kobay alyuvarlarını denedik ve iyi sonuç verdiğinden araştırmamızda kullandık.

Toksoplazmozis teşhisinde floresan antikor tekniğini ilk kez Goldman kullanmıştır.⁶⁹ Bu çalışmada floresan antikor direkt inhibisyon tekniği uygulanmış ve SFT ile a^arlarında % 83 uygunluk bulunmuştu. Bundan sonraki araştırmalarda , iki test arasında % 97.5,⁷⁰ % 95.0⁷¹ ve % 92.5⁷² gibi uygun sonuçlar alınmıştır. Ancak bazı araştırmacılar İFAT de, SFT den daha yüksek titrede müsbetlik bulmuşlardır.⁷⁰ Diğerlerinde ise SFT ile daha yüksek titrede müsbetlik elde edilmiştir.^{71,73} Bizim çalışmamızda iki test sonuçları arasında % 88.4 uygunluk bulunmuştur ve İFAT ile elde edilen bulgular daha yüksek titrededir, (tablo 3,4)

İFAT de müsbet sınırın değişmesinde etkili olan faktörlerin başında, işaretli serumun titresi gelmektedir. Hiç sulandırılmamış bir işaretli serum, normal insan serumu ile yapılan bir testte bile organizmleri boyamakta, fazla sulandırılmış işaretli serum ise parazitlerin daha çabuk soluklaşmasına sebep olmaktadır. Yani, fazla sulandırılmış bir işaretli serum , müsbet bir vak'ayı menfi göstermektedir. Bizce, çeşitli laboratuvarlar arasındaki titre farkları bu nedenden ileri gelmektedir. Literatürde bu hususa değinen sadece iki yayın vardır.^{52,72}

Sabin-Feldman Testinde menfi serumun okunması çok kolaydır. Çünkü organizmlerin çoğu maviye boyanır. Fakat müsbet veya şüpheli serumlarda toksoplazmaların hepsi veya bir kısmı boyayı almamışlardır. Taze bir preparatta boyanmamış parazitlerin görülmesi ve sayılması tecrube isteyen bir iştir. Floresan antikor testinde bunun aksine müsbet serumun tanınması daha kolaydır.

Organizmin etrafındaki parlak hâle hemen göze çarpar ve serum sulandırımı ilerledikçe soluklaşır. İFAT de canlı parazitlerle çalışılıyor sayılmaz. Lâm üzerine tesbit edilen antijen dondurularak saklanabilir. Preparatlar buz dolabında bir iki gün bekledikten sonra da okunabilir. SFT'nin yapıldığı gün okuma zorunluğu olduğu bildirilmektedir.^{59,60} Biz, -istatistik bir bulgu olmamakla beraber- ağız kapatılarak buz dolabında saklanan numunelerin 3-4 gün sonra da aynı sonuçları verdiğini gördük. Yine de araştırmamızda SFT hiç bekletilmeden okunmuştur.

Chordi ve ark. PHA testinin, antijen sulandırımı iyi yapılırsa tekrarlanabilir bir test olduğunu bildirmektedirler.⁷⁴ Sulzer ve ark. ise FAT nin aynı günde ve başka günlerde tekrarlandığında öncekilere uygun sonuç verdiğini -istatistik olarak - göstermişlerdir.⁷³ Halbuki SFT'de, teknik ayrıntılar ve özellikle aktivatör farklılıklarından ötürü bunu yapmak zordur. Kimball ve ark., aynı serumları değişik zamanlarda SFT ile denemişler ve serumların % 16 sında 4 katı, % 4 ünde ise 16 katı titre farkı bulmuşlardır.⁷⁵ Bununla beraber, SFT nin hâlâ kullanılmasının nedeni hastalığın erken devrelerinde -5.günde- müsbetleşmeye başlamasıdır. Halbuki aynı hastada PHA testi 12.günde müsbetleşmeye başlamıştır.^{19,49} Bu bulgu -kesin olmamakla beraber- SFT ve PHA testlerinde farklı antikörlerin tesbit edildiği şekilde yorumlanabilir. Bu noktaya önem verilip, aydınlatılması gereklidir. Ancak, şimdilik diyebiliriz ki PHA testinin SFT den 4-5 gün sonra müsbetleşmesi, SFT nin her yapılışında çeşitli nedenlerle değişik sonuç verebilme niteliği yanında fazla önemli değildir. İFAT için durum başkadır. Nunnen ve ark. deneysel olarak enfekte ettikleri tavşanlarda İFAT ile SFT nin aynı zamanda müsbetleştiğini göstermişlerdir.⁷⁶ Bu bulgu başka çalışmalarla da doğrulanırsa İFAT için bir avantaj olacaktır. İFAT nin toksoplazmozis için özgül olduğu çeşitli hastalıklara yakalanmış hayvanlardan alınan serumlar üzerinde ^{yapılan} bir çalışmada gösterilmiştir.⁵²

