

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**DENEYSEL FARE TOKSOPLAZMOZUNDA KAN VE ÇEŞİTLİ DOKU
ÖRNEKLERİNDE ENFEKSİYON TANISININ POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYON YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

Muhammad Y.Noral

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR

ANKARA
Şubat 2007

Bu tez 'Türkmeneli İşbirliği ve Kültür Vakfı' tarafından desteklenmiştir

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER.....	I
TABLolar	IV
ŞEKİLLER.....	VI
SİMGE VE KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Etiyoloji.....	6
2.2. Tarihçe.....	6
2.3. Sınıflandırılması.....	7
2.4. Morfoloji ve Üreme Özellikleri.....	8
2.5. Evrim.....	11
2.6. Epidemiyolojisi ve Bulaşması.....	13
2.7. Patogenez, Klinik Belirtiler ve İmmünite.....	17
2.8. Tanı.....	27
2.9. Tedavi.....	39
2.10. Korunma.....	40
2.11. Hayvan Modelinde Toksoplazmoz.....	41
2.12. Hedef Amplifikasyon Yöntemlerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	43
2.13. İki Turlu (Nested) PZR.....	46
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	47
3.1. Gereçler	47

3.2. Yöntemler	53
3.2.1. <u>Fareye pasaj için <i>T.gondii</i> içeren periton sıvısının</u>	
hazırlanması.....	53
3.2.2. <u>Fareye pasaj işlemi.....</u>	54
3.3. Öldürülen Enfekte Farelerden Dokuların Alınması.....	54
3.4. <i>Toxoplasma gondii</i> DNA'sının Ekstraksiyonu.....	55
3.5. Amplifikasyon.....	57
3.6. Jel'de Yürütme ve Görüntüleme İşlemi.....	59
3.7. PZR ile B1 Gen Bölgesi ve 529 bç Ardışık Tekrar Bölgesi	
Geninin Primerlerinin Duyarlılıklarının Ölçülmesi.....	59
3.8. İstatistiksel Analizler.....	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. Fare ve <i>T.gondii</i> İzolatları.....	60
4.2. Enfekte Fare Dokularının Makroskopik Bulguları.....	60
4.3. Deney Gruplarında B1 Geni Primerleri Kullanılarak İki Turlu	
PZR Yöntemiyle Saptanan <i>T.gondii</i> DNA Sonuçları.....	64
4.4. Deney Gruplarında 529 bç Ardışık Tekrar Bölgesi Geni Primerleri	
Kullanarak Konvensiyonel PZR Yöntemiyle Saptanan <i>T.gondii</i> DNA	
Sonuçları.....	68
4.5. B1 gen Primeri ve 529 bç Ardışık Tekrar Bölgesi Geni Primerinin	
PZR Yöntemiyle Saptayabildikleri <i>Toxoplasma</i> Takizoit Miktarının	
Belirlenmesi.....	77
4.6. Kan ve Doku Örneklerinde <i>T.gondii</i> Takizoitlerinin Gösterilmesi...	79

5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ.....	96
7. ÖZET.....	98
8. SUMMARY.....	100
9. KAYNAKLAR.....	102
10. ÖZGEÇMİŞ.....	117

TABLOLAR

Sayfa

Tablo 1 : Ciddi toksoplazmoz riski olan kişiler.....	19
Tablo 2 : Hamilelik döneminde toksoplazmozdan korunmak için	
Öneriler	41
Tablo 3 : Deneylerde kullanılan farelerin özellikleri.....	43
Tablo 4 : Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler, hedef bağlanma bölgeleri ve beklenen PZR ürünü uzunlukları.....	52
Tablo 5 : 1.Grup: Enfeksiyondan 24 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki turlu PZR ile gösterilmesi.....	64
Tablo 6 : 2.Grup: Enfeksiyondan 48 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki turlu PZR ile gösterilmesi.....	65
Tablo 7 : 3.Grup: Enfeksiyondan 72 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki turlu PZR ile gösterilmesi.....	66
Tablo 8 : 4.Grup: Enfeksiyondan 96 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki turlu PZR ile gösterilmesi.....	67
Tablo 9 : 1.Grup: <i>Toxoplasma gondii</i> enfeksiyonundan 24 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi genini PZR ile gösterilmesi.....	69
Tablo 10 : 2.Grup: <i>Toxoplasma gondii</i> enfeksiyonundan 48 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi.....	70

Tablo 11 : 3.Grup: <i>Toxoplasma gondii</i> enfeksiyonundan 72 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi.....	71
Tablo 12: 4.Grup: <i>Toxoplasma gondii</i> enfeksiyonundan 96 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi.....	72
Tablo 13 : Kontrol grubunda <i>Toxoplasma gondii</i> B1 geni ve 529 bç ardışık tekrar Bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi.....	74
Tablo 14 : B1 geni iki türlü PZR yöntemiyle elde edilen band sayısı.....	76
Tablo 15 : 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni konvansiyonel PZR ile elde edilen band sayıları.....	76
Tablo 16 : B1 gen primeri ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni primerinin PZR yöntemiyle saptayabildikleri <i>Toxoplasma</i> takizoit sayıları.....	78

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1 : ' <i>Mus domesticus domesticus</i> ' fareleri kafeste.....	42
Şekil 2 : Gen Bankası çekirdek nükleotid veritabanında (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?&DB=nucore) yer alan AF146527 numaralı kayda göre 200 – 300 kez ardışık olarak tekrar eden 529 bazlık bölge geni üzerinde TOXO4 ve TOXO5 oligonükleotid primerlerin bağlanma yerleri.....	51
Şekil 3 : Gen Bankası çekirdek nükleotid veritabanında (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?&DB=nucore) yer alan AF179871 kayıt numaralı B1 üzerinde B1 – B2 dış ve B3 – B4 iç oligonükleotid primer çiftlerinin yerleşimi.....	53
Şekil 4 : Enfeksiyonun 96'ncı saatinde Enfekte Fare Beyini.....	61
Şekil 5 : Kontrol Grubu Fare Beyini.....	61
Şekil 6 : Enfeksiyonun 96'ncı Saatinde Enfekte Fare Dalağı.....	62
Şekil 7: Kontrol Grubu Fare Dalağı.....	62
Şekil 8: Enfeksiyonun 96'ncı Saatinde Enfekte Fare Karaciğeri.....	63
Şekil 9: Kontrol Grubu Fare Karaciğeri.....	63
Şekil 10: B1 gen bölgesini hedefleyen B1, B2, B3 ve B4 primer ile farklı doku ve kan örneklerinden elde edilen 530 baz uzunluğundaki PZR ürünleri.....	68
Şekil 11: 529 bç ardışık tekrar bölge genini hedefleyen TOXO4 – TOXO5 primer çifti ile farklı doku ve kan örneklerinden elde edilen 533 baz	

uzunluğundaki PZR ürünleri.....	73
Şekil 12 : B1 geni iki türlü PZR sonuçları.....	75
Şekil 13 : 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni konvansiyonel PZR sonuçları.....	75
Şekil 14 : 529 bazlık ardışık tekrar bölgesi genini hedefleyen TOXO4 – TOXO5 primer çifti ile $1,4 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^7$ takizoid/ml arası 10 kat seri parazit dilüsyonlarından elde edilen 533 baz uzunluğundaki PZR ürünleri.....	78
Şekil 15 : B1 gen bölgesini hedefleyen B1, B2, B3 ve B4 primer ile $1,4 \times 10^1$ - $1,4 \times 10^7$ takizoid/ml arası 10 kat seri parazit dilüsyonlarından elde edilen 530 baz uzunluğundaki PZR ürünleri.....	79
Şekil 16 : Enfekte farenin kan örneğinde bir grup <i>T.gondii</i> takizoitleri....	80
Şekil 17 : Enfekte fare kanında <i>T.gondii</i> takizoitleri.....	80
Şekil 18 : Dalak granülom dokusunun görünümü (Hematoksilen-Eosin Boyası X 100).....	81
Şekil 19 : Karaciğer dokusunda <i>T.gondii</i> takizoitleri (Giemsa boyası X 100).....	81

SİMGE VE KISALTMALAR

IFAT : İndirek Floresan Antikor Testi

IHA : İndirek Hemaglütinasyon Testi

LA : Lateks Aglütinasyon Deneyi

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

KBD : Kompleman Birleşmesi Deneyi

ISAGA : Immunosorbent Aglütinasyon Assay

DS-IgM-ELISA : Double Sandwich IgM Enzyme Lynked Immunosorbent Assay

DT : Dye testi

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NaCl : Sodyum klorür

AIDS : Acquired immune deficiency syndrome = Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu

HIV : Human Immunodeficiency Virus = İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü

TLR : Toll-like receptor

IL-12 : İnterlökin 12

INF γ : İnterferon Gama

TNF α : Tümör Nekroz Faktör alfa

Th : T helper hücre

BOS : beyin omurilik sıvısı

BAL : bronkoalveolar lavaj

DNA : Deoksiribonükleik asit

RNA : Ribonükleik asit

WHO : World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

IÜ : International unit

ELB : Erythrocyte lysis buffer

CLB : Cell lysis buffer

bp : Base pair (baz çift)

rpm : Revolutions per minute

N : Negatif

P : Pozitif

NK : negatif kontrol

PK : pozitif kontrol

TBE : Tris-borik asit EDTA

1. GİRİŞ

Apicomplex gurubundaki *Toxoplasma* cinsinin insan, diğer memeliler ve kanatlılarda yerleşip hastalık etkeni olabilen tek türü *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*)'dir. *Toxoplasma gondii* ilk kez Nicolle ve Manceaux isimli araştırmacılar tarafından, Kuzey Afrika'da 1908 yılında *Ctenodactylus gundi* denilen bir kemiricide görülüp tanımlanmıştır. Bu protozoonun yaşam döngüsü ancak 1960'lı yıllarda tam olarak açıklığa kavuşmuştur. Buna göre *T.gondii*'nin son konağı kedi ve kedigiller, ara konağı ise başta insan olmak üzere çeşitli omurgalı canlılardır. Parazit ara konaklarda eşeysiz, son konağın bağırsak epitel hücrelerinde hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalır¹.

Zoonotik bir parazitoz olan toksoplazmoz dünyada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Dünya insan nüfusunun üçte biri *T.gondii* ile enfektedir. *Toxoplasma gondii*'nin tüm genotipleri güney kutbu hariç tüm kıtalarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Ancak sıcak ve kuru iklimlerde nemli iklimlere göre daha az görülmekte, yüksek bölgelerde de düşük oranda bulunmaktadır². Amerika Birleşik Devletlerinde yetişkin insanların yaklaşık %30'unda parazit saptanmaktadır³. Yurdumuzda ise coğrafik konum, iklim ve sosyo-ekonomik yapı nedeniyle gerek insan ve gerekse hayvanlarda paraziter hastalıklar yaygın olarak bulunmaktadır. Toksoplazmoz prevalansı yüksek görülmekte ancak prevalans değerindeki farklılıkların kullanılan değişik tanı yöntemleriyle yakından ilişkili olduğu

düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalara göre ülkemizde *T.gondii*'ye karşı IgG antikorları % 23.1– 48.6 oranında saptanmaktadır⁴⁻⁸.

Primer enfeksiyon başlangıçta genellikle subkliniktir. Enfekte kişilerin çoğu asemptomatik kalırlar. Bazılarında ise hafif belirtiler ortaya çıkar. Bununla beraber morbidite ve mortiliteye neden olabilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ise, latent enfeksiyonun reaktif olması ensefalit, oküler toksoplazmoz gibi hastalıklara neden olur⁹.

Primer maternal toksoplazmoz enfeksiyonu fetüse geçme riski taşır. Bu da konjenital toksoplazmoza yol açar. Enfeksiyonun ağır veya hafif seyretmesi parazitin fetüse geçtiği hamilelik dönemi ile ilişkilidir¹⁰.

Toksoplazmozda klinik belirtiler, özellikle doğumdan sonraki bulaşmalarda çok tipik değildir. Konjenital bulaşmada doğumda görülen koryoretinit, serebral kalsifikasyonlar ve hidrosefali veya mikrosefali bu parazitoza işaret edebilir. Kesin tanı laboratuvar bulgularına göre konur¹.

Laboratuvar tanısında etkenin hasta örneklerinden izolasyonu ve serolojik tanı önemlidir. Son yıllarda serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı takizoitler ile çalışılan Sabin-Feldman boya testi ve İndirek Floresan Antikor Testi (IFAT), İndirek Hemagglütinasyon

Testi (IHA), Lateks Aglütinasyon Deneyi (LA) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha duyarlı ve daha özgül bulunmuştur. Bunun nedeni enfeksiyon esnasında helmintlerin kütikula antijenlerine karşı öncelikle oluşan IgM ve IgG antikorları ile çapraz reaksiyon vermemesidir^{11, 12}.

Son zamanlarda moleküler yöntemlerin Mikrobiyoloji bilim alanına girmesi ile parazitozların tanısında da bu yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

Serolojik tanı yöntemleri ile doğum öncesi ve immün sistemi baskılanmış hastalarda toksoplazmoz tanısını koymak kolay olmamaktadır. Bu gibi durumlarda moleküler tanı yöntemleri önem kazanır ve bu tür hastalarda, hastanın immünolojik durumundan bağımsız olarak tanı konulabilmektedir¹³. Bu yüzden *T.gondii* için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi değerli bir alternatif yöntem olarak kabul edilmektedir. *Toxoplasma gondii*'nin saptanması için kullanılan PZR yöntemleri farklı uzman gruplar tarafından çalışılmış ve sonuçları hayvan inokülasyon sonuçları ile uygun bulunmuştur¹⁴.

Toxoplasma gondii'nin moleküler tanısı için kullanılan, 35 kopyadan oluşan B1 geni ilk defa 1989 yılında Burg ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. B1 geninin fonksiyonu tam olarak bilinmese de *T.gondii* için özgül bir gendir¹³.

Homan ve arkadaşları 2000 yılında *T.gondii*'ye özgül olan ve 200 ila 300 kopyadan oluşan 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni bulmuşlardır. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile çalışıldığında, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni B1 genine göre 10 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Özel koşullarda çalışıldığında, B1 geni *T.gondii* DNA genomundan en az 200 fg saptayabilmesine karşılık, 529 bç 20 fg *T.gondii* DNA'sını saptayabilmektedir^{13, 14}.

Toksoplazmozun tanısının doğru ve duyarlı bir şekilde yapılması özellikle konjenital enfeksiyon açısından önemlidir. Serolojik tanıda bağışık yetmezlikli hastalarda antikor yanıtının yetersiz oluşu, konjenital toksoplazmozun tanısında antikor yanıtının uzaması, akut ve geçirilmiş enfeksiyonun tam ayrılamaması gibi nedenlerden dolayı karşılaşılan güçlükler moleküler tanıyı gündeme getirmiştir.

Bu nedenle çalışmamızda deneysel bir model oluşturarak, *T.gondii*'nin etkilediği önemli organlarda parazitin gösterilmesinde moleküler yöntemin ne derece etkin ve duyarlı olduğu amaçlanmıştır.

Ayrıca, Mikrobiyolojinin birçok alanında rutin tanıya giren moleküler yöntemlerin henüz çok yaygınlaşmadığı parazitoloji konularında da uygulanabilirliğinin araştırılması çalışmanın bir diğer hedefidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Etiyoloji:

Toxoplasma gondii toksoplazmoz hastalığının etkenidir. Son konağı evcil kediler veya kedigil ailesinin diğer üyeleridir, ara konağı ise insan ve diğer memelilerdir¹⁵.

2.2.Tarihçe:

Bu parazit ilk kez 1908 yılında Charles Nicolle ve Louis Manceaux tarafından Pasteur Enstitüsünde tanımlanmıştır. Nicolle ve Monceaux *T.gondii*'yi parazitin tür ismini aldığı bir Afrika kemirgeni olan *Ctenodactylus gundii*'de bulmuşlardır. Aynı zamanda Brezilya'da Sao Paulo'da, Portuguese hastanesinde Alfonso Splendore mikroorganizmayı laboratuvar tavşanlarından izole etmiştir³. Cins ismi organizmanın yay şekline benzemesi nedeniyle Yunan dilinde başı ile selamlamak anlamdaki *toxon* kelimesinden alınmıştır¹⁶. Levaditi ve arkadaşları tarafından 1929 yılında tavuk embriyo kültüründe üretilmiştir¹⁷.

Wolf ve Cowen 1937 yılında Columbia Üniversitesinde menengoensefalit tanısı konulan bir çocuğun merkezi sinir sistemindeki lezyonundan paraziti saptamışlardır. Önceden tüberküloz veya sifiliz lezyonu olarak düşünülen kronik nekrotik retina lezyonlarında *Toxoplasma* bulunduğu 1952 yılında Wilder tarafından gösterilmiştir^{2, 17}.

Toxoplasma gondii'nin yaşam döngüsü tam olarak 1970 yılında açıklanmıştır. Serolojik kanıtlar organizmanın insanlar arasında yaygın olduğunu göstermesine rağmen, hastalığın semptomatik formu nadiren ortaya çıkmaktadır³.

Toxoplasma gondii Türkiye'de 1950 yılında Akçay arkadaşları tarafından ilk kez bir köpekte bulunmuştur. Parazitin insanda varlığı 1953 yılında Unat ve arkadaşları tarafından histopatolojik inceleme ile saptanırken; insanda, köpekte ve koyunda ilk izolasyonu ve kesin tanısı Altıntaş ve arkadaşları tarafından 1973 yılında gerçekleştirilmiştir¹⁸.

Ruskin ve Remington, 1976 yılında organ nakli yapılan ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan yetişkin hastalarda latent toksoplazmozun reaktivasyonunu göstermişlerdir. Luft ve arkadaşları ise, 1980 yılında AIDS'li hastalarda, multifokal ensefalitle gelişen santral sinir sistemi reaktivasyonunun toksoplazmozun majör göstergesi olduğunu belirtmişlerdir².

2.3. Sınıflandırılması:

Toxoplasma gondii, Apicomplexa şubesinin bir üyesidir. Sporozoa sınıfında, Coccidia alt sınıfında, Eucoccidia takımında ve Eimeria alt takımında yer almaktadır. Diğer Coccidia'larla iç içe ilişkilidir ve

özellikle de malarial parazitlerle belirli benzerlikleri vardır. Coccidian bir parazit olarak 1969 yılında kabul edilmiştir^{3, 2}.

Fichera ve Roos'ın moleküler analizlerine göre, *T.gondii* yeşil alg soyundan gelmektedir².

2.4. Morfoloji ve Üreme Özellikleri:

Toxoplasma gondii zorunlu hücre içi parazitidir. Çok defa hücre içinde, nadiren de hücre dışında tek tek, ikiye veya küçük ya da kalabalık gruplar halinde bulunur¹⁹.

