

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Bölümü

T.C.

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI BÖLÜMÜ

İNDİREKT FLUORESAN ANTİKOR TEKNİĞİ İLE
SITMA ANTİKORLARININ TAYİNİ

DR. KAMURAN KONCA

UZMANLIK TEZİ

ADANA, 1982

İ Ç İ N D E K İ L E R

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
Türkiye'de sıtma.....	3
Sıtma etkeninin morfolojik evrimi..	8
Sıtmanın immünolojisi.....	13
İndirekt Fluoresan Antikor Tekniği.	17
MATERYEL VE METOD.....	24
Materyel.....	24
Metod.....	25
SONUÇLAR.....	27
TARTIŞMA.....	35
ÖZET.....	42
KAYNAKLAR.....	43

G İ R İ Ş

Sıtma hastalığı insanlık tarihinin en eski zamanlarından beri bilinmektedir. Çin mitolojisinde sıtma ile ilgili çekiçli, soğuk su kovalı ve sobalı olmak üzere üç ifrit vardır ve bunların herbiri sıtmanın bir belirtisini (başağrısı, titreme, ateş) yapmakla sorumlu tutulmuşlardır. Daha sonra Hippocrates, hergün ve gınaşırı gelen ateşi ve sıtma ile dalak büyüklüğü arasındaki ilişkiyi gözlemiştir.

Malaria (kötü hava) terimi ilk kez F. Jacquier'in 1743 yılında Roma'da basılan kitabında görülmüş ve o zamanın inancı ile ateşli hastalıkların bataklıklardan yükselen kötü havanın solunması ile oluştuğu düşüncesinden doğmuştur.

Sıtma etkeni ilk kez Charles Louis Alfonse Laveran tarafından görüldü. Bir Fransız hekimi olan Laveran Cezayirde, 6 kasım 1880 de sıtmalı bir kişiden alınan ve henüz yaş olan bir kan yaymasında pigmentli yuvarlak bir cisimden kıl tarzında çıkıntıların ayrılıp hareket ettiklerini gördü ve bu bulgusunu 23 kasım 1880 de Paristeki "Academie de Medicini" toplantısına bir not şeklinde bildirdi. Laveran bu parazite "Oscillaria malariae" adını verdi ve bunun kandaki bazı şekillerini saptadı. Daha sonra Laveran'ın gördüğü şeklin P. falciparumun gametositleri olduğu anlaşıldı(43).

1891 de St. Petersburg'da D.L. Romanowsky, kan yaymalarının boyanması için kendi adı ile anılan yöntemi buldu ve sıtma parazitleri de bununla boyanmaya ve Plasmodium türleri daha iyi bir şekilde tanımlanmaya başladı. Bu yöntemi ilk uygulayanlardan N. Sacharoff Plasmodiumların kromatinini buldu. Daha sonra da değişik boya yöntemlerinin kullanılmasıyla, parazitin değişik tür ve evrelerinin

olduğu gözlemlendi.

Boyama tekniklerindeki büyük ilerleme ve aradan uzun bir zamanın geçmesine rağmen sıtma parazitleri konusunda bugün bile çok az şey bilinmektedir. İndirekt Fluoresan Antikor Tekniği (İFAT) nin de içinde bulunduğu immünolojik tanı yöntemlerinin geliştirilmesi bu sahaya büyük katkılarda bulundu.

Klasik boya yöntemleri ile akut dönemde parazitin görülmesi tanı koydurucudur. Parazitin görülmemesi ise o kişide sıtma olmadığını göstermez (45). Buna karşılık İndirekt Fluoresan Antikor (İFA) ve diğer immünolojik tanı yöntemlerinin faydası tanı koymada ve epidemiyolojik çalışmalarda inkar edilemeyecek kadar büyüktür. Örneğin:

1. Doğal olarak sıtma bulaşmasının durduğu bölgelerde veya endemik olduğu bölgelerde enfeksiyonun yaygınlığını saptamak,
2. Kronik vakaların ortaya çıkarılmasında,
3. Klinik olarak gizli kalmış, hepatosplenomegali ve uzun süren ateşlerde,
4. Kan bankalarında donörlerin seçiminde sıtmanın bulaşmasını önlemek amacıyla bu yöntemlerden yararlanılmaktadır.

İmmünolojik tanı yöntemleri içinde bugün için yaygın olarak kullanılan ve güvenilir olanlar, İFAT, agar jel difüzyonu ve ELİSA (enzyme linked immunosorbent assay) metodlarıdır. İFA tekniğinin duyarlı bir yöntem olması nedeniyle bunların arasında özel bir yeri vardır.

Biz bu araştırmada İFA yöntemini kullanarak, Türkiyede sıtmanın en fazla görüldüğü Çukurova ve çevresinde sıtma antikorlarının, sıklığını, dağılımını (yaş grupları ve yerleşim bölgelerine göre) ve antikorların tipini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

TÜRKİYEDE SITMA

Türkiyede sıtma epidemiyolojik olarak 3 dönemde incelenebilir:

A. SITMA MÜCADELE DÖNEMİ: 1926-1957 yılları arasındaki bu dönem üç kısımda inceleyebiliriz:

1. 1926-1945 YILLARI: 1926 yılında yürürlüğe giren 839 sayılı yasa ile başlatılan sıtma mücadelesi ilk kez beş bölge ve bunlara bağlı 130 köyde başlatılmıştır. Şekil I de de görüldüğü gibi mücadelenin başlatılması ile birlikte sıtmalılı sayısında meydana gelen artma, tanı olanaklarının gelişmiş olmasına bağlıdır. 1939 dan sonraki artışta ise, ikinci dünya savaşı ile kinin sağlanmasındaki güçlük ve artan nüfus hareketlerinin etkisi vardır.

2. 1945-1950 YILLARI: 1945 yılında çıkan olağanüstü yasa ve mücadele ile sıtma sayısında azalma olmuştur.

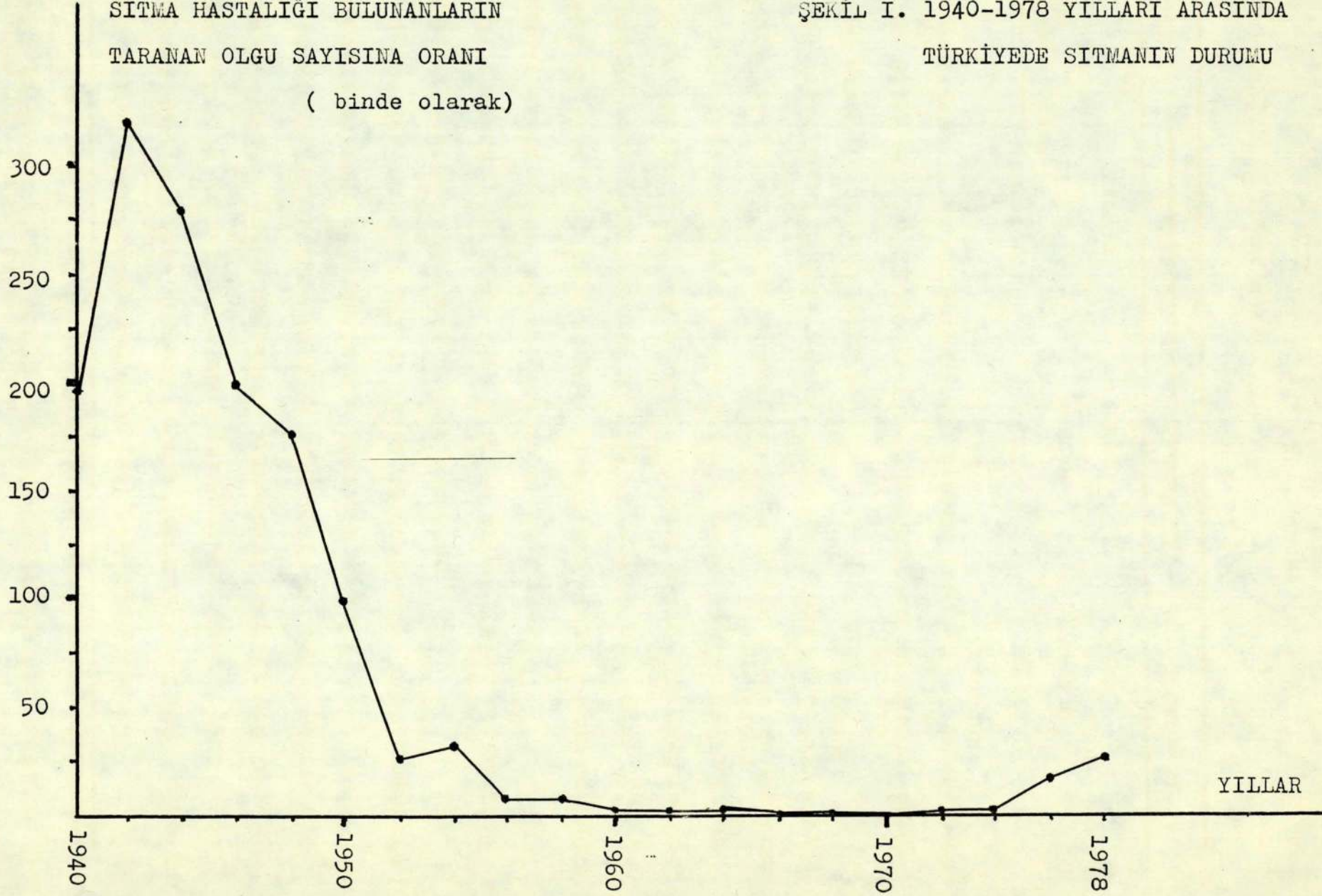
1950-1956 YILLARI: DDT ve larva mücadelesinin önem kazandığı bu dönemde sıtmalılı olgu sayısında azalma olmuştur.

B. SITMA ERADİKASYON DÖNEMİ: 1957 yılında, Dünya Sağlık Teşkilatının çağrısı ile eradikasyon uygulaması başlatılmış ve bir yıllık hazırlık döneminden sonra, hücum dönemi 1964 yılına kadar sürmüştür. Sıtmalılıların korunan nüfusa oranı dönemin başlangıcında (1958) %01.25 iken dönem sonunda % 00.17 ye düşmüştür.

C. 1964 den sonra epidemiyolojik sürveyans çalışmalarının ağırlık kazandığı KONSOLİDASYON ve İDAME DÖNEMİne girilmiştir. Böylece 1970 de sıtmalılıların korunan nüfusa oranı en düşük değer

SITMA HASTALIĞI BULUNANLARIN
TARANAN OLGU SAYISINA ORANI
(binde olarak)

ŞEKİL I. 1940-1978 YILLARI ARASINDA
TÜRKİYEDE SITMANIN DURUMU



TABLO I. TÜRKİYENİN STRATİFİKASYONU.

STRATA I	STRATA II	STRATA III	STRATA IV
Adana	Antalya	Afyon	Ağrı
Adıyaman	Aydın	Amasya	Artvin
Antakya	Balıkesir	Ankara	Bitlis
Diyarbakır	Bolu	Bilecik	Erzincan
Gaziantep	Burdur	Bingöl	Erzurum
Hakkari	Bursa	Çankırı	Giresun
K.Maraş	Çanakkale	Çorum	Gümüşhane
Mardin	Denizli	Elazığ	Kars
Mersin	Edirne	Eskişehir	Kastamonu
Siirt	Isparta	Kırşehir	Muş
Urfa	İstanbul	Konya	Ordu
Van	İzmir	Kütahya	Rize
	Kayseri	Malatya	Sinop
	Kırklareli	Sivas	Trabzon
	Kocaeli	Tokat	Tunceli
	Manisa	Uşak	Zonguldak
	Muğla	Yozgat	
	Nevşehir		
	Niğde		
	Sakarya		
	Samsun		
	Tekirdağ		

STRATA I: Çok yüksek risk bölgesi

STRATA II: Yüksek risk bölgesi

STRATA III: Orta risk bölgesi

STRATA IV: Düşük risk bölgesi

TABLO II. SITMANIN FAZLA GÖRÜLDÜĞÜ ÜÇ YILA AİT OLGULARIN
SINIFLANDIRILMASI.