Toksoplazmozis bütün dünyada olduğu gibi, ülkemizde de yaygın bulunmaktadır. Ekmen'in deri testi ile aldığı sonuçlar enfeksiyonun Ankara'da çeşitli topluluklarda % 15.6 ile % 53.3 oranında bulunduğunu göstermektedir.⁴³ Aynı araştırmacı, ikinci çalışmasında SFT ile koyunlarda % 39, sığırlarda % 22.3 oranında müsbet sonuç almıştır.⁴⁴ Bizim çalışmamızda toplam olarak 338 insan serumunda SFT ile % 31.9, PHA ile % 41.4, İFAT ile % 34.0 müsbetlik bulunmuştur, (tablo 8). Hastanemizin çeşitli kliniklerinden toplanan, ölü-doğum, düşük, korioretinitis, sarılık, mikro ve hidrosefali gibi toksoplazmozis şüphesi uyandıran hastalarda müsbetlik oranı SFT ile % 38.4, PHA ile % 49.2 ve İFAT ile % 40.5 bulunmuştur. Halbuki gelişmiş seçilmiş serumlarda bu oran % 30.0, % 36.6, ve % 33.3 tür. Kontrol grubu dediğimiz sağlam insanlardan toplanan serumlarda müsbetlik oranı SFT ile % 20, PHA ile % 34 ve İFAT ile % 18 dir, (tablo 8). Görüldüğü gibi normal kimselerde en yüksek müsbetlik oranı PHA testi ile, en düşük oran da İFAT ile elde edilmiştir. Literatürde böyle bir bulguya rastlanmamıştır. Ayrıca, araştırmamız sonuçlarına göre üç testten aralarında en az uygunluk bulunan testlerin de PHA ile İFAT olduğunu görmekteyiz.

Sağlam insanlarda bu oranda antikor bulunmasının sebebi nedir? İlk anda akla teşhis için kullanılan metodların toksoplazmozise özgül olmadığı gelmektedir. Bu düşüncenin doğru olmadığı gösterilmiş olmakla beraber bazı normal hayvan serumlarında Sabin-Feldman testinin müsbet çıkmasına sebep olan bir faktörün bulunduğu söylenmektedir.¹⁰ Hayvan serumlarının "aktivatör" olarak kullanılmamasının nedeni budur. Sağlam insanlar da toksoplazma antikorlarının bulunmasını önceden geçirilmiş bir enfeksiyona bağlamak mümkündür. Fakat, Strannegard'ın tavşanlara ağız yoluyla ölü toksoplazma vererek hayvanlarda antikor teşekkülünü göstermesi, insanlardaki müsbet bulguların hepsinin geçirilmiş bir enfeksiyona ait olabileceğini düşündürmektedir.⁷⁷

Ülkemizde çeşitli nedenlerle toksoplazmozis şüphesi uyandıran vak'alar üzerinde toksoplazmozis yönünden inceleme yapan sadece bir çalışma vardır. Henüz yayınlanmamış olan bu çalışmada SFT ile, şüpheli hasta serumlarında % 27, normal insanlarda % 19.5 müsbetlik bulunmuş ve aradaki farkın istatistik olarak önemsiz olduğu belirtilmiştir.⁷⁸ Fakat aynı araştırmacı kompleman birleşmesi testi ile iki grup arasındaki farkın önemli olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda, toksoplazmozis şüpheli, gelişmiş ve güzel seçilmiş ve kontrol grubu serumların müsbetlik oranları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur, ($p > 0.05$, tablo 8). Bu bulgu kullandığımız üç testin toksoplazma enfeksiyonlarına özgül olduğunun bir kanıtı sayılabilir.