Parazitin üç şekli vardır:

- A. Takizoit (trofozoit = endozoit); hızlı çoğalan form
- B. Bradizoit (kistizoit); doku kisti içinde yavaş çoğalan form
- C. Ookist; yalnızca kedi dışkısında bulunan form^{18, 20}

Takizoitler:

Takizoitler (tachos = hız, Yunanca) Frenkel tarafından ara konakların her çeşit hücrelerinde ve son konakların bağırsakları dışında saptanmıştır. Takizoitler aynı zamanda trofozoit olarak da tanımlanmaktadır. Endodiyozoitler veya endozoitler gibi sinonim adları bulunmaktadır. İnvaziv şekil olan takizoitler çabuk çoğalan formlardır ve akut enfeksiyon esnasında görülmektedir. Portakal dilimi, muz, yarım ay veya oval olup, bir ucu sivri diğer ucu yuvarlaktır. Bu yapılar kamçı, kirpik

ve yalancı ayaklara sahip değildir. Hareketlerini kayma ve burkulma ile sağlar. Dört – 8 µm boyunda ve 2–4 µm enindedir. Apicomplexa kök altının özelliği olan konoid yapısı (spiral dizilimli mikrotübüllerin üzerindeki polar cisim) etkenin hücrelere girişinde darbeleme işlevi görür²⁰. Ayrıca *T.gondi*'nin salgıladığı bir madde bu girişi kolaylaştırır. Hücreye giren takizoitler ikiye bölünme veya endodiogeni (iç tomurcuklanma) ile çoğalır. Trofozoit formlarında elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde, konoid, kutup halkası, toksonem, golgi aparatı, endoplazmik retikulum, lizozomlar, nukleus gibi yapılar içerdiği görülmüştür^{18, 20, 21}.

Bradizoit:

Parazitin ikinci şekli olan bu doku kistleri yuvarlak veya yuvarlağımsı olup, 10 – 200 µm çapında olabilmektedir. Büyüklükleri değişik olan bu kistler içinde birkaç adet veya bazen 10,000 adet bradizoit bulunabilmektedir. Frenkel, doku kistleri içinde yavaş hareket eden bu organizmalara (brady = yavaş = Yunanca) bradizoit adını vermiştir. Bu yavaş hareketin nedeni metabolik işlevlerinin yavaş olmasıdır. Bradizoitlere aynı zamanda sistozoit de denilmektedir¹³.

Bradizoitler çoğalma şekilleri ve yapı olarak takizoitlere benzerler. Ancak onlardan farklılığı nükleuslarının arka uca daha yakın olması ve glikojen taneciklerini takizoitlere göre daha çok bulundurmasıdır. Kist duvarı pepsin ve tripsin ile parçalandığında serbest kalan parazitlerin

pepsin-HCL karışımı içinde 2 saat, tripsin içinde 6 saat canlı kalabildikleri, böylece normal sindirim periyodunda midede ve hatta daha uzun süre de duodenumda canlılıklarını yitirmedikleri bildirilmektedir. Ancak 61 °C nin üstünde 4 dakikada, ışınlama ile (25 rad'dan daha fazla) veya -20 °C de 18–24 saatte dondurularak öldüğü, 4 °C de ise 2 ay kadar canlılığını koruduğu tespit edilmiştir^{18, 20}.

Ookist:

Kesin konak olan kedilerin, vaşakların ve bazı kedigillerin dışkıyla çıkartılan ookistler oval, 11–14 µm büyüklüğünde olup, iki tabakalı bir duvarla çevrilidir.

Enfektan olabilmesi için ookistin olgunlaşması (sporulasyonu) gerekmektedir. Sporulasyon +4 °C de 2–3 günde, +15 °C de 5–8 günde oluşmaktadır. Ookistlerin oda ısısında aylarca canlı kalabildiği, 4 °C de canlılığını bir yıldan fazla sürdürebildiği, 65 °C de ise öldüğü saptanmıştır^{1, 18, 20}.

Toxoplasma gondii hücre içi bir parazittir. Bu nedenle yapay besiyerlerinde üretilemez. Bu amaçla embriyonlu tavuk yumurtası, doku kültürleri ve deney hayvanlarında üretilmektedir. Uygun deney hayvanı beyaz fare ve tavşandır¹⁸.

2.5. Evrim:

2.5.1. Son konak:

Toxoplasma gondii enfeksiyonu en popüler insan zoonozlarının biridir. *Toxoplasma gondii*'nin son konağı olan kedi ve kedigiller, ara konak olan parazitli küçük kemirgenleri, parazitli etleri yiyerek doku kistleriyle enfekte olurlar ve bu şekilde mide ve ince bağırsakta bradizoitler serbestleşir. Son konakta, aseksüel çoğalma döneminin sonu seksüel dönemin başlangıcına işaretler. Bu hayvanların ince bağırsak epitel hücrelerinde önce şizogoni (aseksüel çoğalma) ve daha sonra sporogoni ile seksüel çoğalmalarını sürdürürler. Daha sonra enfekte epitelyum hücreleri parçalanır ve sporsuz ookistleri içeren salgıları intestinal kanala dökülür ve bu şekilde milyonlarca olgunlaşmamış ookist enfekte hayvan dışkı ile dış ortama salınır. Diğer koksidiyalardan farklı olarak *T.gondii* ookistleri son konağı olan kedilerde, fare, domuz ve insan gibi ara konaklarına göre daha az enfektif ve patojendir. Bir kedi 10 ookist ile enfekte olmazken fare veya domuz bir ookistle enfekte olmaktadır. Ookistler dış ortamda, uygun ısı, nem ve oksijen varlığında 1–5 günde olgunlaşırlar ve içinde iki sporokist, bunların içinde de dörder tane sporozoit oluşur. Bu durumdaki ookist olgundur ve gerek insan, gerekse diğer ara konaklar için bulaşıcıdır^{1, 22, 23}. Kedilerin ookist çıkarması birinci haftanın sonundan üçüncü haftaya kadar devam eder ve her gram dışkı milyonlarca ookist içerir²⁴. Sporlanan *T.gondii* ookistleri, suda 4 °C de en az 45 ay, toprakta ise 18 ay infektifitelerini devam ettirebilirler^{25, 26}.

Prepatent süre (enfeksiyon başlangıcından sonra ookist saçma süresi) ve ookist saçma sıklığı, oral alınan *T.gondii*'nin evresine göre değişir. Kedigiller bradizoitlerin alınmasında 3-10 gün sonra, sporlaşmış ookist alınmasından yaklaşık 18 gün veya daha sonra, takizoit alınmasından yaklaşık 13 gün veya daha sonra *T. gondii* ookistlerini dışkıları ile çıkarmaya başlarlar²⁷⁻²⁹. Kedilerin çoğunluğu doku kisti aldıktan sonra ookist saçarken %30'u takizoit veya ookistleri aldıktan sonra ookist saçmaktadır^{27, 29}. Yapılan deneylerde, infekte kedilerin doku kistleri ile reinokülasyon ardından ookist çıkardıkları bildirilmektedir³⁰.

2.5.2. Ara konak:

Toxoplasma gondii'nin aseksüel evresi olan takizoit ve bradizoitler hem insan hem de hayvanlarda hastalık oluşturabilirler. Birinci aseksüel form olan takizoitler, makrofajlar dahil tüm hücreleri enfekte edebilir ve bu hücrelerde hızlıca çoğalarak ölümlerine neden olurlar. İkinci aseksüel form ise bradizoitler olup, farklı dokularda yavaşca çoğalırlar ve kistler oluştururlar. Takizoitin replikasyonu akut hastalığa neden olurken, bradizoitler kist içinde uzun süre, yavaşca yaşamını sürdüren ve latent enfeksiyondan sorumlu olan formdur. Kistler nedeniyle dokuda bir inflamasyon ortaya çıkmaz ve hücre görevini çok fazla etkilemez ancak, bu kistlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan bradizoitler takizoitlere dönüşüp nekroz ve inflamasyona neden olurlar. Bu şekilde bradizoitler kronik enfeksiyonlarda kistlerin oluşmasından sorumludur^{1, 15, 23, 31,32}.

Bradizoitlerin, ookistlerle enfeksiyondan sonra en erken 6-7 günde oluştukları bildirilmiřtir²².

Doku kistleri sinir ve kas dokularına yüksek afinite gösterirler ve predominant olarak santral sinir sisteminde bulunurlar. Ayrıca konağın göz, iskelet ve kardiyak kaslarında, daha az oranda akciğەرler, karaciğەرler ve böbreklerde bulunurlar^{22, 23}. Doku kistleri ara konakta yaşam döngüsünün son aşamasıdır ve enfeksiyzdirler. Bazı ara konak türlerinde ömür boyu kalırlar, ancak bu devamlılığın mekanizması bilinmemektedir. Bazı araştırıcılara göre, konakta doku kistleri periyodik olarak parçalanırlar. Açığa çıkan bradizoitler takizoitlere dönüşüp yeni konak hücrelerine girerler ve tekrar bradizoitlere dönüşerek yeni doku kistlerini oluřtururlar³³. Bu yüzden bu doku kistlerinin hem diagnostik, hem de immün sistemi baskılanmış kişilerde parazit kaynağı olarak önemi vardır¹⁵.

2.6. Epidemiyolojisi ve Bulaşması:

Toxoplasma gondii, insan dahil, hemen hemen bütün memelileri ve bütün kuşları enfekte edebilir. İnsandan ve hayvanlardan izole edilen suşlar arasında morfolojik veya antijenik bir fark bulunmamıştır. Enfeksiyon çok defa belirtisiz seyreder bu nedenle klinik belirti veren hasta sayısının az olmasına karşılık, kanlarında antikor bulunanların oranı çok yksektir¹⁹. Amerika Birleşik Devletlerinin farklı

bölgelerinde yapılan serolojik incelemeler sonucu insanların %5-50'sinin serum örneklerinde antikor bulunmuştur¹⁵. Sıcak nemli yerlerde kuru yerlere oranla daha yüksek olarak bulunduğu bildirilmektedir²⁰.

Toksoplazmozun birçok bölgede yaygın olmasının nedeni *T.gondii*'nin çeşitli türleri, etobur ve kuşlar gibi ot yiyen hayvanları da enfekte edebilme yeteneğine bağlıdır³². Bilindiği gibi enfeksiyonun insan ve hayvanlara bulaşmasında kedigiller ailesinden ev kedilerinin rolü çok fazladır. Her ne kadar kedilerin dışkılarını örtme adetleri varsa da, ookistlerin dış ortama dayanıklı olması nedeniyle enfeksiyonun yayılması önlenememektedir. Ayrıca hamam böcekleri, karasinek gibi eklembacaklılar da, kedi dışkısında bulunan ookistlerin çevreye yayılmasını sağlamaktadır¹.

İnsan toksoplazmozunu için kaynaklar şunlardır:

1. Dışkıları ile ookist atan kediler:

İnsan enfekte kedilerin dışkısında bulunan ookistleri ağız yolu ile raslantısal olarak alabilir. Ayrıca dışkıyla kontamine bahçelerde çalışmak, özellikle yüzeyi dışkı ile kontamine olan sebzelerle temas riskli olmaktadır^{3, 34 -37}. Ayrıca, hamam böcekleri, karasinek gibi eklembacaklılar da, kedi dışkısında bulunan ookistlerin çevreye yayılmasını sağlarlar¹.

2. Parazitin takizoit ve bradizoitlerini içeren etler:

Tüm et yiyen hayvanlar (yırtıcı kuşlar ve insan dahil) *T.gondii* kistleri içeren dokuları yiyerek enfekte olurlar. Bu enfeksiyon yolu insana bulaşmada önemlidir. İyi pişmemiş veya çiğ domuz, kuzu, geyik, keçi ve daha azda tavuk, tavşan ve at gibi hayvanların etinde *T.gondii* içeren doku kistleri bulunabilir ve insan için enfeksiyon kaynağı olabilirler^{9,33}.

Doku kistlerinin 58 °C de 10 dakikada veya 0 °C nin altında 7 günde canlılıklarını kayb ettikleri, 20°C de ve % 3,3 NaCl içeren solusyonda 3 gün canlı kalabildikleri bildirilmiştir^{38, 39, 40}.

3. Vücudunda paraziti barındıran anne:

Konjenital bulaşma denilen bu tip bulaşmada parazitin takizoitleri, enfekte anneden fetüse plasenta yoluyla geçmektedir. Bazı kaynaklarda enfekte annenin takizoitleri süt yolu ile de bulaştırdığı gösterilmiştir^{1, 33, 35}. Gebe kadınlar için pişmemiş kuzu, sığır, av hayvanlarının etlerini yemek, toprakla temas akut enfeksiyon için önemli risk faktörleridir. Değişik merkezlerin verilerine göre enfeksiyonun % 30-63'ü iyi pişmemiş veya tuzlanmış et ürünleri ile, % 6-17'si ise toprakla temas sonucu görülmektedir^{33, 41}.

4. Toksoplazmozlu kişiden nakledilen kan ve doku:

Seropozitif vericiden seronegatif alıcıya kalp, kalp-akciğer, böbrek, karaciğer ve karaciğer-pankreas nakli yapılması önemli bir enfeksiyon kaynağıdır. Kemik iliği, 'hematopoietic stem cell' (kök hücreler), karaciğer nakli yapılmış hastalarda ve AIDS'lilerde (vericinin negatif alıcının pozitif veya hem verici, hem de alıcının seropozitif olması durumu) latent enfeksiyon alevlenerek toksoplazmozis ortaya çıkmaktadır⁴².

Bu bulaşma yollarına göre, insan toksoplazmoza yaşamının iki döneminde yakalanabilir; 1. Doğumdan önce (konjenital), 2. Doğumdan sonra (edinsel = doğmalık = post natal)¹.

Toxoplasma gondii ve toksoplazmoz, yurdumuzun hemen her yöresinde, her yaş ve her sosyo-ekonomik grupta, kadın ve erkeklerde ve besi hayvanlarımızda yaygındır. Özellikle kadınlarda görülme oranı yaşla doğru orantılı olarak artmaktadır. Bunun da nedeni kadınların, hem kedi dışkılarıyla, hem de bulaşlı etlerle temas etme olasılıklarının yüksek olmasıdır. Toplumda hemen her sosyo-ekonomik ve eğitim düzeyindeki kişilerin çiğ köfte, bat gibi yiyeceklere düşkünlüğü de zaten bu yüksek oranı açıklamaktadır. Toplumlarda toksoplazmozun yaygınlığı %7 ile %94 arasında değişmektedir; hatta bazı ileri yaş gruplarında %100'e bile

ulaşmaktadır. Genelde yaş ilerledikçe seropozitiflik ve hücresel bağışıklık oranı yükselmektedir¹.

2.7. Patogenez, Klinik Belirtiler ve İmmunité:

2.7.1. Patogenez:

Toksoplazmoz konjenital veya sonradan kazanılmış olabilir. Organizmaya giren *T.gondii* her tip hücreyi enfekte edebilir ve hücre içinde çoğalır¹⁹.

İnsanda ve hayvan modelinde toksoplazmoz enfeksiyonunun seyrini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır, bunlardan; alınan doz, organizmanın virulansı, genetik durum, cinsiyet, yaş ve kişinin bağışıklık durumu en önemlilerindendir. Ayrıca stresle ilişkili olan hastalıklar ve bağışıklığın baskılanması gibi durumlar konağın *T.gondii*'ye karşı duyarlılığını artırabilir^{20, 43, 44}. Kuluçka dönemi 1–3 hafta kadardır²¹. Enfeksiyonun primer olarak ağız yolu ile girip enfeksiyonun ilerlemesi ile gastrointestinal sistemden lokal lenf organlarına ve sonrada diğer organlara yayıldığı farelerde kanıtlanmış olmakla birlikte insanda bu basamakların tümü gösterilememiştir². Fareler tarafından alınan bradizoitler ilk olarak ince bağırsak epitelyum hücrelerine lokal invazyon yaparlar. Takizoitler birçok hücreyi aktif olarak invaze etme yeteneğine sahiptirler ve parazitoform vaküollerde replike olabilirler. Bu vaküoller içinde parazit proteinleri salgılanır, bu protein normalde konak hücreleri

tarafından salgılanan ve fagozom maturasyonundan sorumlu olan proteinlerin salgılanmasını engeller, bu şekilde lizozom füzyonunu engellemiş olurlar²⁰.

İn vivo olarak bradizoitler hızlıca takizoitlere dönüşürler. İn vitro ise bradizoit kistlerinin oluşması için farklı yöntemlerle enfekte hücrelere stres uygulanabilir ki bunlar pH ve ısı değişikliği veya değişik mitokondriyal zehirler olabilir².

Enfeksiyonun lokal başlangıç bölgesinden yayılmasında lamina propria'da bulunan monositlerin enfeksiyonu anahtar rol oynar. Hem insan hem de farelerde bu hücreler *T.gondii* replikasyonunu sağlayarak parazitin çok farklı dokulara yayılmasından sorumludurlar. Takizoitler akut enfeksiyonda, başta kalp kaslarında olmak üzere, karaciğer, dalak, lenf düğümleri ve merkezi sinir sisteminde bulunurlar. İlk patolojik lezyon parazitli hücrelerin ölümüne bağlı olarak gelişen nekrozla birlikte ciddi akut iltihabi reaksiyondur. Hastalığın seyri esnasında çok sayıda lenfosit infiltrasyonu görülür fakat gerçek granülom oluşmaz. Eğer konak takizoitlerin replikasyonunu etkili olarak kontrol edebilirse dokular skar bırakmadan yenilenir ve kistleri içeren uzun ömürlü bradizoitler asemptomatik olarak kalırlar².

2.7.2. Klinik belirtiler:

Toxoplasma gondii fırsatçı bir patojendir, kişilerin ona karşı direnci farklıdır. İnsanın en duyarlı olduğu yaş fetüs dönemidir. Bu dönemdeki bulaşma çoğunlukla ölümle sonuçlanır. Daha ileri yaşlarda veya erişkinlerde enfeksiyon sessiz seyredebileceği gibi, olguların %10'nun kendiliğinden iyileştiği bildirilmiştir. Konjenital, transplasental enfeksiyonlarda veya bağışıklığı baskılanmış hastalarda enfeksiyon çok ağır seyreder³.

Tablo 1: Ciddi toksoplazmoz riski olan kişiler³

Gebelik sırasında veya gebelikten birkaç ay önce toksoplazmoza ilk defa yakalanan annelerden doğan çocuklar	Gebelikten 6 aydan önce <i>T.gondii</i> ile ilk defa karşılaşan anneler enfeksiyonu çocuklara genellikle geçirmezler
İmmün sistemi çok zayıf olan kişiler	Enfeksiyon ömür boyu herhangi bir zamanda reaktif olabilir

Doğumdan sonra (edinsel) toksoplazmoz:

Çocuk ve yetişkinlerde (hamile kadınlar dahil) *T.gondii*'nin oluşturduğu primer enfeksiyon hastaların % 90'ında asemptomatik seyreder. Olguların %10'u kendinden iyileşir ve spesifik olmayan hastalık oluşturur, nadiren tedavi gerektirir. Toksoplazmozun genel olarak tipik belirtileri servikal veya oksipital lenfadenopati (4–6 hafta kadar büyük kalır), lenf düğümlerinin sertleşmesidir. Bazı durumlarda da kronik

lenfadenopatinin aylarca devam ettiği bildirilmiştir. Daha az sıklıkla miyokardit, polimiyosit, pnömonit, hepatit veya ensefalit gelişebilir. Genellikle hamile kadınlarda oluşan akut toksoplazmoz enfeksiyonu asemptomatik seyir gösterir^{20, 42}.