YILLAR	YERLİ VAKA	NÜKS VAKA	HARIÇTEN GELEN VAKA	DİĞER	TOPLAM
1976	30178	2572	4308	262	37320
1977	80773	20311	13921	507	115512
1978	38214	31998	17131	524	87867

TABLO III. PARAZİT TÜRLERİNİN SINIFLANDIRILMASI.

YILLAR	ÜLKEMİZDEKİ TOPLAM OLGU SAYISI	P L A Z M O D İ U M L A R I N C İ N S			
		vivax	falciparum	malariae	mixed
1976	37320	37318	1	1	-
1977	115512	115502	8	-	2
1978	87867	87861	4	2	-

TABLO IV. SİTMA İNSİDANSININ ARTTIĞI 1977 VE 1978 YILLARINDA OLGULARIN STRATALARA VE AYLARA GÖRE DAĞILIMI.

AYLAR	YIL	STRATA I	STRATA II	STRATA III	STRATA IV
OCAK	1977	736	3	1	-
	1978	2497	11	9	5
ŞUBAT	1977	1194	3	4	1
	1978	6431	39	29	2
MART	1977	3889	25	6	5
	1978	13249	164	100	33
NİSAN	1977	6174	76	41	32
	1978	12752	221	146	44
MAYIS	1977	8897	73	60	18
	1978	14394	253	204	52
HAZİRAN	1977	16736	15065	104	22
	1978	11673	236	191	54
TEMMUZ	1977	32770	316	310	44
	1978	9238	229	168	48
AĞUSTOS	1977	23699	296	225	56
	1978	5654	252	98	44
EYLÜL	1977	7636	172	118	21
	1978	3360	153	57	21
EKİM	1977	5270	123	83	8
	1978	2694	141	52	26
KASIM	1977	3475	48	31	13
	1978	1972	54	19	9
ARALIK	1977	2521	16	9	2
	1978	761	18	7	3
TOPLAM	1977	112997(%86)	16216(%12)	992(%0,7)	222(%0,1)
	1978	84675(%96)	1771(%2)	1080(%1)	341(%0,3)

olan % 00.57 ye kadar düşmüştür.

1974 de 2877 olan sıtmalılı sayısı, 1975 de ani bir yükselme ile 9828, 1977 de ise en yüksek değer olan 115.512 ye ulaşmıştır.

1977 yılında Türkiye dört ana bölgeye (strata) ayrılmıştır (Tablo I). Çukurova, Amik ovası ve Güneydoğu Anadoluyu içine alan strata I, sıtmanın en yoğun olduğu bölge olup, 1978 yılında saptanan olguların % 96,69 unu oluşturur. Tablo IV bu konuda daha geniş bilgi vermektedir.

Ülkemizde karşılaşılan parazit türü *P. vivax*'tır. Sıtmalılıların kaynak ve parazit türlerine göre sınıflandırılması Tablo II ve Tablo III de gösterilmiştir. Seyrek olarak görülen *P. falciparum* ve *P. malariae*'ya yalnızca hudut kapılarında raslanmıştır (imported malaria).

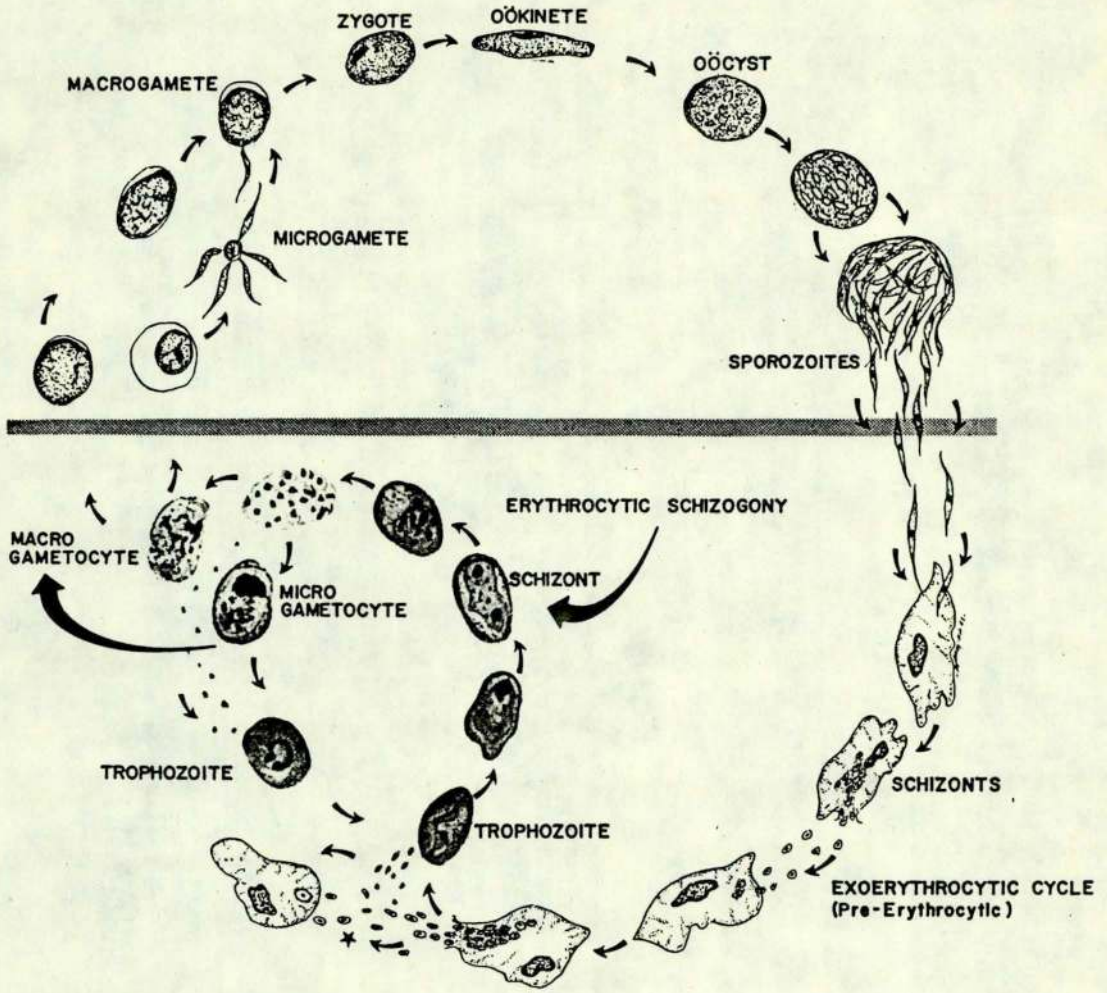
SITMA ETKENİNİN MORFOLOJİK EVRİMİ

Plasmodiumlar sporozoa sınıfının haemasporidia alt sınıfında bulunurlar. Bu sınıf parazitlerin biri insan vücudunda olan eşeysiz (schizogony), diğeri de insanda başlayıp sivrisinekte tamamlanan eşeyli (sporogony) olmak üzere iki gelişme dönemi vardır (şekil II). Schizogony de kendi içinde 'exoerythrocytic' ve 'erythrocytic' schizogony dönemlerine ayrılır. 'Exoerythrocytic schizogony' karaciğer parankim hücrelerinde meydana gelir.

Morfolojik olarak eşeyli çoğalma 6 döneme ayrılır:

1. Makro(dişi) ve mikro(erkek) gametler: Sıtmalılı bir ara konanın kanını emen sivrisineklerin midesinde alyuvarlardan makrogametositler çıkar. Yuvarlak yapıda, iki adet polar cisimcik (çekirdek kökenli) taşıyan bu makrogametositlerden 1-2 saat sonra, polar cisimciklerin atılmasıyla makrogametler oluşur. Aynı şekilde mikrogameto-

SİVRİSİNEKTEKİ EŞEYLİ ÜREME



İNSANDAKİ EŞEYSİZ ÜREME

ŞEKİL II. SİTMA PARAZİTİNİN YAŞAM SİKLUSU.

sitlerden de çekirdeğin parçalanması, sitoplazma uzantıları olan kamçıların oluşması ve bu kamçıların da bir süre sonra koparak hücreden ayrılması (exflagellation) ile mikrogametler oluşur. Bu şekilde her mikrogametositte ortalama 5-6 mikrogamet ortaya çıkar.

2. Zigot: Döllenme sonucu oluşan kalın zarlı yuvarlak yapılardır. Kabuğu giderek incelir ve hareketli hale gelir.

3. Ookinet: Olgunlaşan ve hareket edebilen zigota verilen isimdir. Sivrisineğin mide mukozasını geçip seroza altında yerleşirler. 3-5 X 15-25 mikron büyüklükte dirler. Bir süre sonra çeperleri kalınlaşıp hareketleri durur.

4. Ookist: Çeperi kalınlaşıp hareket yetisini kaybeden ookinete verilen isimdir. Sivrisineğin mide çeperinin dış yüzünde genellikle 15-20 li gruplar halinde bulunurlar. Olgun ookistlerin çekirdeğinin bölünüp etrafının sitoplazma ile çevrildiği görülür. Bunlar daha sonra, iki ucu sivri sporozoitlere dönüşürler.

5. Sporokist: İçinde çok sayıda sporozoit (onbin kadar) taşıyan ookiste verilen isimdir. Bir sivrisineğin midesinde 50 kadar bulunabilir.

6. Sporozoit: 10-15 mikron uzunlukta ve iğ veya orak şekillidir. Bir sitoplazmik zar ve hareketlerini sağlayan periferik fibrilleri vardır (mikropil).

Sivrisineğin, kan emdiği sırada konağın vücuduna verdiği sporozoitler karaciğer parankim hücrelerine yerleşerek prime ekzoeritrositik şizogoni dönemini başlatırlar. Bunun aynı hücrelerde ikinci kez tekrarlanmasına sekonder ekzoeritrositik dönem denir. Oluşan şizontların morfolojik özellikleri türlere göre değişiklik gösterir. Örneğin, *P. vivax*'ın şizontları 45 mikron, *P. falciparum*unkiler ise 50-60 mikron dur. Bunların içindeki merozoitler ise 1-2 mikron kadardır. Evrim

sonucu oluşan merozoitler hücrelerin ceperini yırtarak dolaşıma dökülür ve alyuvarlara girmek suretiyle eritrositik şizogoniyi başlatırlar. Sporozoitler gibi bundan sonraki dönemler de sıtma immünolojisi ve laboratuvar tanısında önemli rol oynar. Bu dönemlerde türler arasında önemli morfolojik farklar görülür. Eşeysiz  reme sırasında 6 dönem gözlenebilir (şekil III):

1. Genç trofozoit: Genellikle halka bişiminde(1,5-3 mikron), sitoplazmalı, bir veya iki kromatini ve i lerinde vakuol  bulunan pigmentsiz şekillerdir. Ortadaki vakuol nedeniyle ışık mikroskopunda taşlı yüzük şeklinde g r l rl r. Giemza veya Wright boyası ile sitoplazmaları açık mavi, çekirdek koyu kırmızı görülür.