.....

Ö Z E T

Bu çalışma toksoplazmozisin teşhisinde Sabin-Feldman Testi (SFT) yerine Pasif Hemaglutinasyon(PHA) ve Floresan Antikor Testlerinin (FAT) rutin olarak kullanılıp kullanılamıyacağını göstermek amacıyla yapılmıştır. Bunun için Ankara'da, toksoplazmozis şüpheli olan ve olmayan toplam 338 insan serumunda SFT,PHA,ve İFAT ile toksoplazma antikorları araştırılmış,sonuçlar ikişer ikişer karşılaştırılmıştır.Serumların 1/16 sulandırımı müsbetlik için alt sınır sayılmış ve elde edilen bulgular tartışılmıştır.

1.Testler ikişer ikişer karşılaştırıldıkları zaman:

a. SFT-PHA:338 serumun 194 ü her iki testle menfi, 104 ü ikisiyle de müsbet bulunmuştur.Buna göre SFT ile PHA % 88.1 uygunluk göstermektedir. 62 serumda PHA da SFT ye göre bir üst titrede müsbetlik, 7 serumda SFT ile bir üst titrede müsbetlik bulunmuştur,(Tablo 1,2 ye bakınız).

b.SFT-İFAT: Serumların 92 si her iki testle müsbet, 207 tanesi her ikisi ile de menfi çıkmıştır.Bu sonuç, % 88.4 uygunluğu ifade etmektedir. 31 serumda İFAT ile, 23 serumda SFT ile bir üst titrede müsbetlik vardır, (Tablo 3,4).

c.PHA-İFAT: 338 serumun 184 ü iki testle de menfi, 101 i ikisiyle de müsbet bulunmuştur.İki test arasındaki uygunluk % 84.3 tür.Fakat 21 serum İFAT ile, 59 serum da PHA ile bir üst titrede müsbet çıkmıştır,(Tablo 5,6).

2. SFT, PHA, İFAT sonuçları ikişer ikişer karşılaştırıldıklarında aralarındaki bağı istatistik olarak önemli olduğu görülmüştür-(Tablo 1,3,5). $p < 0.05$.

3. SFT-PHA, SFT-İFAT, PHA-İFAT grupları birbirleri ile karşılaştırılınca, gruplar arası fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur, (Tablo 7). $p > 0.05$

4. PHA ve İFAT nin canlı organizmlerle yapılmayışı, antijenlerinin uzun süre saklanabilmesi, aktivatöre ihtiyaç göstermemeleri, müsbet-menfi ayırımının kolay olması, sonuçlarının standart SFT ile paralel gitmesi ve Ülkemiz laboratuvar koşullarında yapılabilecek nitelikte olmalarından ötürü toksoplazmozis teşhisinde rutin olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

5. Serumlar ülkemizde toksoplazma enfeksiyonlarının yaygınlığı hakkında fikir edinmek amacıyla, toksoplazma antikorlarının bulunma sıklığı yönünden de incelenmiştir. 338 serumdaki müsbetlik oranı % 31.9-41.4 arasındadır. Toksoplazmozis şüpheli serumlarda % 38.4-49.2, normal serumlarda ise % 18-34 müsbetlik bulunmuştur, (Tablo 8). Aradaki farkın istatistik olarak önemli çıkması kullandığımız testlerin toksoplazmozise özgül olduğunu göstermektedir.

.....