Konjenital toksoplazmoz:

Konjenital toksoplazmoz düşüğe, ölü doğuma, erken doğuma yol açabilir veya çocuk hasta olarak doğar ve hastalık belirtileri doğumdan hemen veya birkaç hafta sonra fark edilir. Annedeki enfeksiyon gebeliğin ne kadar erken döneminde olursa çocuğun enfekte olması ve bu enfeksiyonun ağır seyretmesi olasılığı o kadar artar. Başlıca belirtiler koryoretinit, serebral kalsifikasyon, hidrosefali veya mikrosefali, mikroftalmi, konvülsiyon, avuç içi ve ayak tabanları dışında papüler veya purpurik döküntüler, sarılık, hepatomegali ve splenomegalidir. Sonradan kazanılmış toksoplazmoz akut, subakut veya belirtisiz seyredebilir. Kuluçka devri bilinmemektedir. Laboratuvar incelemeleri, erişkinlerde enfeksiyonun düşünüldüğünden çok fazla olduğunu, fakat çok büyük kısmının asemptomatik olduğunu göstermiştir. Sonradan kazanılmış toksoplazmoz klinik belirtilere göre lenfatik, serebral ve döküntülü toksoplazmoz olarak da sınıflandırmak mümkündür¹⁹.

Konjenital toksoplazmoz düşük, yeni doğan ölümü veya fetüs anomalisine neden olup, körlük ve zeka geriliğine neden olur. Her 10,000

düşük olgusunun 1-10'nun sebebi konjenital toksoplazmoz olarak bildirilmiştir²⁰. Fetüse *T.gondii*'nin neden olduğu enfeksiyonun etkisi, enfeksiyonun alındığı gebelik dönemine göre değişir^{33, 45}.

Konjenital toksoplazmoz enfeksiyonunda, gebelikte annenin tedavi verilmesinin, enfeksiyonun sıklığını ve şiddetini etkilemediği, ancak spiramisinin vertikal bulaşı %60'a kadar indirdiği belirtilmiştir²⁰.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada konjenital toksoplazmozun oluşturduğu mali yükün yılda 7,7 milyar \$ olduğu bildirilmiştir⁴⁶.

Oküler toksoplazmoz:

Toksoplazmik korioretinit, konjenital olarak veya doğum sonrası (akut enfeksiyon veya reaktivasyon sonucu) ortaya çıkabilir. Toksoplazmik korioretinit kişinin akut enfeksiyon geçirmesi veya akut enfeksiyonun salgını sonucunda gelişebilir. Erişkinlerde, korioretinit olgularının büyük çoğunluğu konjenital enfeksiyonun ileri yaşlarda ortaya çıkması veya reaktivasyonu sonucu görülmekte, ancak enfeksiyonun reaktivasyon mu yoksa akut enfeksiyon sonucunda mı oluştuğunu belirlemek zor olmaktadır⁴². Semptomatik bulgular hayatın ikinci ve üçüncü on yıllık döneminde en yüksek insidansa olup klinik olarak 40 yaşın üzerinde görülür. Karakteristik lezyon fokal nekrotizan retinittir. Fundusta

sarımsı beyaz kümeler belirlenir. Kümelerdeki lezyonlar çeşitli yaşlardadır. İyileşme ile lezyonlar solar, atrofiye uğrar ve siyah pigmentler gelişir. Panüveit, korioretinite eşlik eder. Papillit, genellikle belirgin santral sinir sistemi hastalıkları ile birlikte dir. Edinsel toksoplazmik korioretinit unilateral, konjenital toksoplazmik korioretinit ise bilateral dir. Akut korioretinitte ağrı, fotofobi, göz yaşarması görülür. Makulanın enfeksiyona uğraması ile santral görme kaybı gelişir. İnflamasyonun kaybolması ile görme düzelir. Göz dibi incelemesinde bilateral makuler enfeksiyon, korioretinal dejenerasyon, çabuk gelişen optik sinir atrofisi, vitreus ve humor aköz sıvılarının berraklığı gözlenir. Spesifik tedaviden sonra bile hastaların %13-30'unda korioretinit tekrarlayabilmektedir^{20, 42}.

HIV ve immün sistemi baskılanmış kişilerde toksoplazmoz:

Bu tabloda, hemen hemen tüm olgular kronik toksoplazmoz enfeksiyonunun reaktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Santral sinir sistemi tipik olarak toksoplazmoz enfeksiyonundan etkilenmektedir⁴².

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)'li hastalarda akut toksoplazmoz en sık beyinde toksoplazmik ensefalite, akciğerde pnömoniye ve gözde korioretinite neden olur. Çeşitli organların tutulması sonucu miyokardit, fokal pnömoni, hepatik nekrozun oluşabildiği toksoplazmozda, akut solunum yetmezliği ile beraber hemodinamik

bozukluklar da bildirilmiştir. Toksoplazmoz saptanan AIDS hastalarının %70'inde 1 yıl içinde ölüm görülmüştür²⁰.

AIDS'lilerde görülen oküler toksoplazmoz, latent enfeksiyonun reaktivasyonu şeklinde ortaya çıkmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış AIDS'li olmayan olgularda konjenital enfeksiyona bağlı gelişen korioretinitte aktif lezyonlar eski skarlara yakın iken, AIDS'lilerde eski lezyonla ilgisi olmayan, daha geniş ve multiple lezyonlar görülmektedir. Lezyonların bu karakteri korioretinitin lokal reaktivasyonundan çok hematogen yayılmaya sekonder geliştiğini düşündürmektedir²⁰.

2.7.3. İmmünoloji:

Toksoplazmoza karşı kişilerde iki temel bağışıklık söz konusudur; doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık. Bunlardan birincisinde kişi, *T.gondii* veya ürünleri ile hiç karşılaşmadan, parazitin vücudunda yerleşmesine karşı belli bir direnç gösterir. İkincisinde ise parazitin kendisi veya ürünleri ile yaşamının bir döneminde karşılaşmıştır, bu karşılaşma sonucunda da vücudunda parazite karşı bir takım savunma mekanizmaları gelişmiştir¹.

Doğal Direnç:

Bu tip dirençte yaş faktörü önemlidir. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonuna karşı fetüs son derece duyarlı ve dirençsiz iken, ileri yaşlardaki çocuk ve erişkinler doğal dirence sahiptirler. Buna bağlı olarak da parazit ya vücutta yerleşemez veya yerleşse bile sessiz bir enfeksiyon oluşturur ya da kendiliğinden iyileşme görülür. İki yaşın üzerindeki olguların serumlarında fonksiyonu tam olarak bilinmeyen ısıya dayanıklı bir faktör olduğu fakat altı aydan küçük çocukların serumunda bu faktörün olmadığı tespit edilmiştir. Yardımcı faktör diye bilinen bu ürün Sabin-Feldman boya testi ile indirek immün floresan antikor testinin yapılması için gereklidir. Toksoplazmozda özgül olmayan hücresel bağışıklık mekanizmasının koruyuculuğu önem taşımaktadır. Bu bağışıklık mekanizması bozulmuş olanlarda ve bağışıklığı baskılayan ilaç alanlarda *T.gondii*'nin kolayca yerleştiği, hatta ölümlere neden olduğu görülmüştür¹.

Furuta ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, ince bağırsakta bulunan TLR2 ve TLR4 reseptörlerinin (toll-like receptor) *T.gondii* enfeksiyonuna karşı doğal savunmada koruyucu rolünün olduğu bildirilmiştir⁴⁷.

Kazanılmış bağışıklık:

Enfeksiyonun kontrolünde antikorun rolü hücresel immüitenin sekonder etkisi olarak görülür. Doğal ve kazanılmış bağışıklık

arasındaki denge toksoplazmoz immünpatogenezinde proinflamatuvar ve düzenleyici cevabı sağlar².

Hücre sel cevap: *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu IL-12, INF γ ve TNF α içeren proinflamatuvar sitokinlerin oluşumuyla karakterize olan, kuvvetli ve devamlı Th1 cevabı oluşturur. Bu sitokinler diğer bağışıklık mekanizmalarıyla birlikte takizoitlerin süratle replikasyonunu ve bunu takiben gelişen patolojik değişikliklerden konağı korumaktadırlar. Eritrositlerin invazyonundan sonra *T.gondii* intestinal lamina propria'daki antijen sunucu hücreleri enfekte eder ve geçici lokal Th1 cevabını indükler. Deneysel hayvan çalışmalarında intra epitelyal CD8+ lenfositlerin uzun süreli koruma sağladığı gösterilmiştir. Dendritik hücreler *T.gondii*'nin tekrarlamasına karşı bağışıklık cevapta önemli rol oynayabilirler. IL-12 salgılayan dendritik hücreler Th1 bağışıklık cevabının başlıca aktivatörüdür. Granülositler de IL-12'nin erken oluşumuna yardımcıdır. Aktive makrofajlar, hücre içi *T.gondii*'yi inhibe eder veya öldürürler. Bununla beraber parazit enfeksiyonunun erken dönemlerinde bu etkiye kısmen karşı koyabilir. Duyarlaştırılmış CD4+ ve CD8+ T lenfositler, *T.gondii* ile enfekte hücrelere sitotoksik etki yaparlar. Proinflamatuvar (INF γ ve TNF α) ve anti-inflamatuvar (IL-10, Transforming growth factor- β) sitokinler bu cevabın dengelenmesinde rol oynarlar. Akut enfeksiyon esnasında $\gamma\delta$ T hücrelerinin oranı artmaktadır. Sağlıklı kişilerde etkili ve dengeli bağışıklık cevabı enfeksiyonu kontrol etmektedir. Olguların

çoğunda organ zararı az olmakla birlikte enfeksiyon eradike edilemez. Bradizoit kistler çok az bağışıklık cevabı oluştururlar ve konakta hayat boyu kalabilirler. Konak bağışıklık fonksiyonunun değişmesi takizoitlerin replikasyonunu reaktifte edebilir. Bu durum hücresel bağışıklık mekanizması ile kontrol edilir. Eğer konak bu cevabı oluşturamazsa yaygın organ zararı ortaya çıkar^{2, 42}.

Antikor cevabı: Toksoplazmozda, bulaşmadan iki hafta sonra birçok *T.gondii* proteinlerine karşı oluşan IgG, IgM, IgA ve IgE antikorları saptanabilir⁴². *Toxoplasma gondii*'nin vücutta yerleşmesine bağlı olarak enfekte kişilerde antikor yapımı görülür¹⁸.

IgG: Bu tip antikorlar geç oluşur (1–2 ay içinde pik yapar), yavaş yükselir, sonra seviyesi yine yavaş yavaş düşer. Genellikle ömür boyu düşük bir seviyede (1/64 titre) pozitif olarak kalır^{1, 48}. Hamilelik öncesi herhangi bir titrede IgG pozitif olan kadınların toksoplazma enfeksiyonunu fetüse geçirmediği bildirilmiştir. Antikoru bulunmayan kadınlar ise enfeksiyon riski altında sayılırlar³.

IgM: Toksoplazmoz enfeksiyonunda ilk ortaya çıkan immunogloblin IgM'dir. Bu tip antikorlar 2–3 ayda en yüksek seviyesine ulaşır, sonra titresi düşmeye başlar. Bu nedenle, yeni başlamış enfeksiyonun saptanmasında tanısallık değeri vardır. Erken oluşup, erken kaybolan komplemanı bağlayan

antikorları saptayan kompleman birleşmesi deneyi bir diğer serolojik yöntemle birlikte yapılırsa tanısal değer taşır. İmmüsuprese hastalarda IgM antikorlarının saptanamaması nedeni ile IgA antikorlarının tanıda değer taşıdığı bilinmektedir¹⁸.

IgA: Klasik olarak, toksoplazmoz tanısı IgG ve IgM saptanmasına dayanırken, son zamanlarda özellikle konjenital ve akut toksoplazmoz tanısında IgA'ların son derece değerli olduğu bildirilmektedir³. IgA titresi parazite karşı birkaç ay hatta bir yıl kadar yüksek kalabilir. IgA'nın akut toksoplazmoz tanısında değeri az iken, fetüs ve yeni doğanlarda enfeksiyonun tanımlanmasında önemlidir. IgM negatif saptanan bazı konjenital toksoplazmozlu yenidoğanlarda IgG ve IgA antikorları pozitif olarak tespit edilmiştir⁴⁸.

IgE: Akut enfeksiyon geçiren yetişkinlerin, konjenital toksoplazmozlu yenidoğan ve konjenital toksoplazmik korioritenitli çocukların serumunda IgE antikor ELISA yöntemiyle saptandığı, IgM ve IgA'ya göre daha hızlı kaybolduğu bildirilmiştir. Son zamanda IgE'nin kazanılmış toksoplazmoz tanısında değerli olduğu belirtilmektedir⁴⁸.

2.8. Tanı:

Toksoplazmozda klinik belirtiler, özellikle doğumdan sonraki bulaşmalarda çok tipik değildir. Konjenital bulaşmada doğumda görülen

koryoretinit, serebral kalsifikasyonlar, hidrosefali veya mikrosefali bu parazitoza işaret edebilir. Kesin tanı laboratuvar bulgularına göre konur. Laboratuvarıda toksoplazmozun tanısında aşağıdaki yöntemlerden bir veya birkaçı birden kullanılır, bu seçim laboratuvar koşullarına bağlıdır¹.

Toksoplazmozun tanısında, etkenin izolasyonu, moleküler yöntemler, histopatolojik inceleme, deney hayvanları ve deri testi gibi tanı yöntemleri kullanılmaktadır³.

2.8.1. Direkt =doğrudan tanı yöntemleri:

Etkenin izolasyonu: Parazitin çeşitli evrim dönemlerinden her hangi birinin, beyin omurilik sıvısı (BOS), lenf bezi, deri lezyonlarından alınan materyal, kemik iliği veya otopsi materyali gibi örneklerde görülmesiyle tanı konur. Alınan örnek ya direkt olarak lam- lamel arasında mikroskopta incelenir veya bu örnekten yayma preparatlar hazırlanır, boyanır ve bu preparatlar değerlendirilir¹.

BOS örneğinde boya ile ve / veya BOS'un doku kültüründe pozitif takizoitler bulunması, akut akciğer hastalarında, bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısından Giemsa boyası ile etkenin gösterilmesi tanıda çok önemlidir. Yapılan çalışmalara göre bazen hücre dışında bazen de pnömositlerin içinde yer aldıkları gösterilmiştir^{3, 48}.

Deney hayvanları: *Toxoplasma gondii*'nin izole edilmesi için tercih edilen yol klinik örneklerin birkaç fare, kobay veya hamster'in beyin içine veya peritonu içine zerk edilmesidir. Deney hayvanları burun yolundan veya örnek yedirilerek de enfekte edilebilir. En çok fare kullanılır, fakat mümkün olduğunda diğer deney hayvanlarına da zerk edilmelidir. Hayvana vermeden önce latent bir toksoplazmoz bulunup bulunmadığı araştırılmalıdır ¹⁹. Vücut sıvı örneklerinin fareye inokülasyonu ile fare periton sıvısı 3–4 gün içinde incelenip toksoplazmalar izole edilebilir. Fareler 6 hafta yaşarlarsa toksoplazma antikorları, ölürlerse beyinde ve periton eksudasında *T.gondii* aranır. Ölen enfekte farelerin beyin süspansiyonu veya 6 hafta yaşayan seropozitif farelerin karaciğer, dalak ve beyin süspansiyonu yeni deney hayvanlarına zerk edilir. Pasaj hemen yapılmayacaksa 4 °C de bir gece saklanabilir^{19, 20}.

Fare inokülasyonu, *T.gondii*'nin doku ve vücut sıvılarından izolasyonunda duyarlı bir yöntem olmasına rağmen, bazı fare çalışmaları toksoplazmaya duyarlılıkları ve enfeksiyonun dönemini etkileyebilen bazı faktörler vardır ki bunlar; enfeksiyonun oluşturma şekli ve verilen dozdur. Ayrıca toksoplazma suşlarının virulanslarındaki farklılıkları nedeniyle bazıları farelerde zayıf hastalık oluşturlar⁴⁹.

Histopatoloji: Vücut sıvılarından yapılan preparatlardan veya doku kesitlerinde takizoitlerin görülmesi akut toksoplazmoz için iyi bir

yöntem olup, inflamatuvar nekrotik lezyonun çevresinde çoklu kistler görülmesi tanı koydurucudur. AIDS'li hastalarda toksoplazmik ensefalitte yapılan biopsilerde sadece %5 olguda toksoplazmoza özgül histolojik yapı saptanmıştır. Özellikle duyarlı ve özgül bir test olan peroksidaz-antiperoksidaz tekniği, AIDS'li, santral sinir sistemi hastalarında etkeni göstermek açısından başarılıdır. Hızlı elektron mikroskobu toksoplazmik ensefalitin tanısını yapabilir. Wright ve Giemsa boyama yöntemleri ile boyanan BOS sedimenti, beyin aspirasyon materyali veya biopsi yaymaları ile de hızlı tanı sağlanabilir²⁰.

Moleküler yöntemler (Polimeraz zincir reaksiyonu -PZR):

Patojen mikroorganizmaların kültürü zor olduğunda veya klinik örneğin miktarı az olduğu zaman dokularda mikroorganizmaların DNA'sını saptamak son derece değerlidir⁵⁰⁻⁵³. Serolojik yöntemler konak cevabını araştırırken, biyolojik örneklerde moleküler yöntem olan PZR *T.gondii*'nin genetik materyalinin direk olarak saptanmasını sağlar ve organizmanın var olduğunu kanıtlar^{13, 51}.

Serolojik tanı yöntemleri ile doğum öncesinde ve immün sistemi baskılanmış hastalarda toksoplazmoz tanısını koymak zordur. Bu gibi durumlarda moleküler tanı yöntemleri önem taşımaktadır ve bu tür hastalarda hastanın immünolojik durumundan bağımsız olarak tanı koyulabilir. Ayrıca immünolojik durumun toksoplazmozun gelişmesinde

önemli rolü olmasına rağmen bazı çalışmalarda *T.gondii*'nin virülansı ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir¹³.

Konjenital, göz, serebral ve dissemine (yaygın) toksoplazmoz tanısında PZR yöntemiyle *T.gondii* DNA'sının, vücut sıvılarında ve dokularında başarıyla saptandığı belirtilmiştir^{20, 48, 54 - 62}.

PZR yönteminin duyarlılığı, klinik örneğin alınması, taşınması ve saklama koşulları, geçmişte anti-*T.gondii* ilaç kullanımı gibi faktörlerle ilişkilidir. Eğer bir kontaminasyon söz konusu değilse PZR yönteminin özgüllüğü ve pozitif prediktif değeri %100 olarak bildirilmektedir⁴².