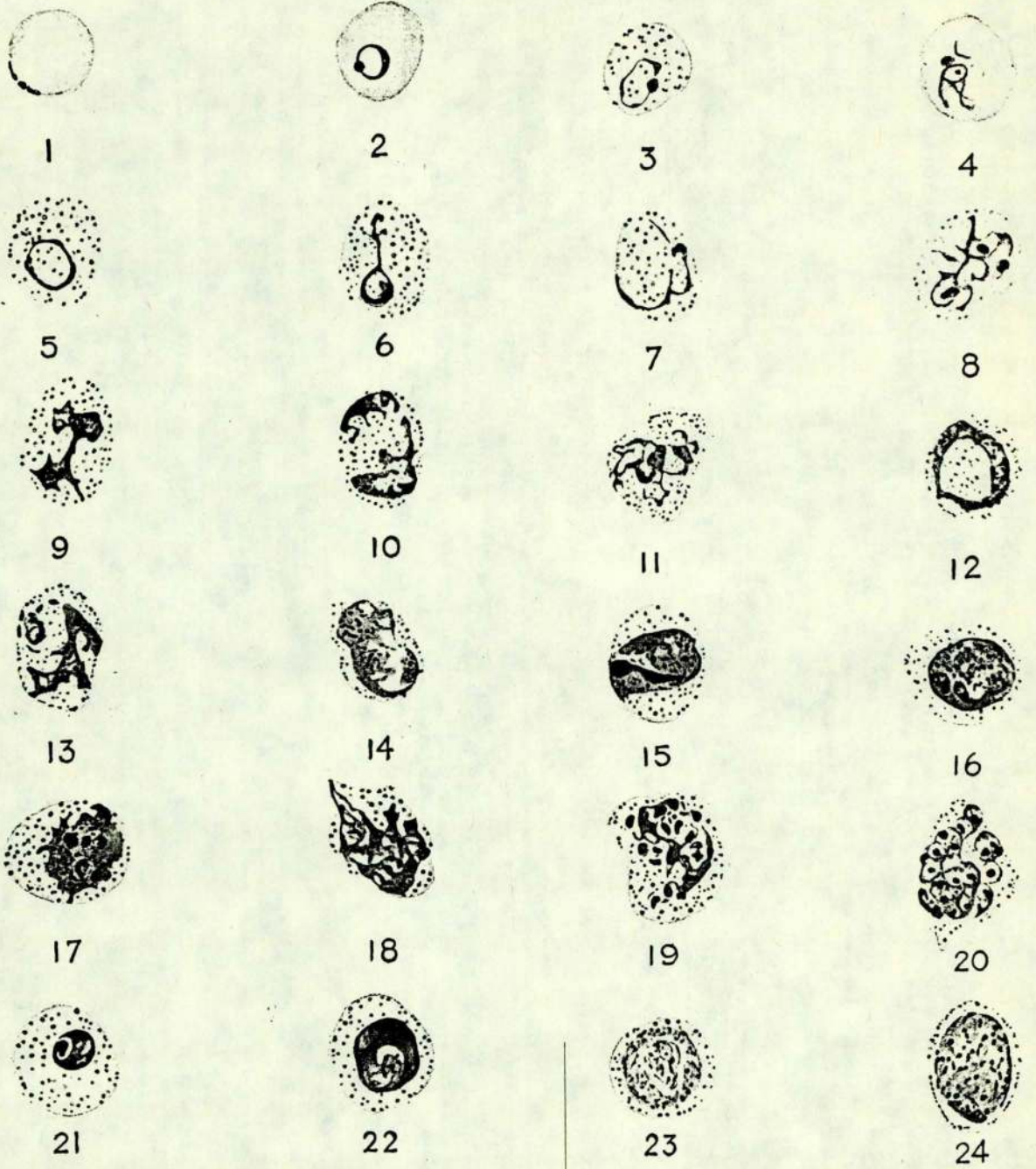
2. Olgun trofozoit: Genç trofozoitlerin büyümeleri sonucu, düzensiz kromatinli, sitoplazmaya dağılmış ince yada kaba pigmentli, değişik yapıda vakuolleri olan, bazen ameboid bazen bant şekli gösteren dönemdir. Ameboid hareketleri de vardır(vivax ismi bu nedenle verilmiştir).

3. Genç şizont: Parazitlerin eritrositler içinde büyümesi ile oluşan yuvarlak, sitoplazma uzantıları kaybolmuş, çekirdekleri kesif ve büyük, bölünmeye başlamış ve vakuolleri kaybolmuş yapılardır. Pigment türlere göre kaba veya ince taneler şeklinde görülür. Sitoplazma koyu renkte, çekirdek daha iri ve kompakttır.

4. Olgun şizont: Bu dönemde pigment tanecikleri biraraya toplanır. Sitoplazma koyu renktedir. Çekirdek t re göre değişik sayıda parçaya bölünür ( rneğin, vivax'ta 12-18 parça).

5. Merozoit: Olgunlaşmış şizontta çekirdeğin türlere göre değişik sayıda parçaya bölünmesi(8-36) ve etrafını sitoplazmanın örtmesi ile oluşan yapılardır. 1-1,5 mikron b y kl ğ ndedirler.

6. Gametosit: T re özgü morfolojileri olan bu dönem, eritrosit-



ŞEKİL III. PLASMODIUM VIVAX'IN EŞEYSİZ ÇOĞALMA DÖNEMLERİ.

1. Marginal yüzük şekilli trofozoit. 2. Yüzük şekli. 3. Daha yaşlı yüzük şekilli trofozoit ve bazofilik noktalanma. 4. Pseudopod gösteren bir genç trofozoit. 5. Schüffner noktalanması gösteren bir genç trofozoit. 6 ve 7. Orta trofozoit şekiller. 8. Sitoplazmaları kaynaşmış üç ameboid trofozoit. 9, 11, 12 ve 13. Gelişmekte olan yaşlı trofozoitler. 10. Bir hücrede iki ameboid trofozoit. 14, 15. Olgun trofozoit. 16, 17, 18 ve 19. Bölünen şizontlar. 20. Olgun şizont. 21, 22, 23. Gelişen, 23, 24. Olgun gametosi.

lerin içine giren merozoitler tarafından oluşturulur ve iç organların kapillerlerinde olgunlaştıktan sonra erkek(mikro) ve dişi (makro) gametositler halinde periferik kana dağılırlar. *P. vivax*'ın gametositleri 12-16 mikron büyüklüktedir. Sitoplazma içinde iri düzensiz pigment birikimleri vardır. Boyanmış preparatlarda makrogametosit, oval-yuvarlak, koyu mavi renkte, içinde koyu kırmızı renkte, kompakt ve eksentrik yerleşmiş çekirdeği görülür. Mikrogametositler de şekil bakımından makrogametositlere benzer. Ancak sitoplazmaları açık mavi yada mor boyanır. Çekirdek açık kırmızı olup merkeze daha yakındır. Pigment tanecikler halinde sitoplazmaya dağılmıştır.

SITMANIN İMMÜNOLOJİSİ

Enfekte olmuş bir konağın gösterdiği immün cevabın ilk belirtileri, periferik kanda parazit çoğalma hızının azalması ile ortaya çıkar. Bu dönemde parazitli hücreler, dalak, kemik iliği ve karaciğerde toplanmaya başlar. Bazen ise sıtma parazitleri herhangi bir klinik belirtiyeye sebep olmadan kanda aylar yada yıllarca yaşayabilirler. Belli bir sıtma türü ile enfekte olmuş kişilerde o sıtma türüne ve suşuna karşı yüksek oranda direnç meydana geldiği, bu direncin, aynı türün değişik suşlarına karşı aynı düzeyde olmadığı bildirilmektedir (22). Sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde yaşayan kişilerde meydana gelen direncin, reenfeksiyon sayı ve şiddetine göre değişik düzeyde olduğu saptanmıştır. Sıtmanın sporadik olduğu bölgelerde ise, toplumda çok düşük düzeyde immünite meydana gelmekte ve şartlar uygun olduğunda epidemiler ortaya çıkmaktadır.

Sıtmaya karşı olan dirençte immünolojik olmayan pek çok faktörün etkisi vardır. Sicle cell ve Duffy antijenleri ile sıtma arasındaki ilişki buna iki örnektir. Bu direnç eritrositlerin membran özelliklerinden ileri gelmektedir. Öte yandan sıtma olan ve olmayan bölgelerde yaşayan insanların genotiplerinin değişik olduğunu gösteren belirtiler de vardır. Öte yandan yeni doğan bebekler doğumdan üç ay sonrasına kadar anneden geçen antikorlarla ağır enfeksiyonlara karşı korunmaktadır(28). Üç aydan itibaren, birkaç yıl boyunca çocuklar sıtmaya karşı savunmasız kalırlar ve bu arada tekrarlayan parazitemiler sonucu, yaş ilerledikçe sıtma antikorlarının miktarı da artar(14). Sıtma antikorlarının yüksek düzeyde olduğu kişilerde parazitemi hatta bazen klinik olarak enfeksiyon gözlenmiştir(7,29). Bu şekilde, tam olmayan immüniteye 'premuniton' denmektedir. Spesifik immünite ise yıllar boyu tekrarlayan düşük düzeydeki parazitemiler sonucu oluşmaktadır.

Parazitin insan vücuduna girdiği sporozoit dönemine karşı antikorların olduğu yakın zamanlarda sporozoit çevresi presipitasyon yöntemi (circumsporozoit precipitation assay) ve indirekt immüno fluoresan metodlarla gösterilmiştir(32). Sporozoitlerin kanda birkaç saat gibi kısa bir süre kalmaları etkili bir immün yanıt oluşmasını önlemektedir. Daha sonra parazitin karaciğer parankim hücreleri içine girmesi, onu vücutta meydana gelen ilk bağışıklık etkenlerinden korumaktadır. Ayrıca primer veya sekonder doku ve daha sonraki eritrosit dönemlerinde, parazitin geçirdiği büyük morfolojik evrim yanında anti-jenik yapısında da büyük değişiklikler olmaktadır(44). Doku ve eritrosit içi dönemlere karşı oluşan antikorların, parazitin antijenik değişimine yol açarak, konakçının ölümüne neden olmaksızın, parazitin yaşamını devam ettirdiği ve bunların da, daha sonra başka canlılara taşınarak, yeni antijenik özellikte parazitlerin ortaya çıktığı ileri

sürülmüştür(4). Böylelikle, immün "surveillance", parazitin yok edilmesini değil yaşamasını sağlamaktadır. Bu görüş ekzoeritrositik şizogoni ile oluşan merozoitlerin, tekrar eritrositleri nasıl enfekte ettiğini de açıklamaktadır.

Parazitin gelişme dönemlerinde, döneme özgü antijenlerinin olduğu ve bunun da döneme spesifik immünitinin oluşmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan pek çok çalışma ile sporozoit yada kan evrelerine karşı oluşan antikorların, doku dönemindeki antijenlerle kros-reaksiyon verdiği ortaya konmuştur(24,46). Eritrositik döneme karşı oluşan antikorlar İFA tekniğinde önemli olup, bunlar homolog doku antijenleri değişik sıtma türleri ve aynı türün alt grupları ile de reaksiyon verirler. Buna karşılık, *P. falciparum* ile *P. malariae*'nin ve diğer bazı türlerin doku dönemleri arasında çapraz reaksiyonların oluşmadığı da gösterilmiştir(19).

Absorbsiyon çalışmaları, sporozoit ve eritrositik dönemlerin, döneme spesifik antikorları olduğunu gösterilmiştir. Bununla beraber, bu antikora spesifik iki ayrı antijenik determinantın bulunmadığını söylemek de zordur. Danforth ve arkadaşlarının yakın zamanda yaptığı çalışmalarla(16), sporozoit inokülasyonundan 14-24 saat sonra yapılan İFA testinde antiporozoit serumlar kuvvetli fluoresans vermiş, bu 30. saatte zayıflamış, 36-42. saatlerde ise tamamen kaybolmuştur. Eritrositik dönemlere karşı oluşan antikorlar ise 14-16. saatlerde zayıf, 18-42. saatlerde kuvvetli fluoresans vermiştir. 18-24. saatlerde ise eşit fluoresans gözlenmiştir. Bu sonuçlar relaps olayını da açıklamaktadır.

Akut enfeksiyonun seyri sırasındaki antikor vevabı, Kuvin ve arkadaşları tarafından İFA tekniği kullanılarak gösterilmiştir(25). Homolog antijenlerin kullanıldığı bu çalışmada, vivax sporozoitleri ile inokülasyondan ondört gün sonra, çalışmada kullanılan iki gönüllüden alınan kan yaymalarında parazitler gözlenmiş, bundan 6-9 gün

sonra antikor cevabının başladığı ve olgulardan birinde 35. günde 1:2560, diğerinde 28. günde 1:320 titrasyonda maksimum değerlerine ulaştığı saptanmıştır. Paraziteminin görülmesinden sonra antimalarial tedaviye alınan gönüllülerde, antikor titresinin 90. güne kadar giderek azaldığı, daha sonra ise, antikor cevabının izlendiği 121. güne kadar sabit bir değerde kaldığı gösterilmiştir.

Afrikada *P. falciparum*un hiperendemik olduğu bölgelerde yapılan çalışmalarda, erişkinlerde gama-globulin seviyesi yüksek bulunmuş ve bu gruptan elde edilen 7 S fraksiyonunun, *falciparum* enfeksiyonu geçiren çocuklarda terapötik etkisi gözlenmiştir(7,8,28). Aynı bölgede üç yaşın altındaki çocuklarda yapılan çalışmada, aktif enfeksiyon sırasında supresif tedaviye alınanlarda gama globulin seviyesinin yükselmediği, ilaç almayan grupta ise yükseldiği gözlenmiştir. *Falciparum* ve *vivax* enfeksiyonlarında serum albumin seviyesinin azaldığı(2), alfa-1 globulinlerin arttığı ve bazen alfa-2 globulinlerin azaldığı(17) bilinmektedir.