K A Y N A K L A R

1. Oytun, H.Ş.: Tıbbi Parazitoloji, 3. baskı, A.Ü. Tıp Fak. yayınlarından, Ankara, sh:206, 1961.
2. Callaway, C.S., Walls, K.W., and Hicklin, M.D.: Electron microscopic studies of *Toxoplasma gondii* in fresh and frozen tissue, Arch. Path., 86:484, 1968
3. Young, G.G.; Witton's Microbiology, 3th ed. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, sh:507, 1961
4. Jacobs, L., et al. : " a survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for presence of encysted toxoplasma", J. Parasitol., 46:23, 1960.
5. Jacobs, L. and Melton, M.L.: Modifications in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts, Amer. J. Trop. Med. Hyg., 3:447, 1954.
6. Kieiji, S.: Studies on toxoplasmosis. III. Observation on the tissue culture method of *Toxoplasma gondii*, Japanese J. Vet. Science, 23:43, 1961.
7. Jacobs, L.: The biology of toxoplasma, Amer. J. Trop. Med. Hyg., 2:365, 1953.
8. Remington, J.S., Jacobs, L.: Toxoplasmosis in adult, New. Eng. J. Med., 260:180, 1960.
9. Remington, J.S., Cavanaugh, E.N.: Isolation of encysted form of *T. gondii* from human skeletal muscle and brain, New Eng. J. Med., 273:1308, 1965.
10. Jacobs, L.: Toxoplasma and toxoplasmosis. Ann. Review of Microbiol. 17:429, 1963.
11. Feldman, H.A.: Serological study of toxoplasmosis prevalence, Am. J. Hyg. 64:320, 1956.
12. Frenkel, J.K.: Pathogenesis of toxoplasmosis and of infections with organisms resembling toxoplasma, Ann New York Acad. Sc., 64:215, 1956.
13. Eichenwald, H.F.: Human Toxoplasmosis. ed. J.C. Siim, Munksgaard, Copenhagen, sh:41, 1960.

14. Jones, T.C., Kean, B.H.: Toxoplasmic lymphadenitis, *J.A.M.A.*, 192:5, 1965.
15. Remington, J.S., Jacobs, L., Kaufman, H.E.: Toxoplasmosis in adult, *New Eng. J. Med.*, 262:237, 1960.
16. Remington, J.S., et al : Induced and spontaneous recurrent parasitemia in chronic infections with avirulent strains of *Toxoplasma gondii*, *J. Immunol.*, 87:578, 1961.
17. Adams, F.H., et al : Experimental toxoplasmosis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 70:258, 1949.
18. Noble, E.R. and Noble, G.R.: *Parasitology*, second ed., Lea and Febiger, Philadelphia, sh:134, 1964.
19. Koyhoe, D.E., et al : Acquired toxoplasmosis. Observation on two parasitologically proved cases treated with pyrimethamine and triple sulfonamides, *New Eng. J. Med.*, 257:1247, 1957.
20. Feldman, H.A.: *Human Toxoplasmosis*. Ed. J.C. Siim, Epidemiological aspects of toxoplasmosis, Munksgaard, Copenhagen, sh:169, 1960.
21. Bertan, M., Benette, S.: Epidemiological aspects of toxoplasmosis, *The J. Kentucky Med. Asso.*, 64:774, 1966.
22. Pullon, D.H.: Toxoplasmosis and general practitioner, *New Zel. Med. J.*, 63:23, 1964.
23. Oniki, S.: Serological studies on toxoplasmosis, *Japan. J. Clin. Ophthal.*, 18:927, 1964.
24. Gibson, C.L.: Distribution of toxoplasma antibodies in comparable urban and rural groups, *Public Health Reports*, 71:1119, 1956.
25. Beattie, C.P.: Epidemiology and clinical manifestation of toxoplasmosis in human, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 51:96, 1957.
26. Kimball, A.C., et al: Studies on toxoplasmosis. III. Toxoplasma antibodies in obstetrical patients correlated with residence animal contact and consumption of selected food, *Amer. J. Hyg.*, 71:93, 1960.
27. Hartley, W.J.: A review of the epidemiology of toxoplasmosis, *The Med. J. Aust.*, 1:232, 1966.