PZR yöntemi, gebelerde konjenital toksoplazmozun tanısının invaziv işlemlere başvurmada ve fetüse zarar vermeden yapılmasını sağlar. Konjenital hastalık ihtimali olan tüm yeni doğanların kan, BOS ve idrar örnekleri PZR yöntemiyle incelenmelidir. Tipik olmayan retinal lezyonlu hastalarda, anti-toksoplazmoz tedaviye cevap vermeyen veya immün yetmezlikli olgularda vitröz veya aköz sıvı örnekleri alınarak tanı konulabilir. Toksoplazmoz ihtimali olan tüm immün yetmezlikli hastaların kan, vücut sıvıları (BAL, BOS, plevral, periton veya göz sıvıları), kemik iliği aspiratı veya dokularının PZR yöntemiyle incelenmesi tanıya yardımcı olur⁴².

1.8.2. İndirek = dolaylı tanı yöntemleri:

Serolojik tanı

Toxoplasma gondii'nin tanısı için, serolojik tanı yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmakta olup, farklı konaklarda *T.gondii* tanımlanması için birçok serolojik test geliştirilmiştir. İnsanlarda toksoplazma antikorları yüksek seviyede ($\geq 1/512$ IFA) yıllarca kalabilmektedir²⁰.

Toksoplazmozun serolojik tanısının yapılabilmesi ve anlaşılabilmesi için enfeksiyon süresince antikor cevapları bilinmesi gerekmektedir. Akut ve konjenital toksoplazmoz enfeksiyonunda, IgA ve IgM incelenmesi gereken ilk antikorlardır. Normalde IgA ve IgM plasenta bariyerini geçme yeteneğine sahip değildirler ve bu antikorlar konjenital enfeksiyonun göstergesidirler. IgA ve IgM ilk haftalarda yükselmeye başlar ve bu pozitiflik bir yıl veya daha fazla devam edebilir. Bazen postenfeksiyon sürecinde (5–6 haftada) IgA ve IgM titreleri tanımlanamayacak kadar düşer, bazen de enfeksiyonu belirleyici olarak 3–4 ay devam eden yüksek titrede saptanır³.

1. Sabin Feldman Dye Testi (DT):

Sabin ve Feldman tarafından 1948 yılında geliştirilen ve toksoplazmoz enfeksiyonunun farklı popülasyonlarda yüksek yaygınlığını ortaya çıkaran serolojik bir testtir². Dye testi toksoplazmaya özgün

antikorların ölçülmesinde referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Testin prensibi komplemana bağlı nötralizan antijen-antikor reaksiyonudur. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) bu testi IgG referans serumlarını IÜ/ml olarak titre etmekte kullanmaktadır. İncelenen antikor, trofozoitlerin proliferasyon fazında oluşan IgG olup, parazitin membranı ile reaksiyona girer⁶³.

Sabin Feldman testinin temeli aktivatör olarak isimlendirilen bir maddenin ortamdaki varlığında antikorla muamele edilmiş *T.gondii*'nin metilen mavisi ile boyanma özelliğini kaybetmesine dayanır. Bu testte kullanılan antijenler canlı takizoitler olup, enfekte farelerin periton sıvısından elde edilir. Sabin Feldman testi çok duyarlı olmakla beraber uygulamasında çok deneyim gerektirmesi ve canlı *T.gondii* sağlanmasının güç olması nedeniyle günümüzde yerini başka testlere bırakmıştır²¹.

2. İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT IgM ve IgG) :

İlk defa 1963 yılında toksoplazmoz tanısında kullanılmıştır. Bu test Dye testi ile aynı antikoru (IgG) ölçmektedir, titreleri Dye test titreleri ile paralellik göstermektedir. Daha kolay yapılması, daha emniyetli (çalışan açısından) ve ekonomik olması nedeniyle geniş kullanım alanı bulmaktadır.

İndirek Fluoresan Antikor Testi, IgG antikorlarına göre daha erken ortaya çıkıp daha hızlı düşen IgM antikorlarını da gösterir. Enfeksiyonun ilk haftasından itibaren hızla yükselir, sonra düşük titrelerle düşer ve birkaç ayda da kaybolur. Düşük titreler bazı hastalarda bir yıl veya daha uzun süre kalabilir. Test IgG veya IgM 'ye karşı hazırlanan fluoresans işaretli anti-serumla çalışır²⁰.

3. Aglütinasyon testi:

Bu test IgG antikorlarına çok hassastır. Doğal IgM antikorları serumda özgül olmayan aglutinasyona neden olmaktadır. Böyle durumda IFA ve Dye Test ile bu serumlar negatif sonuç vermektedir. Bu problem testin 2 mercaptoethanolle kaplanması sonucunda ortadan kaldırılır. Bu yöntem IgM antikorlarını ölçmek için kullanılmaz. Ucuz, doğru, basit ve gebeler için ideal bir yöntemdir²⁰.

4. İndirekt Hemaglütinasyon Testi (IHA):

Jacobs ve Luude 1957 yılında toksoplazmoz tanısında IHA yöntemi uygulamasını geliştirmişlerdir. Yüksek titre, veya aynı hastadan yaklaşık bir ay ara ile alınan iki serum örneğinde saptanan en az iki basamak titre yükselmesi aktif enfeksiyona işaret eder. Pozitifliği çoğunlukla düşük titrelerde yıllarca devam eder. Duyarlı bir deneydir. IHA, uygun kitler olduğu sürece, hemen her yerde uygulanabilen ve güvenilir sonuç veren bir testtir^{1, 63}.

5. Kompleman Birleşmesi Deneyi (KBD):

Aktif ve yeni enfeksiyonun saptanmasında yararlıdır. Fakat tek başına kullanılmaz, Dye testte yüksek titre gösteren hastalarda ve ilk toksoplazmoz görülen hastalarda kullanılır. KBD toksoplazmoz tanısında Dye testle saptanan antikorlardan birkaç hafta sonra oluşan antikorları ölçer ve onlardan daha erken düşer. KBD yıllarca olumlu kalabilir, olumlu olması enfeksiyonun akut olduğunu veya negatif olması da hastalığın olmadığını göstermez. Duyarlılığı az olup kronik toksoplazmozda negatiftir^{1, 20, 63}.

6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Son yıllarda parazitozların tanısında çok kullanılan bu yöntem toksoplazmozun tanısında da yararlıdır. Hazır kitler ve özel okuyucular kullanılarak yapılmaktadır¹. Toksoplazmoz tanısında serolojik yöntem olarak ELISA'nın tek başına kullanılmaması, Dye test, Aglutinasyon ve Immunosorbent Aglutinasyon Assay (ISAGA) gibi yöntemlerden en az üç tanesinin beraber uygulanması önerilmektedir⁶³.

IgG Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA-IgG) testi çok yaygın kullanılmakta olup duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak bildirilmiştir. Bazı çalışmalara göre ise bütün bu testlerle uyumsuz olduğu bildirilmektedir^{20, 63}.

IgA ELISA; özgül IgA antikorları akut enfekte erişkinlerde ve konjenital toksoplazmozlu yeni doğanda ELISA ve ISAGA yöntemleriyle serumda saptanmaktadır. Erişkin toksoplazmik korioretinitli hastalarda %86 IgA antikorları belirlenmiştir. Toksoplazmik ensefalitli AIDS hastalarının serumunda IgA antikorları ELISA yöntemiyle nadir olarak tespit edilebilmiştir^{20, 63}.

IgE ELISA; akut enfekte erişkinlerde, konjenital toksoplazmozlu yeni doğanda ve konjenital toksoplazmoz korioretinitli çocuklarda serumda ELISA ile IgE antikorları saptanabilir. AIDS'li toksoplazmik ensefalitli hastaların % 40'ında IgE antikorları gösterilmiştir^{20, 63}.

IgM capture ELISA, konjenital toksoplazmozdan ve akut enfeksiyondan şüphelenilen olgularda IgM-IFAT yöntemine göre çok daha hassas bir yöntem olarak önerilmektedir⁶³.

7. Double Sandwich IgM ELISA (DS-IgM-ELISA):

IgM ELISA ve IFA testlerine göre daha hassas ve özgül bir testtir. Romatoid faktör veya anti-nükleer antikorların (ANA) neden olduğu yalancı pozitiflik bu yöntemde görülmemektedir²⁰. Konjenital toksoplazmozda, doğum öncesi ve doğum sonrasında alınmış olan kandan elde edilen serumda çok spesifik ve hassas olan DS-IgM-ELISA

yöntemi ile IgM seviyesindeki yükseklik toksoplazmoz lehine değerlendirilmektedir⁶³.

8. *IgM Immunosorbent Agglütinasyon Assay (ISAGA-IgM):*

Formalinle fikse edilmiş organizmalar veya antijenle kaplı lateks partikülleri IgM antikorlarını yakalamak için kullanılır. Her ikisinde özgül ve duyarlıdır. Ortamda fazla miktarda *Toxoplasma* IgG varlığında görülen yalancı negatifliklerin veya ortamda romatoid faktör, ANA varlığında konvansiyonel ELISA ve IFAT'da görülen yalancı pozitifliklerin, ayrıca IgA ve IgE ile oluşan çapraz reaksiyonların engellenmesi amacıyla bu test geliştirilmiştir. IgM ELISA'da olduğu gibi enzime bağlı bir konjugat kullanılmaması ve agglütinasyon testlerinin uygulanılabilirliğinin basit olması bu testin avantajları olarak bildirilmektedir⁶³. Romatoid faktör veya ANA'nın varlığı yalancı pozitif sonuçlara neden olmaz. IgA ve IgE'yi saptamak için ISAGA tekniği ile benzer yöntemler uygulanmaktadır²⁰. ISAGA ile %80 hastada reaksiyonun enfeksiyonun başlangıcından itibaren 1 yıl kadar korunduğu gösterilmiş, immün sistemi sağlam kişilerde bu sürenin 24 aya kadar uzayabileceği bildirilmiştir⁶³.

9. *Avidite Testi:*

IgG avidite testi, özgül IgG'nin multivalan toksoplazma antijenine bağlanma gücünü temel almaktadır. Anti-*T.gondii* antikorlarının

avidite değerlerinin hamileliğin ilk üç ayında IgG ve IgM antikorları ile beraber belirlenmesinin eski ya da yeni enfeksiyon ayırımının yapılmasında etkili olduğu gösterilmiřtir⁶⁴. Antijen bağlayan avidite testleri *T.gondii*'ye bağlanan antikorun aviditesinden yola çıkılarak enfeksiyonun süresini saptamakta kullanılan yöntemlerdir. Enfeksiyonun erken dönemlerinde saptanan düşük aviditeli antikorların, enfeksiyonun ileri dönemlerinde yerlerini yüksek aviditeli antikora bıraktıklarından, antijenin bağlanma gücü, ELISA avidite testleri ile hesaplanmaya çalışılır. Bu test ELISA ve ISAGA IgM testleri pozitif olan hastalara, konjenital olarak enfekte bebeklere, reaktivasyon geçiren AIDS'lilere ve transplantasyon alıcılarına ait örneklerin incelenmesinde önerilir⁶³.

10. Deri Testi:

Toksoplazmoz tanısında kullanılan deri testine Toksoplasmin deri testi denir. Toksoplasmin, toksoplazmozlu olguların geç tip aşırı duyarlılığını saptayan bir cilt testidir. Testte, 0,1 ml antijenin ön kol iç yüzüne deri içine verilmesinden 48–72 saat sonra oluşan 5 mm'lik endürasyon pozitif olarak deęerlendirilir⁶³. Deney tek başına aktif enfeksiyonun varlığını göstermez. Fakat bir hamilelik olayının fetüs açısından tehlikeli olup olmadığına karar vermede önem taşır. Çünkü toksoplazmozda esas koruyucu fonksiyonun hücresel bağışıklığa bağlı olduğu kabul edilmiřtir¹. Derideki gecikmiş aşırı duyarlılık toksoplazmozda aylar hatta yıllar sonra oluştuğu için bu yöntem, kronik latent enfeksiyon

tanısının konulmasında en uygun yöntem olarak önerilmiştir. Ancak toksoplazmin deri testinin son yıllarda tanısal değeri önemini kaybetmiştir⁶³.

2.9. Tedavi:

İmmün mekanizması normal olan kişilerde ilaç tedavisine gerek olmadan vücut kendini savunabilmektedir². Ancak, bağışıklığı tam olan erişkinlerde belirtiler şiddetlenmedikçe sağaltıma gerek görülmezken, bağışıklık yetmezliği olan hastalarda mutlaka sağaltım yapılmalıdır¹⁸.

Konjenital toksoplazmozda, semptomatik veya asemptomatik durumlarda, primetamin ve sulfadiazinin kombine olarak kullanılmasıyla müdahale edilir. Bir ay süre ile kullanılan bu ilaçlar kombine halde sinerjistik olarak hareket etmekte parazitin dihidrofolat redüktaz üretimini durdurarak DNA, RNA ve protein sentezini engellemektedir. Bu ilaçlar aynı şekilde immün yetmezliği olan ve enfeksiyonun yayıldığı hastalar için de etkilidir¹⁵.

Akut enfeksiyon bağışıklık sistemi normal olan kişilerde kendiliğinden iyileşir, ancak bu hastalarda korioretinit bulguları varsa tedavi edilmelidir¹⁵.

Diaminoprimidinler (primetamin) parazitin proliferasyonunu engeller. Yan etki olarak doza bağılı kemik iliği supresyonuna da yol açabilirler. Bu nedenle sağaltım sürecinde perifer kan ve trombosit sayımı yapılmalıdır ¹⁸. Kan tablosunun olumsuz etkilenmesini önlemek için hastaya folinik asit veya ekmek mayası verilmelidir. Bu ilaç, parazitin kist dönemlerine etkisizdir. Sulfadiazine alternatif olarak klindamisin önerilmektedir¹.

Hamilelerde ise spiramisin kullanılır. Trimetoprim-sulfametaksazol ile 10 günlük bir tedavinin de başarılı olduğu bildirilmiştir.

2.10. Korunma:

Toxoplasma gondii'nin oluşturduğu toksoplazmoz hastalığından korunmak konjenital toksoplazmoz insidansının azaltılması ile ilişkilidir. Aynı zamanda gebelerin bilinçlendirilmeleri de büyük önem taşımaktadır⁶⁶.

Toksoplazmoza yakalanmada ve korunmada, kişinin yeme alışkanlığı büyük önem taşır. Her türlü etin iyi pişirerek yenmesi, kedi ve kedigillerden, onların dışkıları ile bulaşmış yiyecek ve içeceklerden sakınmak çok önemlidir. Bu parazitin çok yaygın olduğu ve hala yayılmaya devam ettiği yurdumuzda, bu konuda ulusal bir savaş yürütülmemektedir. Toksoplazmozun, kişisel sağlığı olumsuz etkilemesi dışında, konjenital

bulaşma yoluyla, nesillerin geleceğini tehdit ettiği, iş gücü kaybına ve körlüğe neden olabildiği unutulmamalıdır¹.

Aşağıdaki tabloda gebelik döneminde toksoplazmozdan korunmak için yapılması gereken bazı öneriler açıklanmıştır⁶⁵.

Tablo 2: Hamilelik döneminde toksoplazmozdan korunmak için öneriler

-
- Sebzelerin ve meyvelerin iyice yıkanması
 - Yıkanmamış sebze ve pişmemiş etlere temastan sonra ellerin iyice yıkanması
 - Toprak ve kumla direk temastan kaçınılması
 - Evlerde kedilerin dışkıladığı toprakları değiştirirken eldiven kullanılması ve ellerin yıkanması
 - Sadece iyi pişmiş etlerin yenmesi, domuz eti, koyun, inek, dana ve tavuk etlerinin en iç kısmında ısı 80 °C ye ulaşana kadar pişirilmesi
-

2.11. Hayvan Modelinde Toksoplazmoz:

Deneysel tıbbın gelişmesinde büyük önem taşıyan hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmaların etkisi ve katkısı günümüzde de devam etmektedir. Deney hayvanlarının yaşam sürelerinin kısa olması, birçok ilaç, madde veya cerrahi uygulamanın sonuçlarının daha erken alınmasını sağlamaktadır⁶⁶.

Çoğu laboratuvar hayvanı *T.gondii* ile enfekte edilebilse de, en sık sıçan ve fareler kullanılmaktadır. Periton içine enjekte edildiğinde *T.gondii* sıçanlarda suşun sürdürülmesi için elverişli olan kronik enfeksiyon

oluştururken, farede hızlı fulminan ve fatal enfeksiyonlar gelişmekte, asit sıvısı aspire edildiğinde bol miktarda trofozoit elde edilebilmektedir⁶³.

Çalışmamızda *T.gondii* takizoitlerini canlı tutup çoğaltmak için fareleri tercih ettik. Deneylerde en çok kullanılan fareler, küçük kemirgen hayvan anlamına gelen "*Mus domesticus domesticus*" olarak isimlendirilmektedir. Farelerin daha önceden taksonomik isimlendirilmeleri "*Mus musculus domesticus*" idi. Bu fareleri tercih etmemize neden olan diğer faktörler ise; fareleri çevresel etkilerden korumanın mümkün olması, koşulları kontrol etme imkanı bulunmasıyla amaca yönelik çalışmanın yapılmasını kolaylaştırması, genetik özelliklerinin diğer hayvanlardan çok daha iyi bilinmesi, üreme döngüleri ve yaşam sürelerinin kısalığı ile ayrıca bu hayvanların küçük olmaları nedeniyle deneylerde işlemlerin kolaylaşması ve de ucuz olmalarıdır⁶⁶.



Şekil 1 : '*Mus domesticus domesticus*' fareleri kafeste

Deneylerde kullanılan farelerin bazı biyolojik özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir ⁶⁶.

Tablo 3: Deneylerde kullanılan farelerin özellikleri

• Erişkin ağırlığı	
Erkek	20–40 g
Dişi	18–35 g
• Yaşam süresi	
Ortalama	1–3 yıl
Maksimum	4 yıl
• Kromozom sayısı	40 (diploid)
• Vücut ısı	37.1–37.4 °C
• Puberte	
Erkek	28–49 gün
Dişi	28-49 gün
• Yetiştirme mevsimi	Yok (kontrollü şartlarda)

2.12. Hedef Amplifikasyon Yöntemlerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) :

İlk kez 1983'te Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. Bu buluş araştırmacıya 1993'te Nobel ödülünü getirmiştir. Tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü olan bu çoğaltma yönteminin tanımlanması, belirli bir nükleik asit dizisinin, in vitro şartlarda, enzimatik olarak çoğaltılması şeklinde yapılmaktadır⁶³. PZR tıbbi araştırma konularının çoğunda önemli kullanım alanı bulmuştur. Özellikle

Mikrobiyoloji’de zor üretilen veya kültürü yapılamayan birçok mikroorganizmanın direk tanısında oldukça başarı sağlamaktadır. Amplifikasyon metodları günümüzde, amplifiye ürünlerin hızlı tespitini sağlayan metodlar ile kombine olarak kullanılmakta olup rutin tanı için oldukça hassas hale gelmişlerdir⁵⁰.