Sıtmada hücrel immünite geniş bir şekilde incelenmiştir(3,5, 11). İmmünize olmuş hayvanlardan alınan lenfositler in-vitro olarak antimalarial etki göstermez(10,36). Buna karşılık immünize olmuş hayvanlardan alınan dalak hücrelerinin transferi ile, immün serumun pasif transferine oranla çok daha fazla korunma sağlanmaktadır(35). Diğer taraftan, daha önceden dalağı çıkarılmış deney hayvanlarında spesifik antiserumun pasif transferi ile gözlenen koruyucu etki azalmaktadır(20). Spesifik antikorların, makrofajların paraziti fagosit etmesindeki rolü in-vivo ve in-vitro olarak açıkça gösterilmiştir(6,15). Bu çalışmalar, 'makrofaj endocytosis'inin malarial immünitete temel mekanizma olduğunu kanıtlamaktadır.

Hastalık sırasında meydana gelen antikorların bir kısmı opsonin gibi etki yaparak infekte eritrositler içerisinde parazitlerin ölme-

sine neden olmakta(6), veya merozoitlerin eritrositlerin içine girmesini engellemektedir(9). Sıtma antikorlarının Ig G ve Ig M yapısında olduğu, Ig M yapısında olanların Ig G yapısında olanlara göre daha az etkin olduğunu gösteren çalışmalar vardır(21). Böylece konaktaki parazit popülasyonu üzerine etkili iki tip antikor olduğu bir tanesinin parazitin antijenik yapısını değiştirerek parazitin konaktaki yaşamını devam ettirdiği, diğerinin ise paraziti öldürme yönünde etki gösterdiği ileri sürülmektedir(6).

İNDİREKT FLUORESAN ANTİKOR TEKNİĞİ (İFAT)

Sıtma için kullanılan indirekt fluoresan antikor tekniği, diğer fluoresan yöntemlerden farklı değildir. Burada antijen olarak, sıtmalı hasta veya deney hayvanlarının kanından hazırlanan yaymaların, antikor seviyesi tayin edilecek serum ile muamele edilmesi esastır. Daha sonra antijenler fluoresein bağlanmış anti-insan serumu ile inkübe edilerek fluoresan mikroskopta incelenir. Daha önce de belirtildiği gibi, bu şekilde antikor tayini ilk kez 1962 de Kuvin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır(25). Kuvin ve arkadaşları akut enfeksiyondan sonra, gönüllüler üzerinde 121. güne kadar sıtma antikorlarını izlemişler, bu süre sonunda antikor değerinin düşük ve sabit bir düzeyde kaldığını bulmuşlardı. Bu çalışmada daha önce sıtma geçirmemiş gönüllüler kullanılmıştır. Bu nedenle de olay primer immün yanıtı göstermektedir. Sıtmanın endemik olduğu bölgelerde uzun süre yaşayan kimselerde, tekrarlayan parazitemiler (klinik belirti veren veya vermeyen) sonucu kişilerde antikor titresinin daha yüksek olacağı aşıkardır(sekonder immün yanıt). Collins

ve Skinner'in çalışmaları ile de, daha önce sıtma geçiren kimse-
rin tekrar bu hastalığa yakalanmaları halinde, kandaki antikor sevi-
yesinin, ilk hasta olduklarında görülene oranla çok daha yüksek ol-
duğu gösterilmiştir(13).

1966 yılında bazı araştırmacılar ise (38) Plasmodium vivax ile
enfekte insanlarda, chloroquin tedavisi altında, İFA tekniği ile
antikor cevabının gözlenemediğini, tedavi bırakıldıktan sonra anti-
kor cevabının görülebildiğini, bu nedenle yöntemin, tedavinin dege-
rini ölçmek amacıyla kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

İFAT anti-malarial antikorların tip tayininde de kullanılmış
ve IgG ve IgM yapısındaki antikorların sıtma yönünden kuvvetli reak-
siyon verdiği, IgA yapısında olanların ise sıtma antijenlerine kar-
şı çok az aktif olduğu saptanmıştır(1,13).

Bugün için İFA tekniğinin sorunları tamamen çözülmüş değildir.
Her şeyden önce, pozitif sonuçlar ile koruyucu antikorlar arasında
tam bir ilişki olduğuna pek çok araştırmacı inanmamaktadır. Daha ön-
ce de belirtildiği gibi, yapılan araştırmalarda, antikor cevabı o-
lan kişilerde parazitemi hatta klinik enfeksiyonlar gözlenmiştir.
Ayrıca düşük dilüsyonlarda, bazı paraziter (leishmaniasis) ve bak-
teriel hastalıklar (sifilis) arasında çapraz reaksiyonların olduğu
gösterilmiştir. Bu nedenle de 1:16 dan daha yüksek serum dilüsyon-
larının sensitivite ve spesifite yönünden daha uygun olduğu ileri
sürülmektedir(40).

Antijenlerin hazırlanması ile ilgili yöntemler de halen gün-
cellliğini koruyan bir konudur. Bu alanda yapılan ilk çalışmalarda,
sıtmalı hastalardan hazırlanan homolog antijenler kullanılmıştır.
Fakat bu preparatlarda parazitin düşük oranda bulunması ve sıtmanın
endemik olmadığı bölgelerde antijen teminindeki güçlükler nedeniyle
yeni yöntemler araştırılmıştır. Bu konuda çalışan Sulzer ve arkadaş-

ları, ince yayamalar ile antijen hazırlanması yerine, kalın damla metodunun kullanılmasının, aynı sonuçları verdiğini göstermişlerdir. (39,40).

İnsanda hastalık yapan *Plasmodium* türlerinin (*vivax*, *falciparum*, *malariae*), Güney Afrika maymunlarında (*Aotus trivirgatus*) da enfeksiyon meydana getirdiğinin bulunması bu çalışmalarda önemli bir dönüm noktası olmuştur. Böylelikle homolog antijenlerin deney hayvanlarından elde edilebilmesi olanağı doğmuştur. Bununla beraber Güney Afrika maymunlarının pahalı laboratuvar hayvanları olmaları, araştırmacıları hah ucuz ve bol bulunabilen türlerden sıtma parazitlerini üretme düşüncesine yöneltti (40) ve bu amaçla değişik laboratuvar hayvanları kullanılmaya başlandı. Bugün için immünolojik özellik gösteren *Plasmodium* türleri üç gruba ayrılabilir:

1. Kemirici (rodent) türleri:

-*P. berghei*

-*P. vinckei*

2. Kuş (avian) türleri:

-*P. gallinaceum*

3. Maymun (simian) türleri:

-*P. cynomolgi*

-*P. falciparum*

-*P. gonderi*

-*P. ovale*

-*P. vivax*

-*P. malariae*

-*P. fieldi*

Sıtma parazitlerinin antijen olarak kullanılmasında, hangi *Plasmodium* türünün daha iyi reaksiyon vereceği konusunda yapılan çalışmalar, tür seçiminin önemli olduğunu göstermiştir. Antijen olarak

kullanılacak Plasmodium türleri ve antijenik özellikleri üzerindeki çalışmalar devam etmekte olup, henüz standart antijen hazırlanması konusunda kesin karara varılmamıştır. Gerek insan gerekse Güney Afrika maymunlarından hazırlanan homolog antijenler, heterolog olanlara göre çok daha kuvvetli reaksiyon vermektedir(39). Bu nedenle heterolog antijenlerle çalışıldığı zaman serum dilüsyonlarının daha düşük seviyelerde tutulması gerekmektedir. Bu özellik, bugün, bir laboratuvar yöntemi olarak, türe özgü antikorların saptanması amacıyla uygulama alanı bulmuştur(27). Manawadu ve Voller yaptıkları çalışmada, gerek titrasyon tayini gerekse fiber optik bir sistemle parazitin verdiği aydınlanmayı ölçerek, sıtma antikorlarının hangi türe karşı olduğunu, sırasıyla, titrasyonun yüksek dilüsyonlara kadar devam etmesi ve aydınlanmanın diğer türlere göre daha fazla olmasından faydalanarak tayin etmişlerdir.

Gentilini ve arkadaşları, 1972 yılında, *P. falciparum* ve *P. vivax* ile enfekte 75 insandan aldıkları serumları, *P. berghei*, *P. gallinaceum*, *P. cynomolgi* ve *P. falciparum* ile hazırlanmış antijenler kullanarak İFA ile test etmişlerdir. Alınan sonuçlara göre en fazla duyarlılık *P. falciparum* ile elde edilmiştir. Diğer taraftan toxoplasmosis, hidatidosis ve diğer paraziter hastalıklarda, 1:80 sulandırma derecelerinde bile çapraz reaksiyonların görülebilmesinin mümkün olduğunu bildiren araştırmacılar, sıtma vakalarında 1:60 ve üzerindeki sulandırma derecelerinde elde edilen pozitif sonuçların doğru olarak değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir(43).

Antijenlerin hazırlanmasında diğer bir yöntem parazitlerin konsantre edilmesidir. Bunun için silica dasite gradienti (Ficoll, Percoll)(18,42), Pasmogel(fizyolojik serum içinde %3 W/V gelatin solusyonu)(34) gibi yöntemler uygulanır. Bu şekilde parazitin değişik gelişme dönemlerini ayrı ayrı elde edebilmek mümkün olmaktadır.

Şizontların trofozoitlere, trofozoitlerin de yüzük şekillerine göre daha fazla fluoresans verdikleri gözönüne alınırsa bu yöntemin faydaları meydandadır. Bununla beraber, pek çok kemirici(rodent) ve kuş (avian) türünde yüksek oranda parazitoz meydana gelmesi ve kalın damla preparatlarda, ince yaymalara oranla 15 misli fazla parazit bulunması(40) nedeniyle antijenlerin hazırlanmasında konsantrasyon yöntemlerine nadiren gerek duyulmaktadır.

İFAT ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olmasına rağmen, sübjektif bir metod olması nedeniyle sonuçlar(özellikle titrasyon son değerleri "endpoints"), değişik laboratuvar, hatta aynı laboratuvar içinde değişik zamanlarda farklılıklar gösterebilir. Aynı laboratuvarı şartlarda değişiklik olmadığı takdirde aynı kişi tarafından elde edilen sonuçlar oldukça tutarlıdır. Bu şekilde değişik sonuçların alınmasında pek çok faktörün rolü vardır. Bu faktörlerden en önemlileri antijene ait olanlardır. Antijen olarak değişik hasta veya deney hayvanlarından hazırlanan değişik suşlar, birbirinden farklı fluoresans vermekte hatta sıklıkla parazitler hiç görülememektedir. Bunun nedeni henüz açıklanamamıştır. Hazırlanan antijenlerin saklanması, fluoresein bağlanmış anti insan serumunun üretim ve pazarlama özellikleri, teknik işlemler sırasında preparatların yıkanma hataları veya istenmeyen bir şekilde kurumaları, pH değişiklikleri, mikroskoba ait faktörler sonuçlardaki farklılıklara neden olmaktadır. Örneğin, ultraviyole lambasının yarattığı eksitasyon zamanla azalmakta böylece fluoresans da düşmektedir. 200 saat kullanılan Osram HBO 200 de bu oran %45 bulunmuştur.

Değişik laboratuvarlarda elde edilen sonuçların kıyaslanması, güvenilir sonuçların elde edilebilmesi ve yeni araştırmaların yapılabilmesi ancak standart bir yöntemin geliştirilmesi ile mümkün olabilir. İFA tekniğinin standardizasyonu amacıyla Manawadu ve Voller

in 1978 de yaptığı çalışma(26), fluoresan mikroskopinin genel özelliklerini sıtmaya uygulaması ve pek çok değişken için standart değerler getirmesi açısından oldukça faydalı bir çalışmadır. İFA tekniğinin bazı özelliklerini de özetlemesi nedeniyle bu çalışmadan kısaca söz edilecektir. Araştırmacılar önce fluoresan mikroskoba bir fiber optik probe takarak, boyutları belli bir uranil camındaki aydınlanmaya göre keyfi bir fluoresans birimi saptamışlar ve buna göre bir dizi ölçümler yapmışlardır. Bunlardan çıkan sonuçlara göre:

1. Test serumunun dilüsyonunun artması ile parazitlerin verdiği fluoresans azalmakta, fakat bu azalma dilusyona paralel olmamaktadır(16 misli dilüe edilen serumda fluoresansın 4 misli azalması gibi).