28. Morris, J.K., et al : Serological evidence of toxoplasmosis in animals, *J. Infect. Dis.*, 98:52, 1956.
29. Radcliffe, H.L. and Worth, C.B.: Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals, *Amer. J. Path.*, 27:655, 1951.
30. Gibson, C.L. and Eyles, D.E.: Toxoplasma infections in animals, *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 6:990, 1957.
31. Weinmen, D. and Chandler, A.H.: Toxoplasmosis in swine and rodents, *J. A. M. A.*, 161:229, 1956.
32. Rawal, B.D.: Toxoplasmosis. A dye-test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bonbay, *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.*, 53:61, 1959.
33. Beverley, C.K.A. and Beattie, C.P. and Roseman, C.: Human toxoplasma infections., *J. Hyg.*, 52:37, 1954.
34. Jacobs, L., et al : The isolation of toxoplasma from ovaries and oviduct of naturally infected hens, *J. Parasitol.* 48:Supply 38, 1962.
35. Beverley, C.K.A.: Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice, *Nature (Lond.)* 183:1348, 1959.
36. Woke, P.A., Jacobs, L., Jones, P.: Experimental results on possible arthropod transmission of toxoplasmosis, *J. Parasitol.*, 39:523, 1953.
37. Langer, H.: Repeated congenital infection with *Toxoplasma gondii*, *Obsted. Gynec.*, 21:318, 1963.
38. Akçay, Ş. ve ark.: Bir köpekte ilk toxoplasma gözervasyonu, *Türk. Vet. Hek. Der.*, 47:48, 1950.
39. Unat, E.K., Alyanak, Ş., Şahin, V.: Miliar tüberküloz ile birlikte bulunan bir kahil toxoplasmosis vak'ası hakkında, *Hastane*, 7:534, 1953.
40. Fakaçelli, N.M.: Bir toxoplasmosis vak'ası münasebetiyle, *Türk Tıp Cem. Mec.*, 20:579, 1954.
41. Yenermen, M.: Konjenital toxoplasmosis, *Hastane*, 13:266, 1959.
42. Tüzmen, B.S.: Bir toxoplazmik korioretinitis vak'ası, *Ank. Num. Has. Bült.* 4:75, 1964.

43. Ekmen, H.: Ankara ve civarında yapılan 2193 toxoplasmin deri testi neticeleri ve enfeksiyonun yayılmasında rol oynayan faktörlerin toplumlarda araştırılması, A.Ü. Tıp Fak. Mec., 20:193, 1967.
44. Ekmen, H.: Toxoplasmoziste enfeksiyon kaynakları, 1. Koyun ve sığırlarda toxoplasma antikörleri, Mikrobiyoloji Bülteni , 1:243, 1967.
45. Aagard, K.: Human toxoplasmosis. ed. J.C. Siim, Laboratory methods for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Munsgaard, Copenhagen, sh:206, 1960.
46. Sabin, A.B., Eichenwald, H. and Feldman, H.A.: Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man, Indications and provisions for routine serologic diagnosis, J.A.M.A., 150:1063, 1952.
47. Sabin, A.B.: Complement fixation test in toxoplasmosis and persistence of the antibody in human beings, Pediatrics, 4:443, 1949.
48. Fulton, F.: Complement fixation test in toxoplasmosis with purified antigen, Nature, 205:776, 1965.
49. Jacobs, L. and Lunde, M.N.: Hemagglutination test for toxoplasmosis, J. Parasitol., 43:308, 1957.
50. Lewis, W.P. and Kessel, J.F.: Hemagglutininations in the diagnosis of toxoplasmosis and amebiasis, Arch. Ophth., 66:471, 1961.
51. Gülmezoğlu, E.: Floresan antikor tekniği, Türk Hij. ve Tec. Biol. Der., 24:181, 1964. (Bu kaynakta sadece İFAT anlatılmaktadır)
52. Fletcher, S.: Indirect fluorescent antibody technique in the serology of Toxoplasma gondii, J. Clin. Path., 18:193, 1965.
53. Lunde, M.N.: Latex agglutination test in toxoplasmosis, J.A.M.A., 11:37, 1964.
54. Fulton, J.D.: Studies on agglutination of Toxoplasma gondii, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 59:694, 1965.
55. Siim, C.J. and Klans, L.: A toxoplasma flocculation test, Acta. Path. Mic. Scan., 50:445, 1960.
56. O'Conner, G.R.: Anti-toxoplasma precipitins in aqueous humor, A.M.A. Arch. Ophth., 57:52, 1957.