Amplifikasyon yöntemlerinin bu kadar hızlı gelişmesinde iki önemli gelişmenin payı vardır. Bunlardan biri termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* adlı bakteriden ısıya stabil DNA polimerazın izolasyonudur. Bu enzim *Taq* DNA polimeraz olarak tanımlanmış olup, farklı ısı aralıklarında aktivitesini sürdürebilmektedir. İkinci olarak da bilgisayar kontrollü termal döngü cihazlarının geliştirilmesi olmuştur⁵⁰.

PZR’ın özgüllüğü; kalıp DNA ile primerler (spesifik sentetik oligonükleotitler) arasındaki yapının stabilitesine, primerlerin uzunluğuna, ortamın ısısına, reaktiflerin konsantrasyonuna ve primer seçimine bağlıdır. PZR uygulamasına geçilmeden önce incelenecek örneklerinin DNA/RNA ekstraksiyonu gerekmektedir. Klasik olarak biyolojik örneklerden DNA ekstraksiyonu için, organik çözücü ile ayırım, etanol ile çöktürme uygulamalarından yararlanılır. Ortamda kalıp bir DNA molekülü, primer, *Taq* polimeraz enzimi, nükleotidler, tampon solüsyonu bulunmalıdır⁵⁰.

Reaksiyonda üç temel basamak vardır. PCR uygulamasında “tek bir siklus” denildiğinde üç aşama kastedilmektedir. Çoğaltılmış ürünün miktarı, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır⁵⁰.

Birinci basamak: Denatürasyon; İlk adımda çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Çift zincirli DNA tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır, 94–96 °C de birkaç saniye tutulur. Bazı çalışmalarda, amplifikasyon siklusları başlamadan önce 3–5 dakika bir ön denatürasyon işleminin, özellikle denatürasyonu zor olan kalıp DNA’lar için yararlı olduğu bildirilmiştir⁵⁰.

İkinci basamak: Bağlanma (Annealing); Örnek, birkaç dakika 30 – 60°C de tutularak, primerin tek zincirli DNA’daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Isı, primerlerin yapısı ve Tm derecelerine göre hesaplanarak optimize edilebilirse de, yaklaşık olarak 20 bp uzunluğuna sahip primerlerin kullanılması halinde 54°C olarak belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir⁵⁰.

Üçüncü basamak: Uzama (Extension); Polimeraz enzimi yardımı ile tek zincirli DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5’→3’

yönünde uzatılmasıdır. DNA zincirinin komplementlerinin sentezlenmesi için 65–72 °C de birkaç dakika bekletilmesi gerekmektedir⁵⁰.

2.13. İki Turlu (Nested) PZR:

Özellikle duyarlılığı arttırmak için tasarlanmış olan iki turlu PZR, iki takım amplifikasyon primeri kullanır. İki turlu PZR’da, ilk aşamada iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır. İkinci aşamada, amplifikasyon tübünden alınan örnekteki DNA’nın daha kısa bir bölümü iç (inner) primerlerle çoğaltılmaktadır. İç primer, dış primerlerin bağlanma yerlerinin iç kısmında kalan, kendine özgül yerlerine tutunmaktadır. İki turlu PZR toplam döngü sayısının fazlalığı nedeniyle yüksek oranda duyarlıdır. Teorik olarak tek bir primer takımının aynı sayıdaki döngü ile amplifikasyonuna göre daha özgüldür, çünkü ilk amplifikasyon aşamasındaki amplikon ikinci primer çifti için hibridizasyon bölgeleri içermektedir; ikinci primer takımının amplifikasyonu ilk PZR reaksiyonunun özgüllüğünü ortaya koyar. İki turlu amplifikasyonun en büyük dezavantajı ilk amplifikasyon aşamasının tamamlanmasından sonra ürünlerin ikinci tübe transferi sırasında yüksek kontaminasyon riski taşımasıdır. Bu transfer aşaması iki amplifikasyon karışımının mum veya yağ ile fiziksel olarak ayrılması veya ikinci primer takımının ilkine göre bağlanma ısısının daha yüksek tutulmasıyla engellenebilir^{50, 67}.

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler:

- **Deney Hayvanları:** 6 haftalık beyaz fare (*Mus domesticus domesticus*).
- ***Toxoplasma gondii* suşu:** RH suşu.
- **Solusyonlar:**

SNET: 100 ml SNET (Doku lizisini sağlamak için kullanıldı)

2 ml Tris Cl pH:8 1M Trizma base (SIGMA, USA), 1M Tris HCL (SIGMA, USA).

1 ml 0,5 M*EDTA (GIBCO BRL, ABD)

40 ml %0,9 NaCl (Eczacıbaşı, Baxter, Türkiye).

10 ml %10 SDS (Scharlau, İspanya).

47 ml H₂O

“Erythrocid lysis buffer” (ELB):

20 mM Tris Cl pH 7,6 (AppliChem-BioChemica, Almanya).

“Cell lysis buffer” (CLB):

1 ml Tris Cl

200 µl 0,5 M EDTA pH:8

1 ml %10 SDS

97.8 ml H₂O

Potasyum asetat (CARLO ERBA, İtalya):

60 ml 5M Potasyum asetat

23,5 ml H₂O

TE (pH:8)= 100 ml TE pH:8:

10 ml 1M Tris Cl

2 ml 0,5 EDTA

88 ml distile su

Miksler:

Taq polimeraz (10x tamponu ve 25mM MgCl₂ ile birlikte),
dNTP (her bir nükleotidten 10Mm olacak şekilde) (Metis Biyoteknoloji,
Ankara)

529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR reaksiyon karışımı (bir örnek için)¹⁴:

PZR 10X tamponu..... 5 µl

2.5 mM MgCl₂.....4 µl

TOXO4 primeri 0,5 µl

TOXO5 primeri..... 0,5 µl

2.5U/ µl Taq polimeraz..... 0,5 µl

200 µM DNTP's..... 0,2 µl

Ekstrakte DNA..... 1,5ml

Su (H₂O)..... 38 µl

Toplam hacim..... 50,2 µl

(Metis Bioteknoloji, Ankara)

B1 gen bölgesi için PZR reaksiyon birinci turdaki karışımı (bir örnek için)⁶⁸:

PZR 10X Buffer.....	5 µl
2.5 mM MgCl ₂	4 µl
B1 primeri	0,5 µl
B2 primeri.....	0,5 µl
2.5U/ µl Taq polimeraz.....	0,5 µl
200 µM DNTP's.....	0,2 µl
Ekstrakte DNA.....	1,5ml
Su (H ₂ O).....	38 µl
Toplam hacim.....	50,2 µl

(Metis Bioteknoloji, Ankara)

B1 gen bölgesi için PZR reaksiyon ikinci turdaki karışımı (bir örnek için)⁶⁸:

PZR 10X Buffer.....	5 µl
2.5 mM MgCl ₂	4 µl
B3 primeri	0,5 µl
B4 primeri.....	0,5 µl
2.5U/ µl Taq polimeraz.....	0,5 µl
200 µM DNTP's.....	0,2 µl
Ekstrakte DNA.....	1,5ml
Su (H ₂ O).....	38 µl
Toplam hacim.....	50,2 µl

(Metis Bioteknoloji, Ankara)

Agaroz jel %2'lik

TBE 75ml

Agaroz 1,5g: MERCH, Almanya.

Moleküler ağırlık standardı 6x

• **Aletler ve Cihazlar:**

1. Steril enjektör: Hayat, Türkiye
2. Mikroskop: OLYMPUS CX31, Japonya
3. Fare kafesi:
4. Kuru blok: BOECO, BG TDB-100, Almanya
5. Otoklav: SANYO, MLS-3020U, Japonya
6. Santrifüj: BOECO, U-32R, Almanya
7. Termal döngü cihazı: APOLLO, ATC 201, ABD
8. Mikropipet: ISOTHERM, Almanya
9. Elektroforez cihazı: WEALTEC, ELITE 300, Taivan
10. UV translüminatör: SYNGENE, GVM 20, İngiltere
11. Vorteks: BOECO, V1 plus, Almanya
12. Laminar flow kabini: metisafe, Türkiye

• **Kimyasal maddeler:**

1. Alkol: MERCH, Almanya
2. Eter anestezi: Riedel-deHaën-Almanya
3. Isopronal alkol: MERCH, Almanya
4. Etanol % 70: MERCH, Almanya
5. Etidyum bromür: AppliChem-Almanya

6. Borik asit: (AppliChem-BioChemica, Almanya).

- **Boyalar:**

1. Geimsa: SIGMA-ALDRICH, ABD

2. Hematoksilen-Eosin Boyası

- **Primerler:**

1. **529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin primerleri:**

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan, TOXO4 (5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3')

TOXO5 (5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3') primerleri

sırasıyla 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin 5' ve 3' uçlarından

seçilmiştir¹⁴ (TibMolBiol, Almanya).



Şekil 2 : Gen Bankası çekirdek nükleotid veritabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?&DB=nucore>) yer alan AF146527 numaralı kayda göre 200 – 300 kez ardışık olarak tekrar eden 529 bazlık bölge geni üzerinde TOXO4 ve TOXO5 oligonükleotid primerlerin bağlanma yerleri.

2. B1 gen bölgesinin primerleri:

B1 5'-TGTTCTGTCCTATCGCAACG-3'

B2 5'-ACGGATGCAGTTCCTTTCTG-3'

B3 5'-TCTTCCCAGACGTGGATTTC-3'

B4 5'-CTCGACAATACGCTGCTTGA-3'

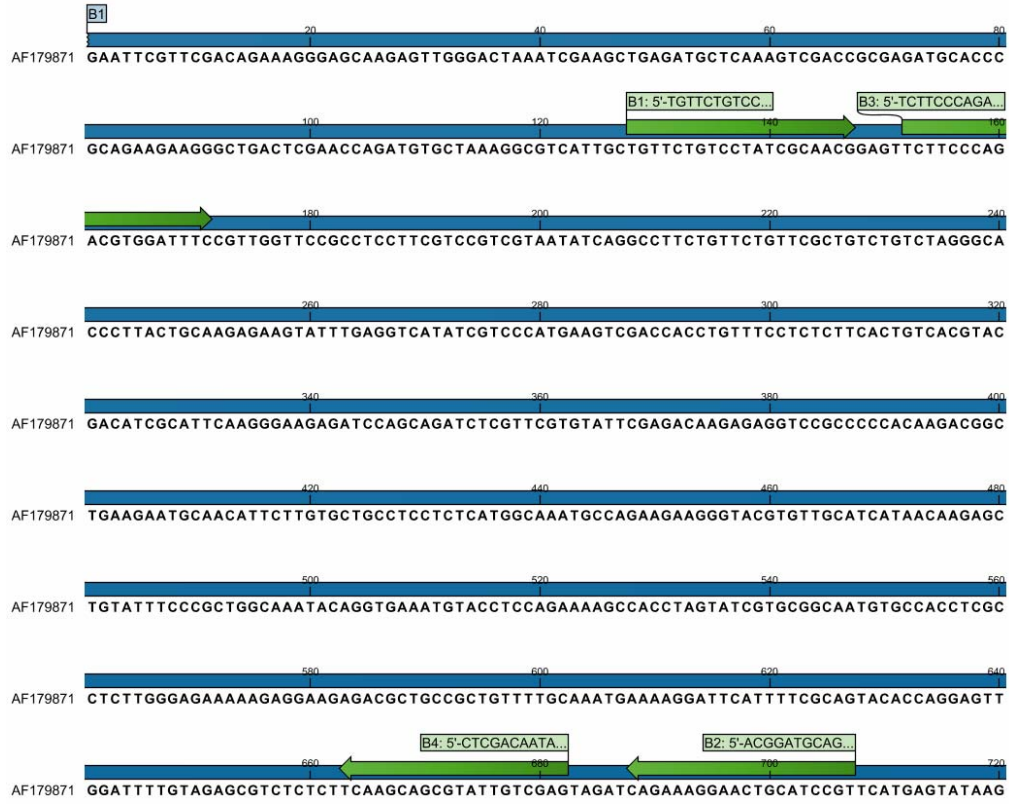
⁶⁸ (TibMolBiol, Almanya).

Tablo 4: Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler, hedef bağlanma bölgeleri ve beklenen PZR ürünü uzunlukları.

Primer adı:	Dizi	Hedef bölge	Beklenen PZR ürünü (baz çifti)
B1	5'-TGTTCTGTCCTATCGCAACG-3'	128..147*	579
B2	5'-ACGGATGCAGTTCCTTTCTG-3'	688..707*	
B3	5'-TCTTCCCAGACGTGGATTTC-3'	152..171*	530
B4	5'-CTCGACAATACGCTGCTTGA-3'	663..682*	
TOX04	5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3'	-2..24**	533
TOX05	5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'	504..529+2**	

*AF179871 numaralı B1 Gen Bankası kaydı

**AF146527 numaralı 529 baz uzunluğundaki ardışık tekrar bölgesi Gen Bankası kay



Şekil 3: Gen Bankası çekirdek nükleotid veritabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?&DB=nucleotide>) yer alan AF179871 kayıt numaralı B1 üzerinde B1 – B2 dış ve B3 – B4 iç oligonükleotid primer çiftlerinin yerleşimi.

3.2. Yöntemler:

3.2.1. Fareye pasaj için *T.gondii* içeren periton sıvısının hazırlanması:

Altı haftalık beyaz fındık farelerine (*Mus domesticus domesticus*) pasaj yapılır. Her keresinde 10 fareye pasaj yapılmıştır. *Toxoplasma gondii* ile enfekte farelere eter anestezisi ile ötenazi yapılmıştır. Daha sonra periton derisi açılıp, steril enjektörlerle eksudası alınmış ve mikroskopta 40'luk objektifle incelenmiştir. Eksuda bol sayıda toksoplazma takizoitleri içermeli, lökosit birkaç tane veya hiç olmamalıdır. Pasaj sayısına yetecek kadar steril fizyolojik su bir tüpe konulduktan sonra üzerine uygun eksudadan damla damla ilave edilerek karıştırıcıda

(vorteks) karıştırılmış ve her mikroskop sahasında (40'lık objektif) 15–20 toksoplazma olacak şekilde ayarlanmıştır. Pasajda kullanılan periton sıvısının mililitresinde 500,000 takizoit bulunmaktadır.

3.2.2. Fareye pasaj işlemi:

Uygun şekilde hazırlanan toksoplazmalı periton sıvısı içeren pasaj materyali enjektöre çekilip havası alındıktan sonra, fare kafesten kuyruğun tabanı başparmak ve işaret parmağı arasında tutularak çıkarılmış ve hemen tutunabilmesi için kafes üstüne alınmıştır. Sonra sırtındaki gevşek deriden yine baş ve işaret parmakları arasında tutulmuştur. Kuyruk 4. ve 5. parmaklar arasında sıkıştırılarak göbeği yukarı olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyona hazırlanmış olur⁶⁷. Alkollü pamukla karnı silindikten sonra, enjektörle kasıktan girilmiştir. Deri altından göbek hizasına kadar gidilip iğneyi dikey hale getirerek karın boşluğuna 50,000 / 0,1 cc takizoit enjekte edilmiş ve fare başka bir kafese bırakılmıştır. Pasaj işlemi bittikten sonra pasaj tarihi kafese kaydedilir. Fare yemi doldurulur ve içmeleri için su konulur⁶⁹.

3.3. Öldürülen Enfekte Farelerden Dokuların Alınması:

Canlı toksoplazma takizoitleri verilen hayvanlara eter anestezisi ile ötenazi uygulanmıştır. PZR çalışması için ekstraksiyon protokolüne göre farelerin karaciğer, beyin ve dalak dokularından yaklaşık 100 mg örnek alınmıştır⁷⁰. Deney hayvanlarından çıkarılan bu dokular 250

ml SNET içeren ependorflara konulmuştur. Organlardan kalan dokular ise yedek olarak -80°C de saklanmıştır. Enfekte hayvanlardan alınan kan örnekleri hemen çalışmak üzere sitratlı tüplere alınmıştır (Kanların pıhtılaşmaması için yavaşca tüplerde karıştırılmalıdır).

3.4. *Toxoplasma gondii* DNA'sının Ekstraksiyonu:

3.4.1. Tam kan ekstraksiyonu:

Bizim kullandığımız protokole göre hayvan kanı hemen ekstraksiyona alınmalıdır. Ancak alınan kan hemen ekstraksiyon işlemine alınmayacaksa kan örnekleri 300'er µl ependorflara dağıtılmalı ve -80°C de dondurulmalıdır⁷⁰.

Ekstraksiyonun ilk aşaması olarak 300 µl sitratlı tam kan ependorfa konulduktan sonra üzerine 900 µl eritrosit liziz buffer eklenmiş ve vortekslenmiştir. On dakika oda ısısında inkübe edilmiş, tekrar vortekslenmiş ve daha sonra 14,000 rpm'de 20 saniye santrifüj edilmiştir. 20–30 µl süpernetant kalacak şekilde üst kısım pipetle dikkatlice atıldıktan sonra, 600 µl “ice-cold cell lysis buffer” (CLB) tüpe eklenmiştir (Ice-cold cell lysis buffer'ın ısı 0°C olmalıdır). Bu karışım vortekslenildikten sonra pipetaj yaparak 3 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenmiş ve ısıtıcıda 55°C de, 3 saat bekletilmiştir⁷⁰.

Ependorflar soğuduktan sonra 200 µl potasyum asetat solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra +4°C de 3 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edilmiş, beş dakika buzda bekletilmiş ve tekrar +4 °C de 3 dakika 14,000 rpm de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni ependorfa alındıktan sonra 600 µl isopropanol alkol koyulup vortekslenmiştir. Oda ısısında 1 dakika 14,000 rpm de santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldıktan sonra % 70'lik etanolden 600 µl eklenip vortekslenmiştir. Tekrar oda ısısında, 14,000 rpm de bir dakika santrifüj edilmiş, süpernatant dikkatlice alınmış ve atılmıştır. DNA peletinin kuruması için etüvde 15 dakika bekletilmiştir. Kuruduktan sonra 100 µl TE (pH 7,6) solüsyonu eklenmiş (1x TE), 16 saat oda ısısında bekletilmiştir. Bu işlemler sonucunda DNA elde edilmiştir⁷⁰.