2. Başlangıç fluoresansı arttıkça, zamanla fluoresansın sönme oranı da fazla olmaktadır. Örneğin, 10000 fluoresan birimi olan bir aydınlanma (%100), on dakika sonra 2480 birime (%25) düşmekte, 360 birimlik bir aydınlanma ise aynı sürede 310 a(%86) inmektedir.

3. Şizontların daha erken asexual gelişme dönemlerine oranla daha kuvvetli fluoresans verdiği gerçeği pek çok araştırmacı tarafından gözlemlendiği halde, bunun ölçümü ilk defa Target(41) tarafından denenmiştir. Manawadu ve Voller ise P. falciparum ile enfekte ettikleri bir maymundan, yüzük şekli, olgun trofozoit ve şizont dönemlerinde hazırladıkları antijenlerle homolog antikorları kapsayan bir dizi ölçüm yaparak, örneğin, 1:320 dilüsyonda fluoresansın sırasıyla gelişme dönemlerine göre 1:3:8 misli arttığını bulmuşlardır.

4. Antijenlerin saklanması ile fluoresans arasındaki ilişki de araştırılmış, -20 dereceden daha düşük sıcaklıkta saklananların dört ay sonra özelliklerinden hiçbir şey kaybetmedikleri, buna karşılık oda sıcaklığında saklananların 4. ay sonunda aşağı yukarı

fluoresanslarının %50 sini kaybettiği, oda sıcaklığında ve nemli bir ortamda saklananların ise ilk 30 gün içinde fluoresan özelliklerini tamamen kaybettikleri görülmüştür.

5. Fluoresein ile konjuge edilmiş anti insan globulininin bir dizi dilüsyonunda, bu dilüsyonlarda elde edilen fluoresansın, dilüsyona oranla daha az düştüğü, değişik firmaların, hatta aynı firmanın değişik parti üretiminin kullanılması halinde gözlenen fluore-sansta önemli farklar olduğu görülmüştür. Bu nedenle, kıyaslanabilir sonuçlar alabilmek için, her fluoresan ile bağlanmış anti-globulini, firmanın kutu üzerinde gösterdiği özellikler gözönüne alınarak belli bir standarda göre dilüe etmek gerekmektedir. Bu konuda henüz fikir birliğine varılamamıştır.

6. Antijenler üzerine yapılan çalışmadan da önemli sonuçlar çıkmıştır:

a. Heterolog antiserumlar, homolog olanlara göre 1:4-1:2 oranında düşük fluoresans vermiştir.

b. Aynı Pasmidium türünün değişik suşları fluoresans yönünden büyük farklar göstermiştir. Bu çalışmada vivax suşları, bütünüyle, falciparum ve malariae suşlarından daha reaktif görülmüşlerdir.

Kısaca belirtmek gerekirse, İFA tekniği malarial antikorların saptanması ve ölçülmesinde en uygun tekniklerden biri olarak kesinlik kazanmış, akut enfeksiyonların tanısında pratik değeri olmamasına rağmen, epidemiyolojik çalışmalarda, bir toplumun sıtma parazitleri ile olan ilişkisini değerlendirme açısından çok yararlı bir yöntem olduğu herkesçe kabul edilmiştir.

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

MATERİYEL

ANTİJEN: Çukurova Üniversitesi hastanesi dahiliye polikliniği ve acil servisi ile Adana ili merkez sıtma mücadele pasif sürveyans bölümüne başvuran sıtmalı hastalardan alınan kalın damla ve periferik yaymalar, parazit sıklığı, antiijenik özelliği ve gelişme dönemleri yönünden değerlendirildi. Bu gözlemler sırasında, her immersiyo-
n sahasında ortalama bir parazit içeren, immünolojik özelliğe sahip (kuvvetli fluoresans veren) ve sıtma parazitlerini olgun trofozoit ve genç şizont dönemlerinde oldukça uniform bir şekilde içeren, daha az oranda genç trofozoit ve olgun şizontlara sahip bir hasta donör olarak kullanıldı. Bu hastadan alınan heparinize kan hiçbir işleme tabi tutulmadan (genellikle bu tür araştırmalarda eritrositler fosfatla tamponlanmış fizyolojik serum (PBS) da yıkanmaktadır) bol miktarda ince kan yaymaları hazırlandı. Slaytlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra, kenarlarına konan U şekilli kartonlar ile (birbirlerine değmesini önlemek amacıyla) 20 tanelik paketler halinde önce kağıda sonra naylona sarılıp, içinde $MgCl_2$ bulunan bir desikkatör içinde ve -90 derecede kullanılacakları tarihe kadar saklandı.

SERUMLAR: 19.1.1982-12.3.1982 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi hastanesi biyokimya poliklinik laboratuvarına başvuran 868 kişiden, cinsiyet yaş ve son bir yıldaki devamlı adreslerini belirten anket formları ile birlikte kan alınarak serum ayrıldı ve -40 derecede kullanılacakları tarihe kadar saklandı.

ANTİ-SERUMLAR: Fluoresein ile bağlanmış anti-insan immün globulini olarak Wellcome firmasının(Wellcome Reagents Ltd., U.K.) koyun-anti-insan serumunun fosfatla tamponlanmış fizyolojik serum (PBS,pH:7,2) içindeki 1:240 oranındaki dilüsyonu kullanıldı. Sıtma antikorlarının tip tayininde ise aynı firmanın fluoresan ile bağlanmış koyun-anti-insan Ig M ve Ig A globulinleri ile Behring firmasının(Behring, Batı Almanya) anti-insan Ig G globulininin PBS içindeki 1:20 lik dilüsyonları kullanıldı.

METOD

-90° C de saklanan ve içinde antijen slaytları bulunan desikkatör derin dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığına gelene kadar beklendi ve daha sonra paketler açılarak slaytlar çıkarıldı(henüz oda sıcaklığına erişmemiş antijen paketlerinin açılması, camlar üzerinde su buharının yoğunlaşarak birikmesine ve bu nedenle eritrositlerin hemolizine neden olmaktadır). Antijen slaytları düz bir yüzeyde kağıt üzerine konarak, her lamda en fazla dört adet olmak üzere alüminyum perçin vidası ters olarak camın üzerine konup 25 cm uzaklıktan selülozik boya püskürtüldü. 10 dakika boyanın kuruması için beklendikten sonra perçinler teker teker eğri uçlu bir pensle toplandı. Böylece slaytlar üzerinde 8 mm çaplı "lakün"ler oluşturuldu. Daha sonra her "lakün" üzerine antikor tayini yapılacak serumlardan 50 şer mikrolitre konarak nemli bir ortamda 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda slaytların her bir "lakün"ü, diğerlerine bulaşmasına fırsat verilmeden, ince bir borunun ucundan akan PBS akımında birkaç saniye süreyle teker teker yıkanıp, kurumalarını önlemek için üzerlerinde birer damla PBS bırakılarak, yatay olarak yıkama kafe-

sine dizildi. Sonra, bütün slaytlar 8 litre PBS içeren geniş ağızlı bir kavanozda 10 dakika süre ile yavaşça karıştırılarak yıkandı. "Lakün"ler arasındaki selülozik boya üzerinde kalan fazla sıvı (selülozik boyanın hidrofobik özelliği çoğu zaman boyalı yüzeyin kuru kalmasını sağlamaktadır) süzgeç kağıdı ile alınarak, kurumalarına fırsat verilmeden, her "lakün"e 50 mikrolitre, PBS içinde 1:240 oranında dilüe edilmiş fluoresein ile bağlanmış anti-insan globulini damlatılıp yarım saat bekletildi. Bu süre sonunda, lamalar yine PBS ile yıkandı ve kurumasına fırsat verilmeden her "lakün"e birer damla tamponlanmış (pH:7,5) gliserin (PBS içinde %90 lık) damlatıldıktan sonra lamelle kapatıldı. Slaytlar immersiyon objektifi ile, American Optical, üstten aydınlatmalı, exciter KV 418, BG-12, Dichroic 500 nm, barrier OG 515 filtreleri ve Osram HBO 50 W cıva buharlı ultraviyole lambalı mikroskopta incelendi. Boyanma (+) ile (++++) arasında değerlendirildi. Hazırlanan antijenler, kontrol amacıyla, daha önce bazı araştırmacıların ileri sürdüğü in vivo reaksiyonlar yönünden(23,37,38,40) doğrudan doğruya, fluoresein ile bağlanmış anti-insan globulini ile inkübe edilerek fluore-san mikroskopta incelendi ve parazitlere spesifik hiçbir boyanma gözlenmedi.

Sıtma antikorları yönünden pozitif bulunan olgular arasından rasgele seçilen 28 serumda antikorların tipi araştırıldı. Bunun için fluoresein ile bağlanmış anti-insan-Ig G, Ig M ve Ig A nın PBS içindeki 1:20 lik dilüsyonları kullanıldı.

Sıtma antikorları yönünden pozitif bulunan olgular arasından rasgele seçilen 40 serumda 1:60 dan başlayıp üçer misli sulandırılarak titrasyon son-değerleri(endpoints) araştırıldı. Bu işlem sırasında da fluoresein ile bağlanmış anti-insan globulininin 1:240 dilüsyonu kullanıldı.

S O N U Ç L A R

Sıtma antikorları yönünden araştırılan 868 olgunun 623 ü Adana il sınırları içindeki yerleşim merkezlerinden (Adana merkez, Misis, Karaisalı, Karataş, Ceyhan, Kadirli, Feke, Pozantı, vs.), geriye kalan 245 in büyük kısmı komşu illerden (Mersin, Niğde, Maraş, Gaziantep, Antakya), az bir kısmı da uzak illerden (İstanbul, Ankara, Urfa, Elazığ vs) gelen kişilerdi. Strata II de bulunan Kayseri ilinden gelen (Sarız ilçesi) iki olgu sayının az olması nedeniyle uzak illerin kapsamına alındı.

Sonuçlar pozitiflik derecesi ve yaş aralıkları olarak beş grup üzerinden değerlendirildi. Tablo V in incelenmesinden de görüleceği gibi Adana il sınırları içinden gelen olgularda sıtma antikorları en düşük 0-10 yaş grubunda (%36,58), en yüksek ise 61 ve yuvarısını kapsayan yaş grubunda gözlemlendi (%70,90). Öte yandan incelenen 623 olgunun 251 i sıtma antikorları yönünden negatif bulundu (%40,29). Pozitif bulunan olguların büyük kısmı (%54,84) iki pozitif grubunda toplandığı halde, dört pozitif sıtma antikoru taşıyan gruba sadece %4,57 olgu girmiştir. Bütün yaş grupları gözönüne alındığında, Adana ilinde sıtma antikorlarının pozitiflik oranı %59,71 bulundu.

Adana ili dışından gelen 245 olgunun yaş grupları ve pozitiflik derecelerine göre dağılımı Tablo VI da gösterilmiştir. Buradan da görüleceği gibi, sıtma antikorlarının oranı yaşı artmasına paralel olarak yükselmiş ve 41-60 yaş grubunda en yüksek değeri olan %57,69 a ulaşmıştır. Bütün yaş grupları göz önüne alındığında, pozitif serumların oranı %53,47 bulunmuştur. Adana içinden ve dışından gelenler beraberce değerlendirildiğinde olguların %57,95 i pozitif bulunmuştur (Tablo VII). Her yaş grubundaki pozitiflik yüzdesinin t

TABLO V. ADANA İL SINIRLARI İÇİNDE SİTMA ANTİKORLARININ YAŞ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI.