57. Frenkel, J.K.: Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens, (Toxoplasmin), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68:634, 1948.
58. Frenkel, J.K. et al.: Acute Toxoplasmosis. Effective treatment with pyrimethamine, sulfamide, leucovorin calcium and yeast., J.A.M.A., 173:1471, 1960.
59. Sabin, A.B. and Feldman, H.A.: Dyes as microchemical indicator of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite "toxoplasma" Science, 108:660, 1948.
60. Frankel, S. and Sonnen, W.A.C.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 6th ed. The C.V. Mosby Co., Saint Louis, sh:931, 1963.
61. Westphal, A.: Eine neue toxoplasmose komplementbindungsreaktion, Ztschr. f. Tropenmed., 3:191, 1951.
62. Stavitsky, A.B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies, J. Immunol., 72:360, 1954.
63. Kulasiri, C.: The specificity of Sabin-Feldman dye test with reference to protozoal infections, J. Clin. Path., 13:339, 1960.
64. DeSaram, W., et al: Comparison of serological tests in toxoplasmosis, Canad. Med. Asso. J., 87:604, 1962.
65. Lunde, M.N. and Jacobs, L.: A comparison of results of hemagglutination and dye test for toxoplasmosis in a survey of trinidad natives, Amer. J. Trop. Med., 7:523, 1958.
66. Lunde, M.N., et al : Comparison of dye and hemagglutination test on sera suspected cases of toxoplasmic uveitis, Arch. Ophthal., 69:10, 1963
67. Mitchel, R.G. and Green, C.A.: The hemagglutination test for toxoplasma antibodies, J. Clin. Path., 13:331, 1960.
68. Lunde, M.N. and Jacobs, L.: Characteristics of toxoplasma hemagglutination test antigen, J. Immunol., 82:146, 1959.
69. Goldman, M.: Staining Toxoplasma gondii with fluorescein-labelled antibody, J. Exp. Med., 105:557, 1957.

70. Walton, B.C., Benchoft, M. and Brooks, H.W.: Comparison of indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *T.gondii*, *Amer.J.Trop.Med.Hyg.*, 15:149, 1966.
71. Nunnen, M.C.J. and Veen, J.: Examination for toxoplazmosis by fluorescent antibody technique, *Ned.J.Geneesk.*, 109:749, 1965, (*Excerpt.Med.*, 18, No:7388, 1965).ten alınmıştır.
72. Gülmezoğlu, E.: Toksoplazmozis teşhisinde floresan antikor tekniğinin kullanılması, *Mikrobiyoloji Dergisi*, 2:93, 1968.
73. Sulzer, A.J. and Hall, C.E.: İndirect fluorescent antibody technique for parasitic diseases, IV. Statistical study of variation in İFA test for toxoplasmosis, *Amer.J.Epid.*, 86:401, 1967.
74. Chordi, A., Kenneth, W.W. and Kagan, I.G.: Studies on the specificity of the indirect hemagglütination test for toxoplasmosis, *J.Immunol.*, 93:1024, 1964.
75. Kimball, A.C. et al : Studis on toxoplasmosis. II. Toxoplasma antibodies in obstetrical patients with extensive serological follow-up, *The J. Immunol*, 81:187, 1958.
76. Nunnen, M.C.J. and Veen, J.: Examination for toxoplasmosis by fluorescent antibody technique, *Trop.Geogr.Med.* 17:246, 1965, (*Excerpt.Med.* 19, No:4897, 1966) dan alınmıştır.
77. Strannegard, Ö.: The formation of toxoplasma antibodies in rabbits, *Acta. Path.Microbiol.Scand.*, 71:439, 1967.
78. Gülten, K.: Toksoplazmozisin yurdumuzda bölgesel dağılımı ve doğum, düşük, ölü doğum v.b. vak'aların bu yönden incelenmesi, yayınlanmamış doçentlik tezi, A.Ü.Tıp Fak.Enf.Has.Klin., Ankara, 1968.