3.4.2. Doku ekstraksiyonu:

SNET solüsyonundan 250 µl içeren ependorflar içine alınmış olan doku parçaları üzerine çalışma zamanı 250 µl SNET eklenmiştir. Pipetaj yaparak karaciğer için 60 µl, beyin dokusu için 50 µl ve dalak için 65 µl proteinaz K eklediğimiz zaman (dokunun parçalanması, erimesi açısından) en iyi sonuç elde edilmiştir. Daha sonra bir gece 55°C de ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Isıtıcıda inkübasyon süresince doku örneklerini birkaç kere vortekslemenin faydalı olduğu görülmüştür (mekanik parçalama). İnkübasyondan sonra 500 µl alkol karışımından (25 ml fenol, 24 ml kloroform, 1 ml isomil alkol) eklenip vortekslenmiş ve 5 dakika, 4°C

de 14,000 rpm de santrifüj edilmiştir. İnkübasyondan sonra yapılan bu işlem en az 2–3 kere tekrarlanmıştır. Daha sonra üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra, DNA presipitasyonu için eşit hacimde isopropanol eklenip 14.000 rpm de, 4°C de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısmı atıp DNA pelleti üzerine 1 ml etanol (%70) ilave edilmiştir. Tekrar 5 dakika santrifüj edilmiş ve DNA pelleti net olarak görünmüyorsa etanol ekleyip santrifüj etme işlemi tekrarlanmıştır. DNA pelletinin kuruması için 15–20 dakika oda ısısında ependoflar bekletilmiştir. Tüplere 0,5 ml TE (pH 8) eklenip vortekslenmiştir. Son olarak 4°C de bir gece bekletilmiş ve ertesi günü vorteksledikten sonra, –80°C de saklanmıştır⁷⁰.

3.5. Amplifikasyon:

İki turlu PZR yöntemi ile B1 gen bölgesi ve konvansiyonel PZR yöntemi ile 529 bç ardışık tekrar bölgesi genine yönelik primerler kullanılarak *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır. Çalışma sonucunda son zamanlarda önem kazanan 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile B1 gen bölgesinin duyarlılık açısından karşılaştırması da yapılmıştır.

3.5.1. 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin konvansiyonel PZR ile amplifikasyonu:

Bu çalışma için pH ve MgCl₂ optimize edildikten sonra PZR reaksiyon karışımından her örnek için (1X) 50,2 µl miks amplifiye edilmiştir.

529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin amplifikasyon programı¹⁴:

Denaturasyon için 94 °C'de 3 dakika

Denaturasyon için 94 °C'de 1 dakika

Primer bağlanması için 55 °C'de 1 dakika

Primer uzaması için 72 °C'de 1 dakika

35 siklus

Primer uzaması için 72 °C'de 10 dakika

3.5.2. Toxoplasma gondii'nin B1 bölgesi kullanılarak iki turlu PZR ile tanımlanması:

Toxoplasma gondii'nin tanısı için B1 geni günümüzde en çok kullanılan gen bölgesi olup Burg ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İki turlu PZR yöntemi ile B1 geni iki turda amplifiye edilmiş ve her iki turda da aynı ısılar ve protokoller kullanılmıştır⁶². B1 gen bölgesi için 1.turda B1 ve B2, 2.turda B3 ve B4 primerleri kullanılmıştır.

B1 geninin amplifikasyon programı⁶⁹:

İki turlu PZR için amplifikasyon programı:

Denaturasyon için 94 °C'de 3 dakika

Denaturasyon için 94 °C'de 30 saniye

Primer bağlanması için 60 °C'de 30 saniye

Primer uzaması için 72 °C'de 30 saniye

35 siklus

Primer uzaması için 72 °C'de 5 dakika

3.6. Jel'de Yürütme ve Görüntüleme İşlemi:

Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde, 1X TBE (Tris-borik asit EDTA) tamponunda, 1/2 saat, 100V elektroforezde yürütülmüştür. Etidyum bromürle boyanarak UV translüminatör altında bantlar görüntülenmiştir.

3.7. PZR ile B1 Gen Bölgesi ve 529 bç Ardışık Tekrar Bölgesi Geni Primerlerinin Duyarlılıklarının Ölçülmesi:

Enfekte farelerin peritoneal sıvısındaki takizoit sayısı Thoma lamı ile mikroskopta hesaplanmıştır. Bulunan $1,4 \times 10^7$ / ml takizoitler 10'ar kat sulandırılarak alt dilisyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan, kan ekstraksiyon protokolü (ELB aşaması uygulanmadan) kullanarak hem B1 geni hem de 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile amplifikasyonları yapılmış ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Çalışmanın başından sonuna kadar her çalışma için pozitif ve negatif kontrol örnekler kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak enfekte fare periton sıvısından hazırlanan $1,4 \times 10^7$ / ml takizoit yoğunluğu, negatif kontrol da ise steril distile su kullanılmıştır.

3.8. İstatistiksel Analizler:

İstatistiksel analizler iki yığın oranının eşitliği testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fare ve *T.gondii* İzolatları:

Bu çalışmaya biri kontrol toplam beş fare grubu alınmıştır. Kontrol grubunda 6, deney gruplarının üçünde 10'ar, birinde ise 13 fare çalışılmıştır. Birinci deney grubundaki 10 fare *T.gondii* ile enfeksiyondan 24 saat sonra, ikinci deney grubundaki 10 fare *T.gondii* ile enfeksiyondan 48 saat sonra, üçüncü deney grubundaki 13 fare *T.gondii* ile enfeksiyondan 72 saat sonra, dördüncü deney grubundaki 10 fare *T.gondii* ile enfeksiyondan 96 saat sonra ötenazi yapılarak kan, beyin, karaciğer ve dalak dokuları çıkarılmıştır. Tüm dokularda iki farklı primer kullanarak (529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ve B1gen bölgesi) konvansiyonel PZR ve iki türlü PZR yöntemi ile *T.gondii*'nin DNA'sı gösterilmeye çalışılmıştır.

4.2. Enfekte Fare Dokularının Makroskopik Bulguları:

Farelerin çeşitli organlarında oluşan patolojik lezyonlar en iyi enfeksiyonun 96'ıncı saatinde makroskopik olarak gözlenmiştir.

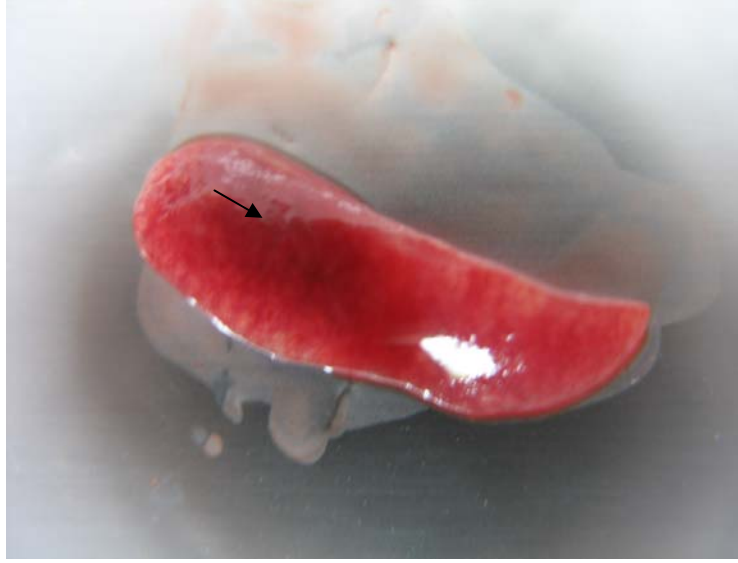
Enfekte farelerin beyinlerinde 96'ıncı saatte kanama odakları saptanmıştır (Şekil 4). Kontrol grubuna göre, enfekte edilen farelerin dalağında büyüme, enfeksiyonun 96'ıncı saatinde ve özellikle dalağın orta kısmında kanama ve nekroz gözlenmiştir (Şekil 6)



Şekil 4: Enfeksiyonun 96'ıncı saatinde Enfekte Fare Beyini



Şekil 5: Kontrol Grubu Fare Beyini

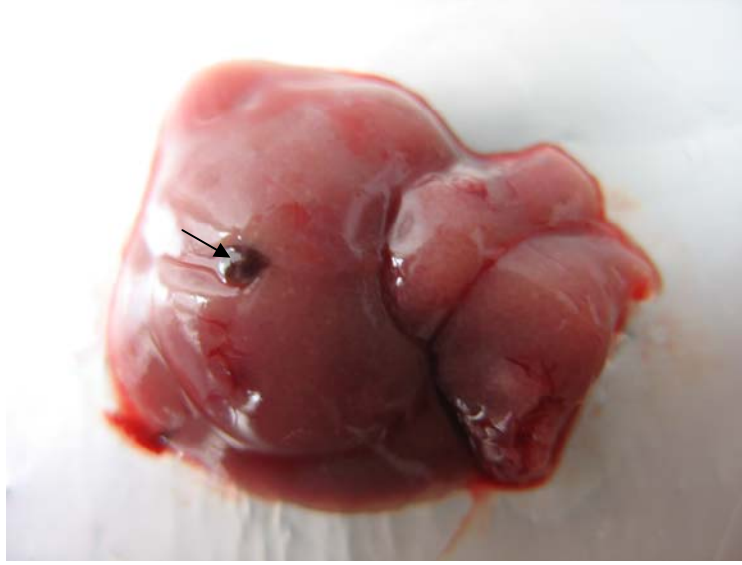


Şekil 6: Enfeksiyonun 96'ıncı Saatinde Enfekte Fare Dalağı (Ok, kanama ve nekroz odağını işaret etmektedir)



Şekil 7: Kontrol Grubu Fare Dalağı

Enfeksiyonun 96'ıncı saatinde enfekte farelerin karaciğerlerinin renginin koyulaştığı, hemorajik olduğu ve hepsinde safra kesesinin siyahlaştığı ve küçüldüğü saptanmıştır (Şekil 8)



Şekil 8: Enfeksiyonun 96'ıncı Saatinde Enfekte Fare Karaciğeri (Ok safra kesesini göstermektedir)



Şekil 9: Kontrol Grubu Fare Karaciğeri

Ayrıca, farelerin diyaframlarının üstünde, göğüs bölgesinde kalp ve akciğerleri saran kanlı bir sıvı gözlenmiştir.

4.3. Deney Gruplarında B1 Geni Primerleri Kullanılarak İki Turlu PZR Yöntemiyle Saptanan *T.gondii* DNA Sonuçları:

Birinci deney grubunda enfeksiyondan 24 saat sonra farelerin kan, beyin, karaciğer ve dalaklarında iki turlu PZR yöntemiyle B1 geni için 1.turda B1 ve B2 primerlerini kullanarak *T.gondii*'nin genetik materyali olan DNA'sı araştırılmıştır. Ancak tüm örneklerde 1.tur sonucunda bant oluşmamıştır. PZR'nin B3 ve B4 primerleri kullanarak çalıştığımız 2.turunda ise, toplam 10 hayvanın üçünün (6, 8, 9 no.lu fareler) kan örneğinde, üçünün (2, 4, 9 no.lu fareler) beyin örneğinde, üçünün de (6, 7, 8 no.lu fareler) karaciğer örneğinde, dördünün ise (2, 5, 6, 8 no.lu fareler) dalak örneğinde pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo 5)

Tablo 5: 1.Grup: Enfeksiyondan 24 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki turlu PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan		Beyin		Karaciğer		Dalak	
	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur
1	*N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	P	N	N	N	P
3	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	P	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	P
6	N	**P	N	N	N	P	N	P
7	N	N	N	N	N	P	N	N
8	N	P	N	N	N	P	N	P
9	N	P	N	P	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N	N	N

*N=Negatif

**P=Pozitif

İkinci deney grubunda enfeksiyondan 48 saat sonra 10 farenin kan, beyin, karaciğer ve dalak dokularında iki türlü PZR yöntemiyle *T.gondii*'nin DNA'sı gösterilmiştir. Birinci turun sonunda iki farenin kan örnekleri (6, 8 no.lu fareler), iki farenin beyin örnekleri (2, 3 no.lu fareler), bir farenin karaciğer örneği (6 no.lu fare) pozitif bulunmuştur. İkinci turda ise 10 hayvanın beşinde (1, 2, 6, 8, 9 no.lu fareler) kan örnekleri, altı farenin (2, 3, 4, 5, 7, 8 no.lu fareler) beyin örnekleri, sekiz farenin (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 no.lu fareler) karaciğer örnekleri ve altı farenin (2, 4, 6, 7, 8, 9 no.lu fareler) dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 6).

Tablo 6: 2.Grup: Enfeksiyondan 48 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki türlü PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan		Beyin		Karaciğer		Dalak	
	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur
1	*N	P	N	N	N	P	N	N
2	N	P	P	P	N	P	N	P
3	N	N	P	P	N	N	N	N
4	N	N	N	P	N	P	N	P
5	N	N	N	P	N	P	N	N
6	**P	P	N	N	P	P	N	P
7	N	N	N	P	N	P	N	P
8	P	P	N	P	N	P	P	P
9	N	P	N	N	N	N	N	P
10	N	N	N	N	N	P	N	N

*N=Negatif

**P=Pozitif

Üçüncü deney grubunda enfeksiyondan 72 saat sonra tüm farelerin kan, beyin, karaciğer ve dalaklarında iki türlü PZR yöntemiyle *T.gondii*'nin DNA'sı araştırıldığında, birinci turun sonunda iki farenin (2, 5 no.lu fareler) kan örneği, bir farenin (9 no.lu fare) dalak örneği pozitif olarak saptanmıştır. Beyin ve karaciğer örneklerinin hiç birinde *T.gondii* DNA'sı saptanmamıştır. İkinci turda ise, sekiz farenin (2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13 no.lu fareler) kan örnekleri, altı farenin (2, 3, 4, 5, 7, 8 no.lu fareler) beyin örnekleri, dört farenin (3, 4, 6, 10 no.lu fareler) karaciğer örnekleri ve sekiz farenin de dalak örnekleri (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 no.lu fareler) pozitif bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7: 3.Grup: Enfeksiyondan 72 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki türlü PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan		Beyin		Karaciğer		Dalak	
	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur
1	*N	N	N	N	N	P	N	N
2	**P	P	N	N	N	P	N	P
3	N	N	N	P	N	N	N	P
4	N	P	N	P	N	P	N	P
5	P	P	N	N	N	N	N	P
6	N	N	N	P	N	P	N	P
7	N	N	N	N	N	N	N	P
8	N	P	N	N	N	N	N	P
9	N	P	N	N	N	N	P	P
10	N	P	N	P	N	N	N	P
11	N	P	N	N	N	P	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	P	N	N	N	P	N	N

*N=Negatif

**P=Pozitif

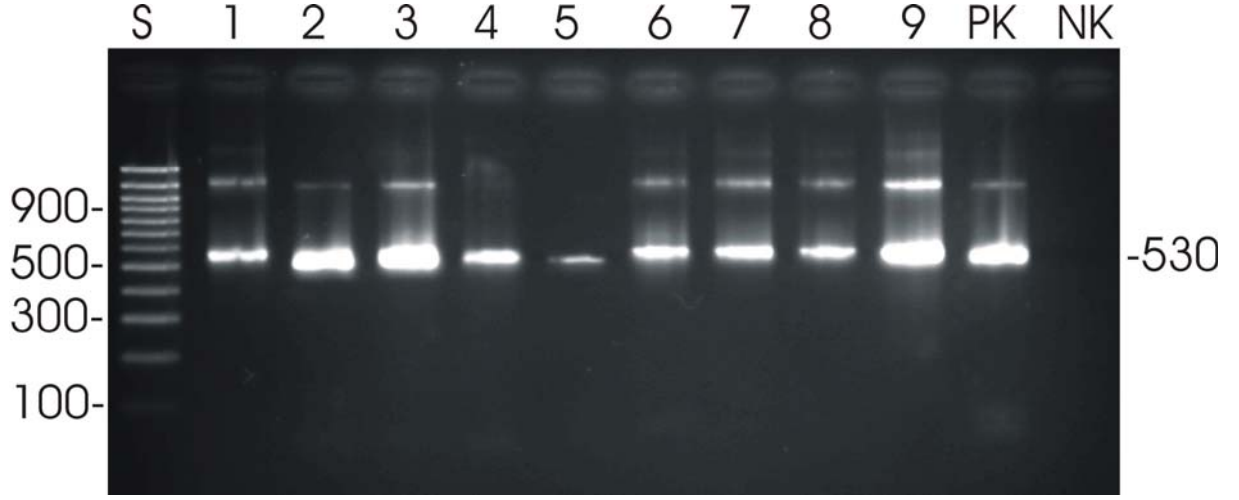
Dördüncü deney grubunda enfeksiyondan 96 saat sonra tüm farelerin kan, beyin, karaciğer ve dalaklarında iki türlü PZR yöntemiyle *T.gondii*'nin DNA'sı gösterilmiştir. Birinci turun sonunda dört farenin (3, 6, 7, 8 no.lu fareler) kan örnekleri, üç farenin (5, 8, 10 no.lu fareler) karaciğer örnekleri, bir farenin (6 no.lu fare) dalak örneği pozitif bulunmuştur. Tüm farelerin beyin örneklerinde ise birinci turda DNA bandı saptanmamıştır. İkinci turun sonunda ise, sekiz farenin (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 no.lu fareler) kan örneklerinde, beş farenin (3, 6, 7, 9, 10 no.lu fareler) beyin örneklerinde, altı farenin (2, 5, 7, 8, 9, 10 no.lu fareler) karaciğer örnekleri ve sekiz fareninde (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 no.lu fareler) dalak örneklerinde *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 8: 4.Grup: Enfeksiyondan 96 saat sonra farelerin çeşitli dokularında B1 geninin iki türlü PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan		Beyin		Karaciğer		Dalak	
	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur
1	*N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	P	N	N	N	P	N	P
3	**P	P	N	P	N	N	N	P
4	N	P	N	N	N	N	N	P
5	N	P	N	N	P	P	N	P
6	P	P	N	P	N	N	P	P
7	P	P	N	P	N	P	N	N
8	P	P	N	N	P	P	N	P
9	N	N	N	P	N	P	N	P
10	N	P	N	P	P	P	N	P

* N=Negatif

** P=Pozitif



Şekil 10: B1 gen bölgesini hedefleyen B1, B2, B3 ve B4 primer ile farklı doku ve kan örneklerinden elde edilen 530 baz uzunluğundaki PZR ürünleri. (S: 100 baz merdiven DNA moleküler ağırlık standardı; kulvar 1–9 enfeksiyonun farklı saatlerinde *farelerin doku ve kan örneklerinden elde edilen 530 baz uzunluğundaki PZR ürünleri; NK: PZR negatif kontrol; PK: PZR pozitif kontrol

4.4. Deney Gruplarında 529 bç Ardışık Tekrar Bölgesi Geni Primerleri

Kullanarak Konvensiyonel PZR Yöntemiyle Saptanan *T.gondii* DNA

Sonuçları:

Birinci deney grubunda *T.gondii* enfeksiyonundan 24 saat sonra; 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni için TOXO4 ve TOXO5 primerleri kullanılarak, tüm örneklerde konvensiyonel PZR yöntemi çalışılmıştır. Enfekte edilen toplam 10 fareden üçünün (4, 8, 9 no.lu fareler) kan örnekleri, üçünün (2, 4, 8 no.lu fareler) beyin örnekleri, yedi farenin (1, 2, 4, 6, 7, 8,10 no.lu fareler) karaciğer örnekleri ve üç farenin (5, 6, 8 no.lu fareler) dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 9: 1.Grup: *Toxoplasma gondii* enfeksiyonundan 24 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan	Beyin	Karaciğer	Dalak
1	*N	N	P	N
2	N	P	P	N
3	N	N	N	N
4	**P	P	P	N
5	N	N	N	P
6	N	N	P	P
7	N	N	P	N
8	P	N	P	P
9	P	P	N	N
10	N	N	P	N

*N=Negatif

**P=Pozitif

İkinci deney grubunda enfeksiyondan 48 saat sonra 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanarak ve konvansiyonel PZR yöntemi ile kan, beyin, karaciğer ve dalak örneklerinde *T.gondii* DNA'sı araştırılmıştır.