28

POZİTİFLİK DERECESİ	Y A Ş G R U P L A R I					
	0-10 (41 kişi)	11-20 (44 kişi)	21-40 (202 kişi)	41-60 (281 kişi)	61-fazla (55 kişi)	TOPLAM (623 kişi)
+	3 (% 7,32)	6 (%13,64)	29 (%14,36)	31 (%11,03)	18 (%32,73)	87 (%13,96)
++	11 (%26,83)	20 (%45,45)	65 (%32,18)	91 (%32,38)	17 (%30,91)	204 (%32,74)
+++	1 (% 2,44)	3 (% 6,82)	21 (%10,39)	35 (%12,46)	4 (% 7,27)	64 (%10,27)
++++	-	-	8 (% 3,96)	9 (% 3,20)	-	17 (% 2,73)
TOPLAM	15 (%36,58)	29 (%65,90)	123 (%60,89)	166 (%59,07)	39 (%70,90)	372 (%59,71)

TABLO VI. ADANA DIŐINDAKİ İLLERDEN GELEN KİŞİLERDE SITMA ANTİKORLARININ YAŞ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI.

POZİTİFLİK DERECESİ	Y A Ő G R U P L A R I					
	0-10 (5 kişi)	11-20 (22 kişi)	21-40 (93 kişi)	41-60 (104 kişi)	61-fazla (21 kişi)	TOPLAM (245 kişi)
+	1 (%20,00)	3 (%13,64)	11 (%11,83)	19 (%18,27)	1 (% 4,76)	35 (%14,29)
++	1 (%20,00)	6 (%27,27)	30 (%32,26)	33 (%31,73)	6 (%28,57)	76 (%31,02)
+++	-	1 (% 4,55)	7 (% 7,53)	6 (% 5,77)	3 (%14,29)	17 (% 6,94)
++++	-	-	1 (% 1,07)	2 (% 1,92)	-	3 (% 1,22)
TOPLAM	2 (%40,00)	10 (%45,45)	49 (%52,69)	60 (%57,69)	10 (%47,62)	131 (%53,47)

TABLO VII. ADANA İLİ İLE DIŞARDAN GELENLERİN KARŞILAŞTIRILMASI.

YAŞ GRUPLARI	A D A N A İ L İ			A D A N A D I Ş I			T O P L A M		
	TOPLAM OLGU	(+) OLGU SAYISI	(+) OLGU YÜZDESİ	TOPLAM OLGU	(+) OLGU SAYISI	(+) OLGU YÜZDESİ	TOPLAM OLGU	(+) OLGU SAYISI	(+) OLGU YÜZDESİ
0-10	41	15	36,58	5	2	40,00	46	17	36,96
11-20	44	29	65,90	22	10	45,45	66	39	59,09
21-40	202	123	60,89	93	49	52,69	295	172	58,31
41-60	281	166	59,07	104	60	57,69	385	226	58,70
61-fazla	55	39	70,90	21	10	47,62	76	49	64,47
TOPLAM	623	372	59,71	245	131	53,47	868	503	57,95

TABLO VIII. ADANA DIŞINDAN GELEN OLGULARIN İLLERE GÖRE DAĞILIMI VE SITMA ANTİKORLARININ GÖRÜLME ORANI.

İLLER	TOPLAM OLGU	(+) OLGU SAYISI	(+) OLGU YÜZDESİ
MERSİN	59	32	54,24
NİĞDE	15	9	60,00
KAHRAMAN MARAŞ	30	15	50,00
GAZİANTEP	36	27	75,00
ANTAKYA	46	22	47,83
DİĞER	59	26	44,07
TOPLAM	245	131	53,47

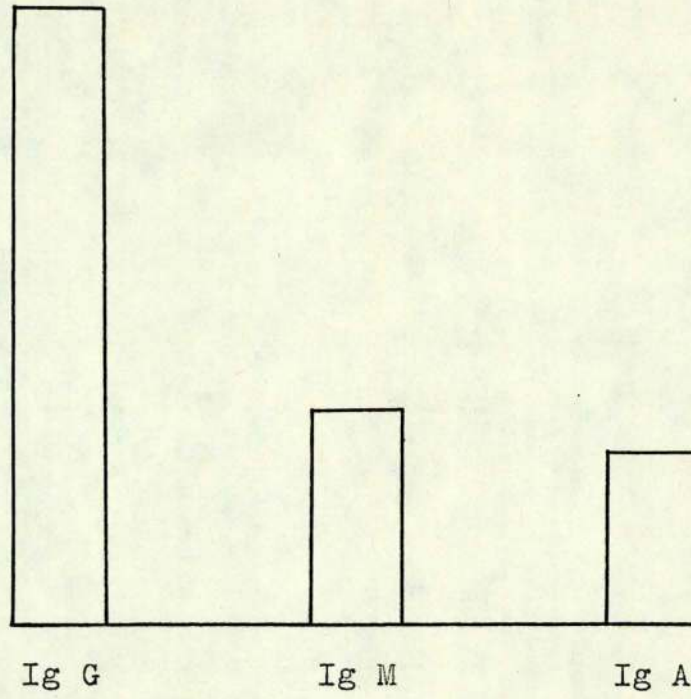
TABLO IX. SITMA ANTİKORLARI YÖNÜNDEN POZİTİF BULUNAN OLGULAR ARASINDAN RASGELE SEÇİLEN 40 SERUMUN TİTRASYON SONDEĞERLERİNİN (ENDPOINTS) DAĞILIMI.

OLGU SAYISI	D İ L Ü S Y O N L A R							GEOMETRİK ORTALAMA TİTRE
	1:20	1:60	1:180	1:540	1:1620	1:4860	1:14580	
	40	33	25	19	10	7	5	1:138

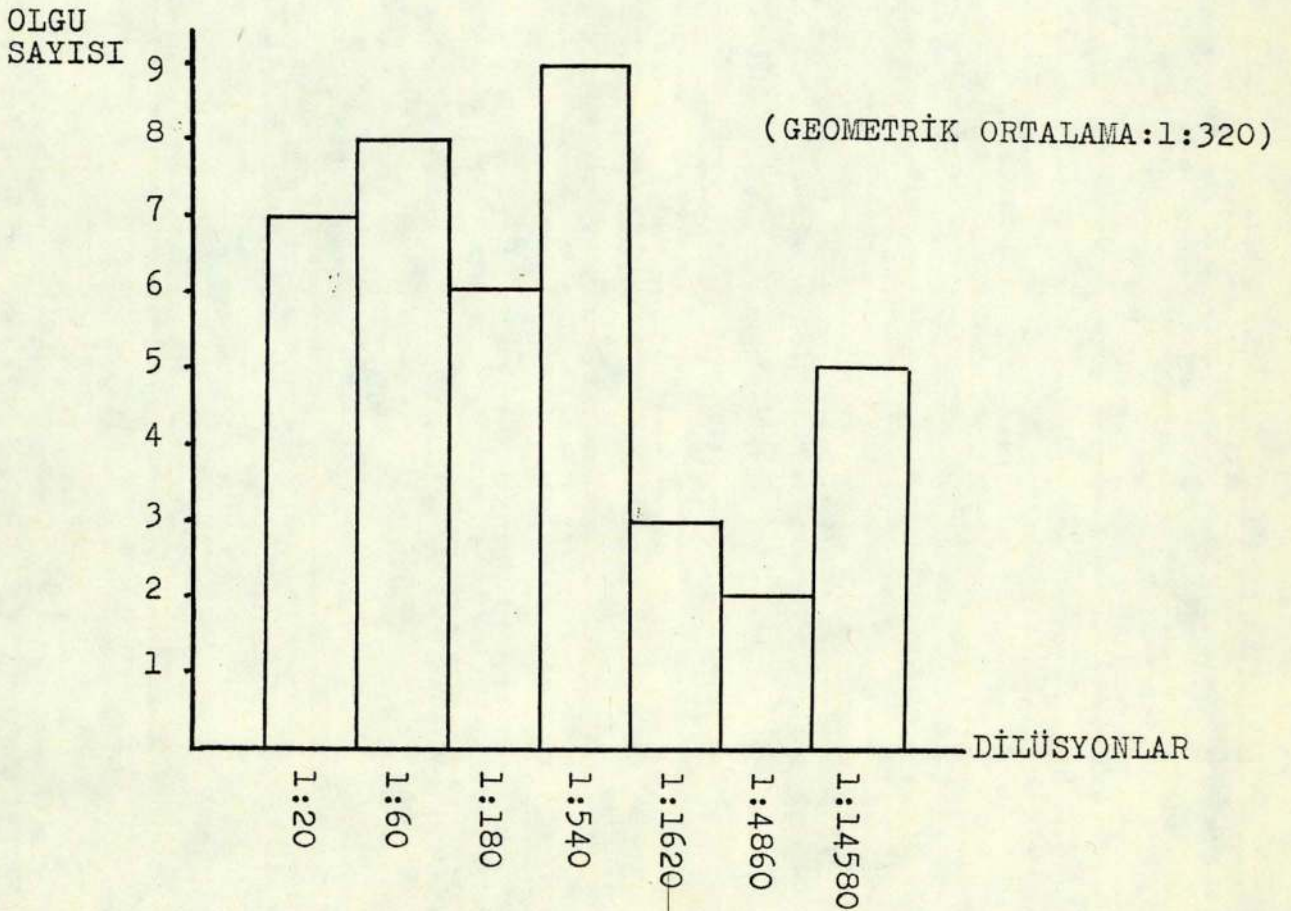
TABLO X. SITMA ANTİKORLARI YÖNÜNDEN POZİTİF BULUNAN OLGULAR ARASINDAN RASGELE
SEÇİLEN 28 SERUMDA SITMA ANTİKORLARININ TİPİ.

POZİTİFLİK DERECESİ	Ig G		Ig M		Ig A	
	sayı	%	sayı	%	sayı	%
—	-	-	9	32,34	3	10,71
ESER	-	-	1	3,57	4	14,29
+	-	-	7	25,00	15	53,57
++	-	-	7	25,00	6	21,43
+++	15	53,57	3	10,71	-	-
++++	13	46,43	1	3,57	-	-
TOPLAM	28	100,00	28	100,00	28	100,00

ŞEKİL IV. 28 OLGUDA BULUNAN SITMA ANTİKORU TİPLERİNİN POZİTİFLİK DERECELERİNE GÖRE KARŞILAŞTIRILMASI.



ŞEKİL V. TİTRASYON SON-DEĞERLERİNE GÖRE 40 OLGUNUN DAĞILIMI.



testi ile yapılan Adana içi-Adana dışı karşılaştırmasında, 0,05 olasılık düzeyinde, farkın önemli olmadığı görülmüştür($p > 0,05$). Adana il hudutları içinde oturanlardan pozitif bulunan olguların Khi kare analizinde, yaş grupları arasındaki farkın önemli olduğu ($p < 0,05$) ve bu farkın 0-10 yaş grubundan ileri geldiği görülmüştür. Adana dışından gelen olgularda yaş grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Adana dışında kalan illerin pozitiflik oranı Tablo VIII de gösterilmiştir. Uzak illerden gelenlerde bu oran en düşük(%44,07) Gaziantep'ten gelenlerde en yüksek(%75,00) bulunmuştur. Yapılan Khi kare analizinden iller arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür($p > 0,05$).

Sıtma antikorları yönünden pozitif bulunan olgular arasından rasgele seçilen 40 serumda titrasyon son-değerleri(endpoints) tayin edilmiş ve üçer misli yapılan dilüsyonlara göre olguların dağılımı Tablo IX da gösterilmiştir.Olguların en son pozitif bulundukları dilüsyonlara göre gruplandırılması Şekil V. de gösterilmiş olup bu dağılımın geometrik ortalaması 1:320 bulunmuştur.

Sıtma antikorları yönünden pozitif bulunan olgular arasından rasgele seçilen 28 serumda sıtma antikorlarının tip tayini yapılmış, serumların %100 ü Ig G, % 67,86 sı Ig M, % 89,28 i Ig A için pozitif bulunmuştur. Sonuçların pozitiflik derecelerine göre dağılımı Tablo X da, bütün olguların toplam pozitiflikleri Şekil IV de gösterilmiştir.