Genel olarak tüm örneklerde pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur. On fareden 9'unun (7 no.lu fare negatif) kan örnekleri, yedi farenin (6, 9, 10 no.lu fareler negatif) beyin örnekleri, sekiz farenin (3 ve 9 no.lu fareler negatif) karaciğer örnekleri ve dokuz farenin (5 no.lu fare negatif) dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 10).

Tablo 10: 2.Grup: *Toxoplasma gondii* enfeksiyonundan 48 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesinin PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan	Beyin	Karaciğer	Dalak
1	**P	P	P	P
2	P	P	P	P
3	P	P	N	P
4	P	P	P	P
5	P	P	P	N
6	P	N	P	P
7	*N	P	P	P
8	P	P	P	P
9	P	N	N	P
10	P	N	P	P

*N=Negatif

**P=Pozitif

Üçüncü deney grubunda enfeksiyondan 72 saat sonra 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin kullanarak ve konvansiyonel PZR yöntemi ile kan, beyin, karaciğer ve dalak örnekleri incelenmiştir. Bu grupta 13 fare çalışılmıştır, ancak sonuçlar 10 fare üzerinden değerlendirilmiştir. Bu grubun tüm örneklerinde pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur. Kan örneklerinin sonuçlarına baktığımız zaman toplam 13 farenin 11'inde (1 ve 7 no.lu fareler negatif) *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır. Yedi farenin (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 no.lu fareler) beyin örnekleri, 11 farenin (10 ve 13 no.lu

fareler negatif) karaciğer örnekleri ve 11 farenin (12 ve 13 no.lu fareler negatif) dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11: 3.Grup: *Toxoplasma gondii* enfeksiyonundan 72 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan	Beyin	Karaciğer	Dalak
1	*N	N	P	P
2	**P	N	P	P
3	P	P	P	P
4	P	P	P	P
5	P	P	P	P
6	P	P	P	P
7	N	P	P	P
8	P	N	P	P
9	P	P	P	P
10	P	P	N	P
11	P	N	P	P
12	P	N	N	N
13	P	N	P	N

*N=Negatif

**P=Pozitif

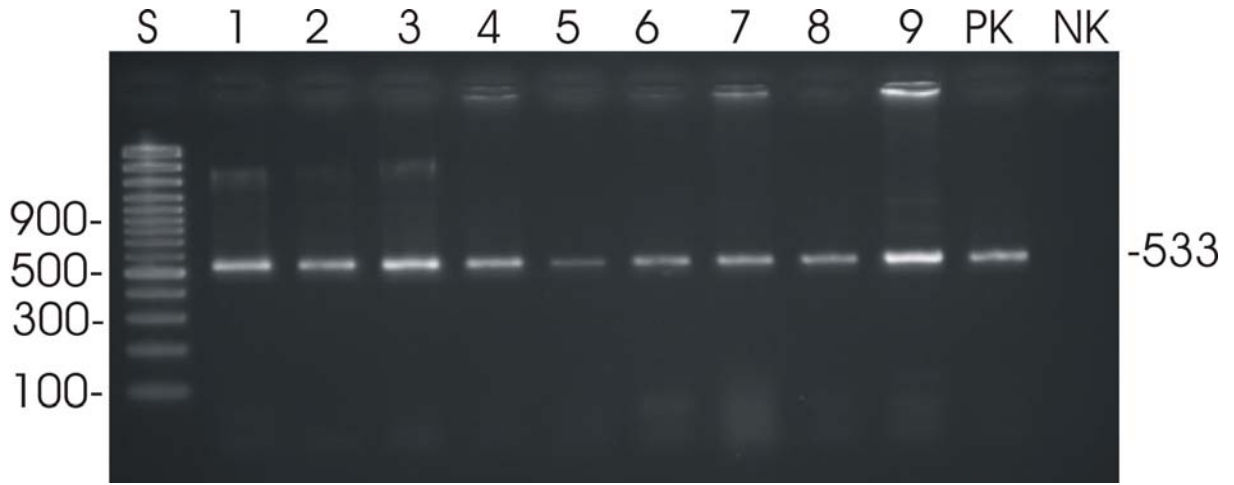
Dördüncü deney grubunda enfeksiyondan 96 saat sonra 529 bç ardışık tekrar bölgesi genini kullanarak ve konvansiyonel PZR yöntemi ile kan, beyin, karaciğer ve dalak örnekleri incelenmiştir. En yüksek

pozitiflik oranı bu grupta elde edilmiştir. *Toxoplasma gondii* ile enfekte edilen 10 fareden oluşan bu grubun tüm kan, beyin, karaciğer ve dalak dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanarak yapılan konvansiyonel PZR yöntemi ile *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12: 4.Grup: *Toxoplasma gondii* enfeksiyonundan 96 saat sonra farelerin çeşitli dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi

Hayvan no.	Kan	Beyin	Karaciğer	Dalak
1	*P	P	P	P
2	P	P	P	P
3	P	P	P	P
4	P	P	P	P
5	P	P	P	P
6	P	P	P	P
7	P	P	P	P
8	P	P	P	P
9	P	P	P	P
10	P	P	P	P

*P=Pozitif



Şekil 11: 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni hedefleyen TOXO4 – TOXO5 primer çifti ile farklı doku ve kan örneklerinden elde edilen 533 baz uzunluğundaki PZR ürünleri. (S: 100 baz merdiven DNA moleküler ağırlık standardı; kulvar 1–9 enfeksiyonun farklı saatlerinde *farelerin doku ve kan örneklerinden elde edilen 533 baz uzunluğundaki PZR ürünleri; NK: PZR negatif kontrol, PK: PZR pozitif kontrol

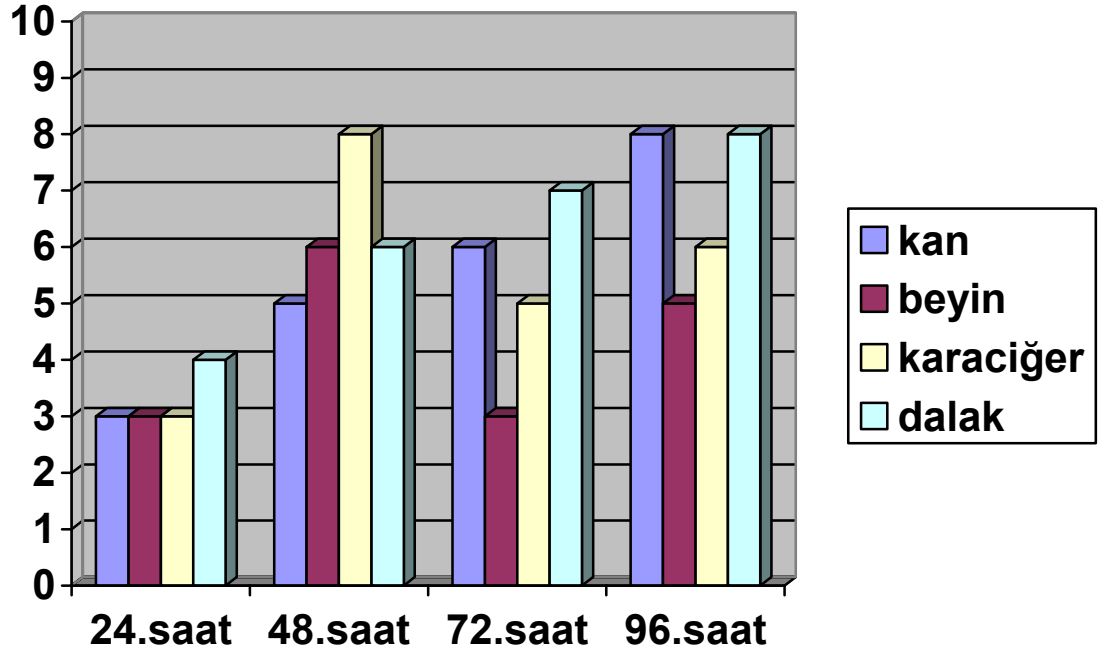
Telef edilen hayvan sayısının azaltılması amacıyla ve malzeme kısıtlılığı nedeniyle kontrol grubunda altı fare kullanılmıştır. Kontrol grubunda da diğer gruplarda yapıldığı gibi kan, beyin, karaciğer ve dalak örnekleri B1 gen bölgesi ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanılarak aynı şekilde çalışılmıştır. Tüm hayvanların örnekleri iki farklı primer ile yapılan PZR sonucunda negatif bulunmuştur. Bütün deneylerde pozitif ve negatif kontrol kullanılmıştır (Tablo 13).

Tablo 13: Kontrol grubunda *Toxoplasma gondii* B1 geni ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin PZR ile gösterilmesi

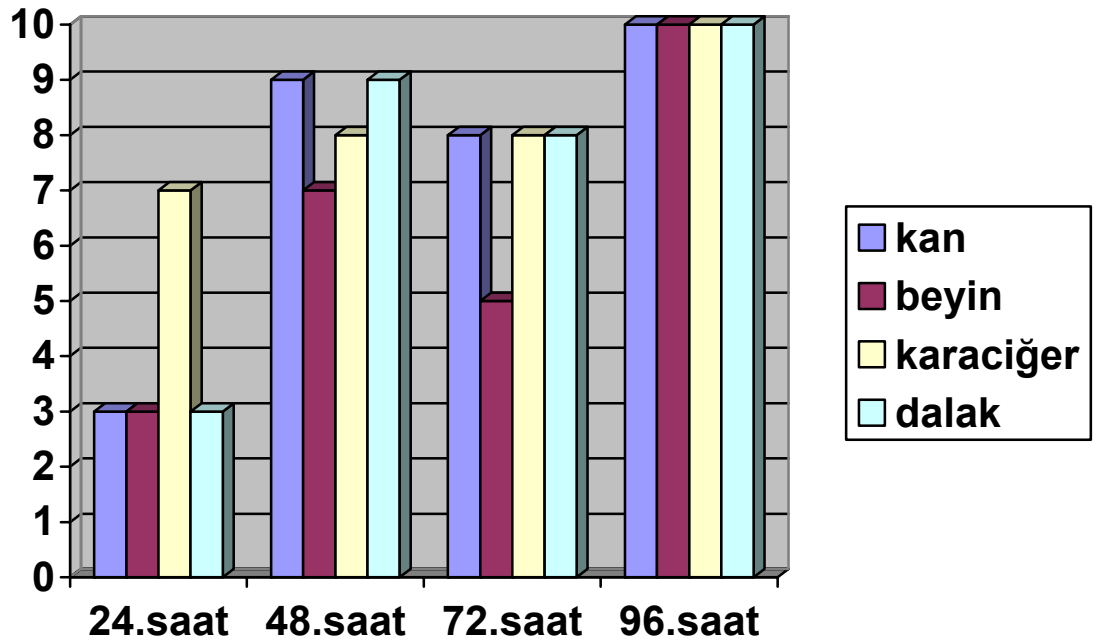
	B1								529 bç ardışık tekrar bölgesi geni			
Hayvan.no.	Kan		Beyin		Karaciğer		Dalak		Kan	Beyin	Karaciğer	Dalak
	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur	1.tur	2.tur				
1	*N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

*:N=Negatif

Tüm deney gruplarında farelerin çeşitli organlarında iki farklı PZR yöntemiyle saptanan *T.gondii* DNA pozitifliği Şekil 12, 13 ve Tablo 14, 15' te gösterilmiştir.



Şekil 12: B1 geni iki türlü PZR sonuçları



Şekil 13: 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni konvansiyonel PZR sonuçları

Tablo 14: B1 geni iki turlu PZR yöntemiyle elde edilen band sayısı

	24.saat	48.saat	*72.saat	96.saat
Kan	3P	5P	6P	8P
Beyin	3P	6P	3P	5P
Karaciğer	3P	8P	5P	6P
Dalak	4P	6P	7P	8P

*72'inci saat sonuçları 10 hayvan üzerinden değerlendirildi.

Tablo 15: 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni konvansiyonel PZR ile elde edilen band sayıları

	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat
Kan	3P	9P	8P	10P
Beyin	3P	7P	5P	10P
Karaciğer	7P	8P	8P	10P
Dalak	3P	9P	8P	10P

İki yığın oranının eşitliği testi kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmede çalışmaya dahil edilen tüm örneklerden (kan, karaciğer, beyin, dalak) elde edilen pozitif sonuçlar B1 geni ile 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanılarak yapılan çalışmaların istatistiksel değerlendirmesinde fark önemlidir ($p<0,05$). 529 bç ardışık tekrar bölgesi

geninin kullanıldığı PZR yöntemi B1 geninin kullanıldığı PZR yöntemine göre daha duyarlıdır.

Kan, beyin ve karaciğer örneklerinde B1 geni ile 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanılarak yapılan PZR yönteminde iki gen bölgesinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel fark önemlidir ($p<0,05$). 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin kullanıldığı PZR yöntem B1 geninin kullanıldığı PZR yöntemine göre daha duyarlıdır. Dalak örneklerinde ise B1 geni ile 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanılarak yapılan PZR yönteminde iki gen bölgesinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel fark önemli değildir ($p>0,05$). 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin kullanıldığı PZR yöntemi ile B1 geninin kullanıldığı PZR yöntemi arasında duyarlılık açısından istatistiksel olarak fark önemli değildir.

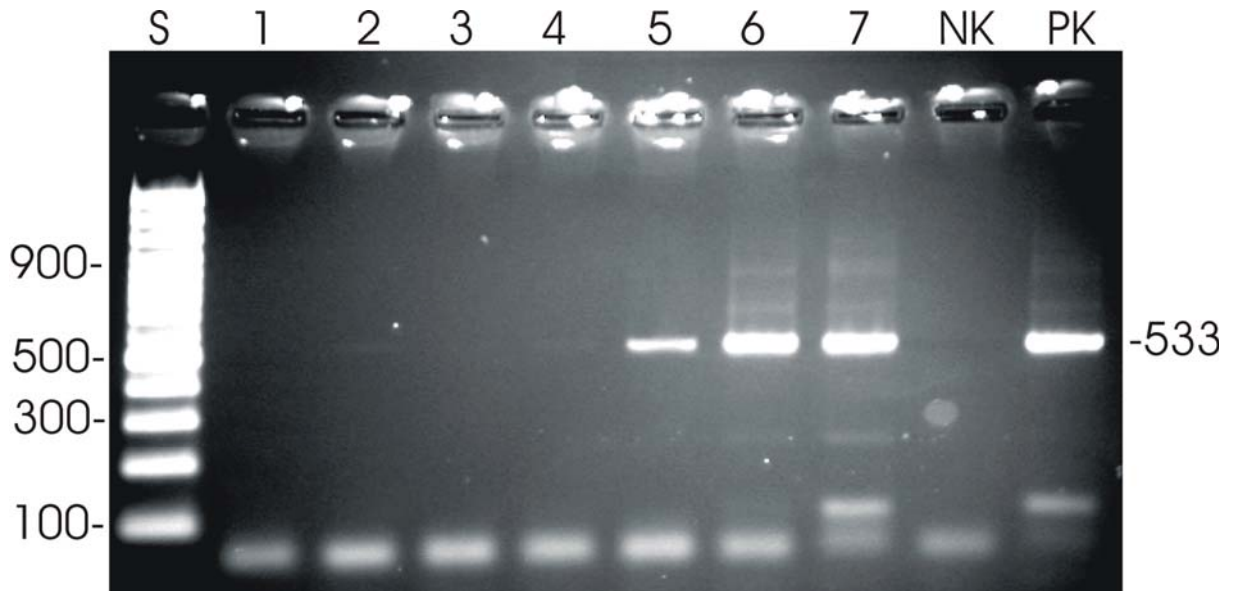
4.5. B1 gen Primeri ve 529 bç Ardışık Tekrar Bölgesi Gen Primerinin PZR Yöntemiyle Saptayabildikleri *Toxoplasma* Takizoit Miktarının Belirlenmesi:

Çalışmamızın bir diğer amacı olarak da, B1 gen bölgesi ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi gen primerlerinin duyarlılıklarını PZR yöntemiyle ölçmesidir. B1 geni ile elde edilen sonuçlara baktığımız zaman en az $1,4 \times 10^4$ ml toksoplazma takizoitini saptarken, 529 bç ardışık tekrar

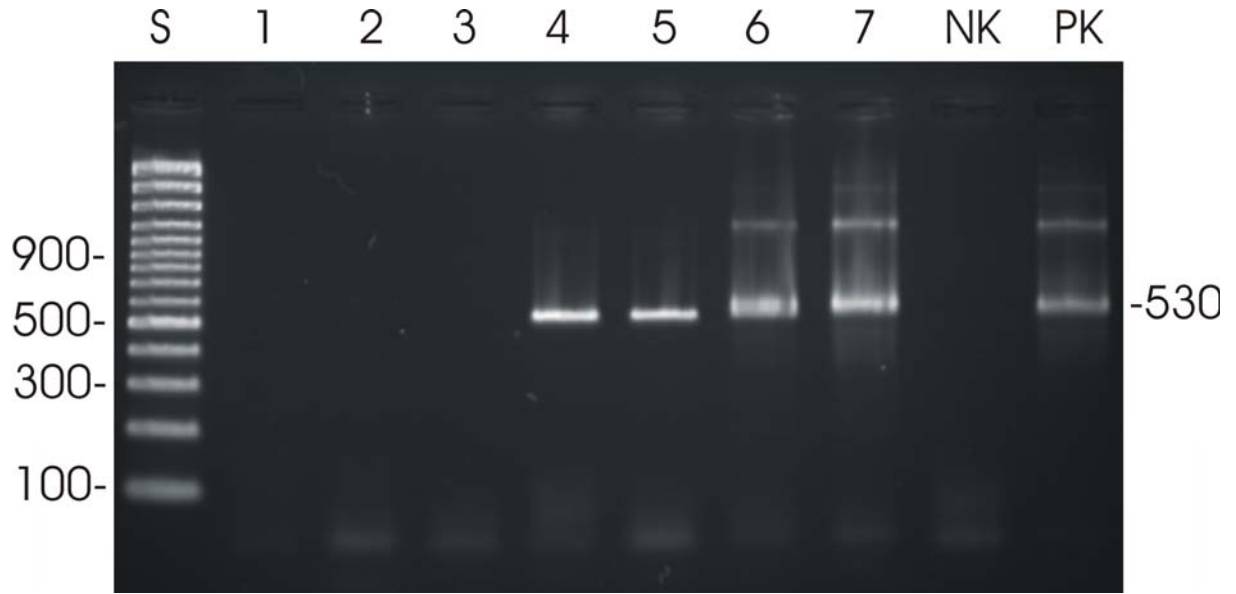
bölgesi geninin en az $1,4 \times 10^2$ ml toksoplazma takizoitini saptayabildiği bulunmuştur (Tablo 16)