T A R T I Ş M A

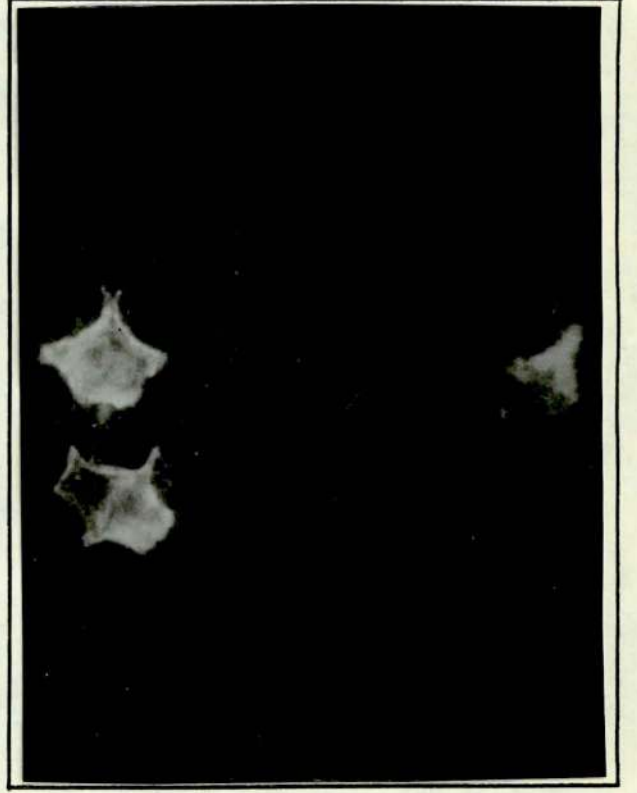
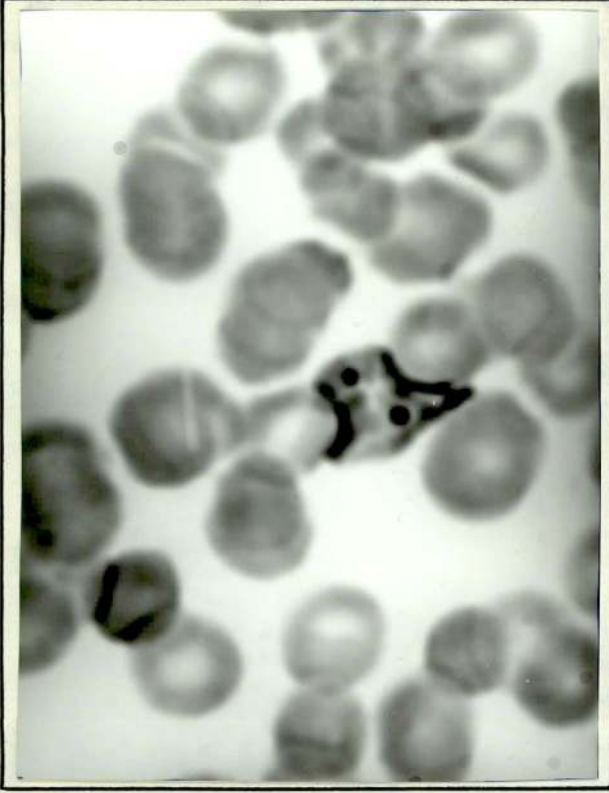
İndirekt Fluoresan Antikor Tekniği (İFAT) oldukça duyarlı bir yöntem olduğu halde hatalara neden olabilecek çok sayıda faktör söz konusudur. Tümüyle tekniğe bağlı olabilecek hataların yanında, tekrarlanabilir (reproducible) sonuçların elde edilmesindeki güvenilirlik sınırı da oldukça dardır. Bu nedenle sonuçların yorumu pek çok faktörün gözönünde tutulmasını gerektirmektedir.

Her şeyden önce İFA tekniği sübjektif bir tanı yöntemidir. Her ne kadar değerlendirmeler sırasında 1 pozitiften daha büyük hata yapılması olasılığı az ise de, pozitiflik dereceleri kaba bir ölçü olmaktadır. Pozitiflik dereceleri yerine titrasyon son-değerlerinin (endpoints) tayini ise daha objektif bir kriterdir. Bu durumda da zaman ve teknik olanaklar sorunu ortaya çıkmakta, bunun gerçekleştirilmesi için ekip çalışmasına gerek duyulmaktadır.

Bütün değişkenlerin sabit tutulabildiği düşünülse bile, antijen olarak kullanılan parazitler gelişme dönemlerine göre farklı derecede fluoresans vermektedirler. Heterolog antijenlerle yapılan çalışmalarda, deney hayvanlarında parazitin gelişme evreleri, sık sık alınan kan yaymaları ile izlenerek, belli bir gelişme dönemi oldukça uniform bir şekilde elde edilebilmekte, böylece fluoresansın daha objektif bir şekilde değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Homolog antijen kullandığımız bu çalışmada ise parazitin yüzük şekli dışında kalan değişik dönemleri ile çalışıldı. Işık mikroskopunda, rutin boyalarla, sıtma parazitin gelişme dönemlerini ayırmının çok kolay olmasına karşılık, fluoresan antikor tekniğinde, parazitin çekirdeği fluoresans vermediği için, bu iş oldukça zordur. Trofozoit şekillerin tanınmasında vakuollerin görülmesi kriter

olarak alınmıştır. Genç trofozoitler ise hücre içinde yalnız Schüfner cisimlerinin bulunması ve zayıf fluoresans vermelerinden tanınabilir. Bu nedenle aynı immersiyon alanında aydınlanması birbirinden çok farklı olan hücreler görüldüğünde, çok sayıda saha taranarak edinilen genel kanıya göre pozitiflik derecesi saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız parazitlerin Wright boyası ile ışık mikroskopunda ve fluoresan mikroskoptaki görünümünden değişik örnekler Şekil VI da verilmiştir.

Parazitlerin gelişme dönemleri açısından daha homojen bir yayma elde edebilmek için dansite gradienti tekniği önerilmiştir(18,42). Bu çalışmaya başlarken de Percoll yardımı ile konsantrasyon işlemi denendi. Ancak işlemin kendisi ve bunu izleyen yıkama sırasında, eritrositlerin hemolizi nedeniyle parazitlerin pek çoğu ortadan kaybolmaktadır. Sulzer ve arkadaşları(37) da benzer şekilde, donörden alınan kanda in-vitro olarak parazit gelişiminin devam ettiğini ve şizontların kısa süre içinde merozoitlere dönüşerek, yada dirençlerinin az olması nedeniyle yıkama sırasında parçalanarak ortadan kaybolduklarını bildirmişlerdir. Bu nedenle, ince yaymaların kullanıldığı bu çalışmada, mümkün olan en yüksek parazit oranını elde edebilmek amacı ile, antijenler yıkanmamış kandan hazırlandı. Ancak yıkanmamış eritrositlerle çalışmanın sakıncaları ile de karşılaşıldı. Örneğin, bu yaymalarda nonspesifik zemin aydınlanmasının (background illumination) yüksek olduğu görüldü. Ancak bu boyanma eritrositlerin yerinin belirlenmesi ve parazitlerin bulunmasında yönlatici olduğundan büyük sorun yaratmadı. Buna karşılık yaymanın kuruması sırasında yüzey aktivitesi nedeniyle, serum immün-globulinlerinin eritrositlerin kenarları ve aralarındaki boşluklarda birikmesi, aktif olarak fluoresanı tutan, ve yine şekilleri yayma sırasında bozulan parazitli eritrositlere çok benzeyen zemin aydınlan-



ŞEKİL VI. IŞIK VE FLUORESAN MİKROSKOPTA PARAZİTLERE AİT DEĞİŞİK GÖRÜNÜMLER.

masına neden olmaktadır. Bu nedenle zaman zaman bu iki şekli ayırmada güçlükle karşılaşıldı.

Bizim uyguladığımız yöntemde, antijenlerin ince yayma şeklinde hazırlanmalarına bağlı olarak yalancı negatif sonuç bulunma olasılığı söz konusu olabilirse de, rutin boyama yöntemleri ile antijenlerin incelenmesinde her immersiyon alanında ortalama bir parazite raslanmış, bu sıklık bazı sahalarda beşe kadar yükselmiştir. Şunu da belirtmek gerekir ki, boyama zamanı parazitlerin görülme sıklığını etkilemektedir. İmmün fluoresan teknikle, rutin boyalara oranla daha sık parazite raslanması dikkat çekicidir.

İFA yönteminde test serumlarının dilüsyon oranı oldukça önemlidir. Sulzer ve arkadaşları(40) diğer bakteriel ve paraziter hastalıklara bağlı (sifilis, toxoplasmosis, askariasis vs.) kros reaksiyon oranını 1:16'nın üzerindeki dilüsyonlarda çok düşük bulmuşlardır. Bizim araştırmamızda sulandırma derecesi olarak 1:20 kullanıldığı için ayrıca bu konular araştırılmamıştır. Diğer taraftan sıtma hastalığını gösteren dilüsyon Mc Quay ve arkadaşları tarafından(31) 1:80, Collins ve arkadaşları tarafından(12) 1:20 olarak tanımlanmıştır. Kullanılan slaytların antijenik özelliklerindeki büyük farklar nedeniyle bu değerlerin kesin kriter olarak kabul edilmesi düşünülemez. Bu çalışmada homolog antijenler kullanıldığı için rasgele seçilen örneklerden elde edilen titrasyon sonuçları, daha önce yapılan pek çok çalışmada bulunan değerlerden daha yüksektir. Bundan dolayı, bulunan bu yüksek değerler sıtma hastalığının varlığı anlamına gelmeyip, kullanılan parazit suşunun antijenik aktivitesinin yüksek olması ile açıklanabilir. Klinik olarak sıtma geçirmiş kişilerde antikor titrasyonunun yüksek olması beklenirse de, sıtmanın endemik olduğu bir bölgede yaşayan kişilerde klinik enfeksiyon olmaksızın, tekrarlayan parazitemilere bağlı ola-

rak titrasyon son-değerlerinin yüksek bulunması da söz konusudur(14). Bu değerlerin yüksek bulunmasının bir başka nedeni de çalışmamızın kapsamına giren popülasyonun daha çok erişkin ve yaşlı nüfusu kapsamasıdır. Mc Gregor ve arkadaşlarının çalışmasında (30) 0-10 yaş grubunun bütün olgulara oranı %75, Collins ve Skinner'in çalışmasında(14) %38, yine Collins ve Skinner tarafından Nijerya'da yapılan çalışmada(13) 0-9 yaş grubunun oranı %44 iken bizim çalışmamızda bu yalnızca % 5,3 tür.

Bazı araştırmacılar, antijenlerin hazırlanması sırasında donörün antikorlarının in-vivo olarak plasmodiumlar tarafından bağlandığını ileri sürmüşlerdir(23,37,38). Bu olayın sonucunda, parazitler fluoresan ile bağlanmış anti-insan globulini ile nonspesifik olarak bağlanmaktadır. Aynı konuyu araştıran Sulzer ve arkadaşları (40) bu birleşmenin in-vivo değil in-vitro olduğunu ve antijenlerin hazırlandığı donörün kanının yıkanması ile bu durumun önlenebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda böyle bir reaksiyonu ekarte edebilmek için, antijenler önce birkaç kez yalnız PBS ve fluorescein ile bağlanmış anti-insan serumu ile inkübe edilerek denenmişler ve spesifik fluoresans yönünden negatif bulunmuşlardır.

İFA tekniği bir toplumun sıtma paraziti ile karşılaşmışlığının ölçütü olarak yararlı ve duyarlı bir testtir. Hernekadar titrasyon değerlerini karşılaştırmak standardizasyon güçlüğü nedeniyle mümkün değilse de, pozitif bulunan serumların oranı plasmodium yaygınlığını belirtmesi bakımından değerlidir. Daha önce değişik ülkelerde yapılan çalışmaların, çalışmamızda bulduğumuz değerlerle karşılaştırılması, Türkiyede ve özellikle Çukurova ve çevresinde sıtmanın yaygınlığını göstermek bakımından yararlı olacaktır. Bu karşılaştırmada daha doğru bir sonuca ulaşabilmek için, bizim taradığımız grupta önemli bir yer tutan 0-10 yaş grubunu hariç tutmak

uygun olacaktır. Collins ve Skinner'in Malaysia'da yaptığı bir çalışmada, 11 yaşın üzerinde *P. falciparum* antikorları %86,9, *P. malariae* antikorları %76,8 bulunmuştur. Aynı yazarlar yine Malaysia'da 397 serum üzerinde yaptıkları araştırmada 1:20 ve üzerindeki dilüsyonlarda *P. falciparum* antikorlarını %79, *P. vivax* antikorlarını %58, *P. malariae* antikorlarını da % 63 oranında bulduklarını bildirmişlerdir. Diğer bir epidemiyolojik çalışmada ise Nijerya'da(13) 13 ve yukarı yaştaki popülasyonda sıtma antikorları 1:20 ve daha yukarı dilüsyonlarda % 95 oranında pozitif bulunmuştur. Bizim çalışmamızda 11 ve daha yukarı yaştaki pozitif serumların oranı % 59 dur. Ülkemizde sıtma türü olarak hemen daima *P. vivax*'a raslandığından, bunu tipe özgü antikorların oranı olarak da kabul edebiliriz. Görüldüğü gibi Çukurova ve çevresindeki sıtma yaygınlığı, sıtmanın hiperendemik olduğu bölgelerle kıyaslanabilecek boyutlardadır.

Adana dışından gelen grubun pozitiflik oranının yaş gruplarına göre düzgün bir artış göstermesine karşılık, Adana il sınırları içinden gelenlerde, 21-60 yaşlar arasında görülen ve istatistik değeri olmayan düşme, Çukurovaya mevsimlik olarak gelen işçilere bağlı nüfus hareketlerinin sonucu olsa gerektir.

Daha önce yapılan pek çok araştırmadan çıkan ortak bir sonuç yaşın ilerlemesiyle birlikte sıtma antikorlarının pozitiflik oranı ve titrasyon son-değerlerinin yükselmiş olmasıdır(22,14). Collins ve Skinner Malaysia'da *P. falciparum* antikorları yönünden, 0-10 yaş grubunu %48,2, *P. malariae* yönünden ise % 26,1 pozitif bulmuştur. 11 ve yukarıdaki yaş grubunda bu değerle daha önce de belirtildiği gibi sırasıyla %86,9 ve % 76,8 idi. Bizim çalışmamızda da 0-10 yaş grubunda sıtma antikorlarının oranı (%36,96), 11 ve daha yukarı yaştakilere göre (%59) daha düşük bulunmuş olup Collins ve Skinner'in çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Strata ikide bulunan Niğde ilinde sıtma antikorlarının %60 gibi bir oranda bulunması çelişkili görülmektedir. Olgu sayısının azlığı ve Niğde ili içinde sadece bir yerleşim merkezinin Adana ile yakın bağlantısının bulunması gözönüne alınırsa bu sonucun güvenilir olmadığı ortadadır. Diğer taraftan Gaziantep'ten gelen olgularda sıtma antikorlarının yüksek oranda bulunması bu yörede yaşayanların sıtma paraziti ile temaslarının fazla olduğunu göstermektedir. Uzak illerden gelenler arasında bu oran beklendiği gibi düşük bulunmuştur.

Sıtma antikorlarının tip tayini daha önceden bilindiği gibi sonuç vermiş ve sıtma antikorlarının esas olarak Ig G daha az oranda da Ig M ve Ig A dan oluştuğu görülmüştür.

Ö Z E T

Bu çalışmada sıtmalı bir hastadan alınan kandan yıkanmadan hazırlanan ince kan yayması şeklindeki homolog antijenler kullanılarak, Adana il sınırları içinden, komşu illerden ve az sayıda olmak üzere uzak bölgelerden gelen toplam 868 olguda İndirekt Fluoresan Antikor (İFA) Yöntemi ile sıtma antikorlarının görülme sıklığını araştırdık. Taranan popülasyonda bu oran %57,95 bulundu. Adana ili ile çevre iller arasında sıtma antikorunun pozitiflik oranı yönünden farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü. Yaşın artması ile sıtma antikorlarının yüzdesinde de artma olduğu, bu farkın, Adana ili ve popülasyonun ortalama değerleri gözönüne alındığında önemli olduğu, Adana dışından gelen olgularda ise 0,05 olasılık düzeyinde önemsiz olduğu görüldü.

Pozitif bulunan olgular arasından rasgele seçilen 40 serumda titrasyon son-değerleri (endpoints) tayin edildi. Bu serumların titrasyonunun geometrik ortalaması 1:320 olarak bulundu.

Yine pozitif bulunan olgular arasından rasgele seçilen 28 serumda sıtma antikorlarının tipi araştırılarak hepsinin Ig G, % 67,86 sinin Ig M, % 89,28 inin Ig A içerdiği ve Ig G nin diğerlerine oranla çok daha kuvvetli reaksiyon verdiği görüldü.

K A Y N A K L A R

1. Abele, D.C., Tobie, J.E., Hill, G.J., Contacos, P.G., Evans, C.B.: Alterations in serum proteins and 19 S antibody production during the course of induced malarial infections in man. Amer. J. Trop. Med., 14:191-7, 1965
2. Boyd, M.F., Proske, H.O.: Observations on the blood proteins during malaria infections. Amer. J. Trop. Med., 21:245-60, 1941
3. Brown, I.N.: Immunological aspects of malaria infection. Advances in Immunology, 11:267-349
4. Brown, K.N.: Protective immunity to malaria provides a model for survival of cells in an immunologically hostile environment. Nature (London), 230:163-67, 1971
5. Brown, K.N.: Resistance to malaria. "Immunology of Parasitic Infections". S. Cohen, E.H. Sadun, Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.268, 1976
6. Brown, K.N., Hills, L.A.: Antigenic variation and immunity to Plasmodium knowlesi; antibodies which induce antigenic variation and antibodies which destroy parasites. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 68:139-43, 1974
7. Cohen, S., Mc Gregor, I.A., Carrington, S.: Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature (London), 192:733-7, 1961
8. Cohen, S., McGregor, I.A.: Gamma-globulin and acquired immunity to malaria. "Symposium on Immunity to Parasite Infections". p.123-159, Blackwell Pub. Co., Oxford, Eng., 1962

9. Cohen, S., Butcher, G.A., Crandall, R.B.: Action of malarial antibody in vivo. *Nature*(London), 223:368-71, 1969
10. Cohen, S., Butcher, G.A.: Serum antibody in acquired malarial immunity. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 65:125-35, 1971
11. Cohen, S.: Immunoprophylaxis of protozoal diseases. "Clinical aspects of Immunology" (3rd ed.). P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs, P.J. Lachmann (eds.). Oxford, Blackwell Scien. Pub., p.1649, 1974
12. Collins, W.E., Geffery, G.M., Guin, E., Skinner, J.C.: Fluorescent antibody studies in human malaria. IV. Cross-reactions between human and simian malaria. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 15:11-5, 1966
13. Collins, W.E., Skinner, J.C., Coifman, R.E.: Fluorescent antibody studies in human malaria. V. Response of sera from Nigerians to five Plasmodium antigens. *Amer. J. Trop. Med.*, 16:568-71, 1967
14. Collins, W.E., Skinner, J.C.: The indirect fluorescent antibody test for malaria. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 21,5:690-5, 1972
15. Criswell, B.S., Butler, W.T., Rossen, R.D., Knight, V.: Murine malaria: the role of humoral factors and macrophages in the destruction of parasitized erythrocytes. *J. Immun.*, 107:212-21, 1971
16. Danforth, H.D., Orjih, A.U., Nussenzweig, R.S.: Immunofluorescent staining of exoerythrocytic schizonts of Plasmodium berghei in fixed liver tissue with stage-specific immune serum. *J. Parasit.*, 64:1123, 1978
17. Dole, V.P., Emerson, K.: Electrophoretic changes in the plasma protein patterns of patients with relapsing malaria. *J. Clin. Invest.*, 24:644-7
18. Eling, W.: Ficoll fractination for the separation of parasitized erythrocytes from malaria infected blood. *Bull. WHO*, 55:105-14, 1977

19. El Nahal, H.M.S.: Fluorescent antibody technique applied to the study of serological cross-reactions of exoerythrocytic schizonts of avian, rodent and simian malaria. Bull. WHO, 37:154, 1967
20. Golsener, J., Spira, D.T., Zuckerman, A.: Neutralizing antibody in rodent malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 69:251-8, 1975
21. Huchet, R., Feldman, M.: Studies on antibody affinity in mice. Europ. J. Immunol., 3:49-55, 1973
22. Jeffery, G.M.: Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of Plasmodium Bull. WHO, 35:873-82, 1966
23. Kreier, J.P., Ristic, M.: Detection of a Plasmodium beghei-antibody complex formed in vivo. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 13:6-10, 1964
24. Krotoski, W.A., Jumper, J.R., Collins, W.E.: Immunofluorescent staining of exoerythrocytic schizonts of simian Plasmodia in fixed tissue. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 22:159, 1973
25. Kuvin, S.F., Tobie, J.E., Evans, C.B., Coatney, G.R., Contacos, P.G.: Antibody production in human malaria as determined by the fluorescent antibody technique. Science, 135:1130-1, 1962
26. Manawadu, B.R., Voller, A.: Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72,5:456-62, 1978
27. Manawadu, B.R., Voller, A.: Detection and measurement of species-specific malarial antibodies by immunofluorescence tests. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72,5:463-66, 1978
28. McGregor, I.A., Carrington, S., Cohen, S.: Treatment of East African Plasmodium falciparum malaria with West African human gamma-globulin. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 57:170-5, 1963

29. McGregor, I.A.: Consideration of some aspects of human malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 59:145-52, 1965
30. McGregor, I.A., Williams, K., Voller, A., Billewicz, W.Z.: Immunofluorescence and the measurement of immune response to hyperendemic malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 59,4:395-414, 1965
31. McQuay, R.M., Silberman, S., Mudrik, P., Keith, L.E.: Congenital malaria in Chicago, a case report and a review of published reports. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 16:258-66, 1967
32. Nardin, E.H., Nussenzweig, R.S., McGregor, I.A., Bryan, J.H.: Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. Science, 206:597-9, 1979
33. Özcel, M.A.: İmmunofloresans ve parazitolojide uygulanması. Ege Univ. Tıp Fak. yayınları, 108, 1978
34. Pasvol, G., Wilson, R.J., Smalley, M.E., Brown, J.: Separation of viable schizont-infected red cells of Plasmodium falciparum from human blood. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72(1):87-8, 1978
35. Philips, R.S.: Plasmodium berghei: passive transfer of immunity by antisera and cells. Exp. Parasitol., 27:479-95, 1970
36. Philips, R.S., Wolstencroft, R.A., Brown, K.N., Dumonde, D.C.: Immunity to malaria. III. Possible occurrence of a cell-mediated immunity to Plasmodium knowlesi in chronically infected and Freund's complete adjuvant sensitized monkeys. Exp. Parasitol., 28:239-355, 1970
37. Sodeman, W.A. Jr., Jeffery, G.M.: Immunofluorescent studies of Plasmodium berghei: A "natural" antibody in white mice. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14:187-90, 1965

38. Sodeman, W.A. Jr., Jeffery, G.M.: Indirect fluorescent antibody test for malaria antibody. Public Health Rep., 81:1037-41, 1966
39. Sulzer, A.J., Wilson, M.: The use of thick-smear antigen slides in the malaria indirect fluorescent antibody test. J. Parasitol. 53:1110-1, 1967
40. Sulzer, A.J., Wilson, M., Hall, E.C.: Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. Amer. J. Trop. Med., 18:199-205, 1969
41. Target, G.A.T.: Antibody response to Plasmodium falciparum malaria. Comparisions of immunoglobulin concentrations, antibody titres and the antigenicity of different asexual forms of parasites. Clin. Exp. Immun., 7:501-17, 1970
42. Tosta, C.E., Sedegah, M., Henderson, D.C., Wedderburn, N.: Plasmodium yoelii and Plasmodium berghei: isolation of infected erythrocytes from blood by colloidal silica gradient centrifugation. Exp. Parasitol., 50:7-15, 1980
43. Unat, E.K.: Sıtma tarihi. Sıtma Bilimi "Malariology". Türkiye Parazitoloji Derneği yayını No. I, 1979
44. Vanderberg, J.P.: Inactivity of rodent malaria anti-sporozoit antibodies against exoerythrocytic forms. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 22:573, 1973
45. Voller, A.: Serodiagnosis of malaria (ch. 9). Immunology of parasitic infections . Cohen, S., Sadun, E. Blackwell Scientific Pub., Oxford, Eng., 1976
46. Ward, P.A., Conran, P.B.: Application of fluorescent antibody to exoerythrocytic stages of simian malaria. J. Parasitol., 54:171, 1968