Tablo 16: B1 gen primeri ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni primerinin PZR yöntemiyle saptayabildikleri *Toxoplasma* takizoit sayıları

Dilisyon	B1 geni	529 bç ardışık tekrar bölgesi geni
$1,4 \times 10^7$ /ml	P	P
$1,4 \times 10^6$ /ml	P	P
$1,4 \times 10^5$ /ml	P	P
$1,4 \times 10^4$ /ml	P	P
$1,4 \times 10^3$ /ml	N	P
$1,4 \times 10^2$ /ml	N	P
$1,4 \times 10$ /ml	N	N



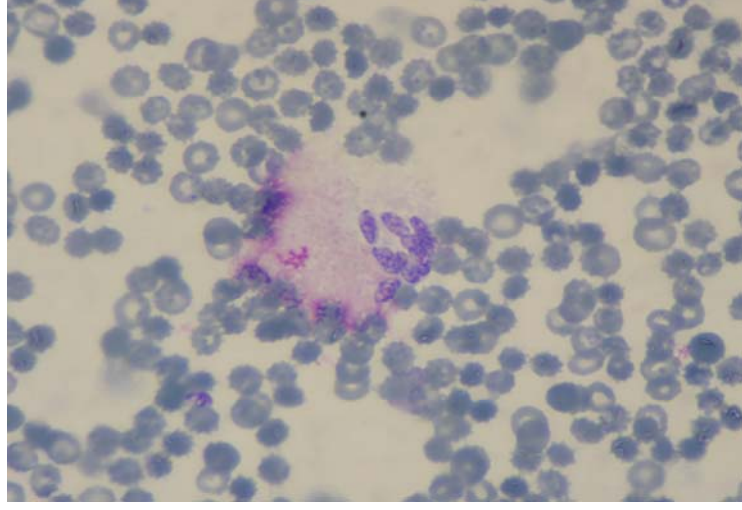
Şekil 14: 529 bazlık ardışık tekrar bölgesi genini hedefleyen TOXO4 – TOXO5 primer çifti ile $1,4 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^7$ takizoid/ml arası 10 kat seri parazit dilüsyonlarından elde edilen 533 baz uzunluğundaki PZR ürünleri. (S: 100 baz merdiven DNA moleküler ağırlık standardı; kulvar 1 – 7: sırasıyla $1,4 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^7$ takizoid/ml yoğunlukta parazit dilüsyonları; NK: PZR negatif kontrol; PK: PZR pozitif kontrol)



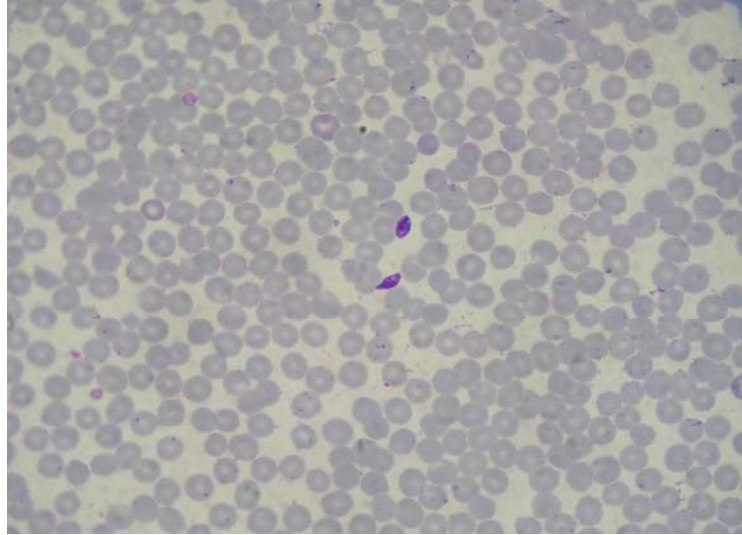
Şekil 15: B1 gen bölgesini hedefleyen B1, B2, B3 ve B4 primer ile $1,4 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^7$ takizoid/ml arası 10 kat seri parazit dilüsyonlarından elde edilen 530 baz uzunluğundaki PZR ürünleri. (S: 100 baz merdiven DNA moleküler ağırlık standardı; kulvar 1 – 7: sırasıyla $1,4 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^7$ takizoid/ml yoğunlukta parazit dilüsyonları; NK: PZR negatif kontrol; PK: PZR pozitif kontrol)

4.6. Kan ve Doku Örneklerinde *T.gondii* Takizoitlerinin Gösterilmesi:

Tüm fare deney gruplarından alınan kan örnekleri Giemsa boyası ile boyanarak *T.gondii* takizoitleri araştırılmıştır (Şekil 16, 17).

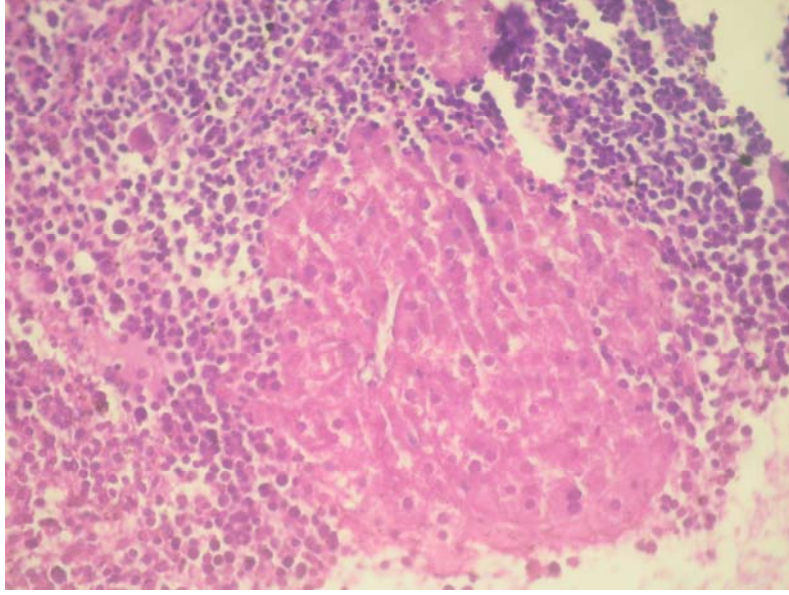


Şekil 16: Enfekte farenin kan örneğinde bir grup *T.gondii* takizoitleri



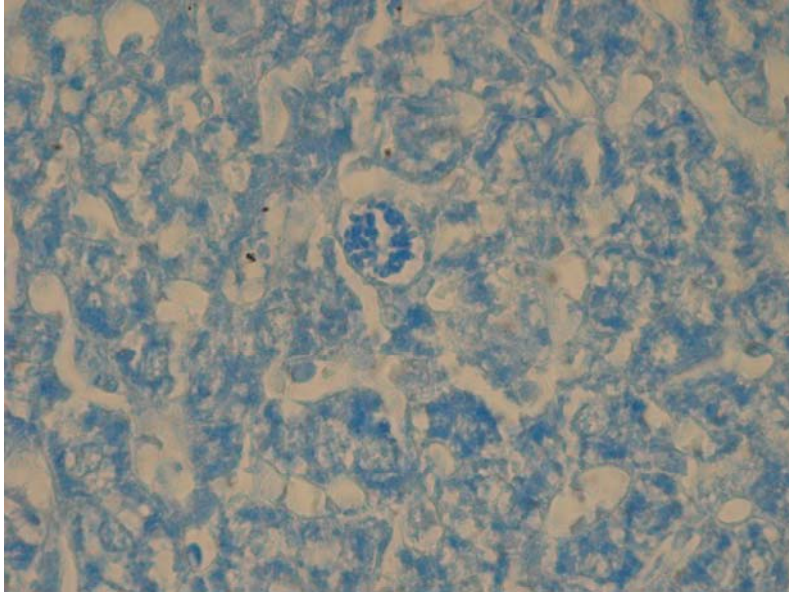
Şekil 17: Enfekte fare kanında *T.gondii* takizoitleri

Toxoplasma gondii'nin dokudaki görünümünü saptayabilmek için örneklerimizden bazıları histopatolojik yöntemlerle incelenmiştir (şekil 18, 19)



Şekil 18: Dalak granülom dokusunun görünümü (Hematoksilen-Eosin Boyası X 100)

(Gazi Üniversitesi – Patoloji Ana Bilim Dalı)



Şekil 19: Karaciğer dokusunda *T.gondii* takizoitleri (Giemsa boyası X 100)

(Gazi Üniversitesi – Patoloji Ana Bilim Dalı)

Çalışmamızda kullanılan 49 farenin kan, idrar ve dışkı örnekleri diğer bağırsak ve doku parazitleri yönünden de konvansiyonel yöntemlerle incelenmiştir. Örneklerin hiç birinde parazit saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Toksoplazmozis, *T. gondii* tarafından oluşturulan dünyanın hemen her tarafında olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır. Dünya erişkin nüfusunun yaklaşık %35-40'ında bulunan bu protozoon hastalığı, değişik klinik bulgularla seyreden bir parazit enfeksiyonudur. İnsana bulaşma daha çok enfekte kedi dışkısı ile kontamine yiyecekler, içecekler ve pişmemiş veya az pişmiş kistli etlerin yenmesi, çiğ yumurta ve çiğ süt içilmesi ile olduğu gibi kan transfüzyonu, organ transplantasyonu ve transplasental yolla da olmaktadır. Serolojik bulgular insanın parazitle temasının yüksek oranda olduğunu gösteriyorsa da hastalık tablosu oldukça düşük orandadır. Primer enfeksiyon, sağlıklı erişkinlerde genellikle asemptomatik seyrederken; nadiren ateş, halsizlik, boğaz ağrısı, baş ağrısı, makülopapüler döküntü ve lenfadenopati ile karakterize bir tablo oluşturur. İmmun yetmezliği olanlarda ağır klinik tablo ile seyreden, bunun yanı sıra gebelerde düşüklere ve erken doğumlara, yeni doğanda ise konjenital toksoplasmoza neden olması ile dikkatleri üzerinde toplayan önemli bir enfeksiyon hastalığıdır³.

Toksoplazmozun tanısı serolojik testler, biyopsi örneklerinin incelenmesi veya parazitin izolasyonuna dayanır. *Toxoplasma gondii* hücre kültürü veya deney hayvanlarında üretilebilmesine karşılık özel laboratuvar koşullarının ve sürekli canlı hayvan sağlanmasının güç olması nedeniyle tanıda temel olarak serolojik testlerden faydalanılmaktadır. En

spesifik referans test olan Dye testi ile IFAT canlı takizoit gerektirmekle birlikte IHA ve ELISA'dan daha duyarlıdır. Enfeksiyon sürecinde kütiküler antijenlere karşı oluşan IgM ve IgG antikorları yükselmektedir. Günümüzde uygulama kolaylığı, maliyeti ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle rutin laboratuvarlarda özgül antikorlar ELISA yöntemiyle çalışılmaktadır. Parazite karşı oluşmuş spesifik IgG ile IgM antikorlarının yanı sıra son yıllarda özellikle IgA, IgE antikorları saptanması ile IgG avidite testleri tanıda kullanılmaktadır. Bununla birlikte IgM antikor düzeyinin iki yıla yakın yüksek saptanabilmesi, ayrıca romatoid faktör ve antinükleer antikor düzeylerindeki yüksekliklerin yanlış pozitifliğe neden olması, spesifik IgM titresindeki yüksekliğin her zaman akut enfeksiyonu ifade etmediğini göstermektedir. Bu dönemde IgA (6-7 ay) ve IgE serokonversiyonu tanıda önem taşımaktadır. Bununla birlikte serolojik testlerin kullanımında spesifik antikorların parazitemiden birkaç hafta sonra yüksekliğinin saptanabilmesi, özellikle konjenital toksoplazmoz açısından gebede hastalığın aktif döneminin belirlenmemesine ve fetusta da hastalık açısından yüksek riskin meydana gelmesine neden olmaktadır. Konjenital toksoplazmoz, diğer yenidoğan enfeksiyonları ile de karışabileceğinden klinik tanısı zordur. Tanıda, anne adaylarının gebelikten önce toksoplazma antikorları bakımından sero-negatifken, gebelik sırasında pozitifleşmesi önemlidir. Ancak gebelik öncesi toksoplazma antikorlarına bakılmayan ya da gebeliğin hemen başlangıcında değil de ilerleyen haftalarda toksoplazmoz yönünden

incelenen gebelerde anti-*T.gondii* IgG antikorlarının pozitif olması, konjenital toksoplazmoz riskini ortadan kaldırmamaktadır. Hasta, etkeni gebelik esnasında almış, fakat tetkik ilerleyen haftalarda yapıldığı için, geçen süre içerisinde IgG antikorları pozitifleşmiş, IgM antikorları hala pozitif ya da negatifleşmiş olabilmektedir. Böylesi durumlarda hastalığın geçirilmiş bir enfeksiyon mu, yoksa akut dönemdeki bir enfeksiyon mu olduğunun ayrımının yapılabilmesine katkıda bulunmak amacıyla, hastada oluşmuş olan IgG antikorlarının avidite değerleri araştırılmaktadır. Gebeliğin ilk aylarında alınan serum örneğinde IgG avidite testi yapılması yararlı olmakla birlikte düşük aviditenin yaklaşık bir yıla yakın süre devam etmesi dezavantajını oluşturmaktadır.

Bağışık yetmezliği olan kişilerde antikor oluşturmama veya düşük titreli antikor oluşturma serolojik tanı yöntemlerinde değerlendirme zorluklarına yol açmaktadır. Bu nedenle alternatif metod olarak fare inokülasyonu veya doku kültürü yapılabilir. Fakat bu yöntemlerin zaman alıcı olması ve uygulama kolaylığının olmaması nedeniyle, enfeksiyonun belirlenebilmesi için hızlı, güvenilir, kantitatif sonuç verebilen testlerin arayışını gündeme getirmiştir. Özellikle doğum öncesinde ve immün sistemi baskılanmış hastalarda toksoplazmoz tanısı için moleküler tanı yöntemleri anlam kazanmaktadır. Vücut sıvısı ve dokularda *T.gondii* DNA'sının tespitine dayanan PZR konjenital, oküler ve dissemine toksoplazmozun tanısında, başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

PZR yöntemi ile, 18 haftalık gebelikte amnion sıvısından konvansiyonel yöntemlere göre çok daha duyarlı ve hızlı tanı sağlanmaktadır. İmmün yetmezlikli hastalarda, önceleri tanısı sadece beyin biyopsisi ile konulabilen toksoplazma ensefalitinin ve oküler toksoplazmozun tanısı PZR ile başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Bununla birlikte SSS enfeksiyonlarının tanısı, yüksek IgG titrelerinin lokal senteze bağlı ortaya çıkabilmesi veya serumdaki IgG'nin zayıf kan- beyin bariyerinden geçişine bağlı olabildiği için kolay olamamaktadır⁷¹.

PZR hızlı tanı sağlayabilme, çalışılan örneklerde mikrogram düzeyindeki DNA miktarlarını saptayabilme özelliği, immün yanıtın bağımsız olarak parazitin örneklerden direkt tespitini sağlaması nedeniyle önem taşımaktadır. İncelenen örneklerle ilgili olarak da PZR yönteminden elde edilen sonuçlar farklı olabilmektedir. Aköz humörün PZR incelemelerinde enfeksiyonun şiddetli olmadığı durumlarda veya posterior segmentte sınırlı olması ya da hastanın anti-toksoplazma tedavisi almış olması sonucunda test negatif çıkabilmektedir^{72, 73}.

PZR yönteminin duyarlılığı; amniotik sıvıda %65 – 80, plasenta örneklerinde %60, BOS'ta %< 17–100, oküler toksoplazmozda aköz humörde %15–53, dissemine toksoplazmozun akciğer tutulumunda BAL incelemelerinde %100 arasında belirtilmiştir⁷⁴.

Moleküler yöntemler suşların genotiplerinin belirlenmesinde ve bu genotipler ile hastalığın bulgu ve semptomları arasındaki ilişkinin incelenmesinde yararlıdır. Yapılan genotiplendirme çalışmalarında *T.gondii*'nin üç genotipi belirlenmiş ve insanda genotip I'in en sık görüldüğü ve hastalık oluşturduğu saptanmıştır. Moleküler tanıda gerçek zamanlı PZR duyarlı ve kantitatif sonuç vermesi nedeniyle birçok rutin laboratuarda kullanılmaktadır. Kabul edilmiş standart bir yöntemin bulunmaması moleküler testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün konvansiyonel metodlarla (serolojik testler, hücre ve hayvan inokülasyonu) karşılaştırılmasını mümkün kılmamaktadır^{13, 74}.

Toksoplazmozun moleküler biyolojisinin tam olarak çözülmemesinin nedeni, yapılan çalışmalarda sadece birkaç potansiyel DNA hedefinin belirlenmesidir. Farklı çalışma grupları tarafından yapılan araştırmalarda, farklı gen bölgeleri için farklı primerler tasarlanmış ve iki turlu PZR yöntemi ile çalışma sonuçları arasında farklılıklar saptanmıştır. Toksoplazmada tanı ve araştırma amacıyla PZR yönteminde kullanılan çeşitli DNA hedef bölgeleri bulunmaktadır. Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen, günümüzde yaygın olarak kullanılan ve 35 kez tekrarlayan B1 geni, sadece bir kopyadan oluşan *T.gondii* takizoitlerinin majör yüzeysel antijeni kodlayan ve yaygın olarak kullanılan P30 (SAG1) geni, 110 kopyadan oluşan ribozomal ribonukleik asit (rRNA) geni, yine tek kopyadan oluşan α tubulin ve β tubulin genleri de hedef olarak

kullanılmıştır. *T.gondii*'nin kodlama yapmayan tekrarlanan TGR1_E geni de bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır^{13, 74, 75}. Homan ve ark. 2000 yılında 200–300 kez tekrarlayan 529 bç ardışık tekrar bölgesi genini tanımlamışlar ve bu gen bölgesinin B1 gen bölgesine göre daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir¹⁴.

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda özellikle az sayıda parazitle enfekte olan farelerde histolojik tanının negatif olduğu saptanmıştır. Fare beyinde kistlerin görülebilmesi için 40 gün geçmesi gerektiği bildirilmiştir. Bununla birlikte takizoitler periton sıvısında inokülasyondan 3–4 gün sonra belirlenebilmektedir¹¹. Çalışmamızda, 0,1 mililitrede 50,000 takizoit ile enfekte edilen farelerin çeşitli organlarında oluşan patolojik lezyonlar en iyi enfeksiyonun 96'ncı saatinde makroskobik olarak gözlenmiştir⁶⁹. Beyinlerinde 96'ncı saatte kanama odakları saptanmıştır (Şekil 4). Kontrol grubuna göre, enfekte edilen farelerin dalağında büyüme, enfeksiyonun 96'ncı saatinde ve özellikle dalağın orta kısmında kanama ve nekroz gözlenmiştir (şekil 6). Enfeksiyonun 96'ncı saatinde enfekte farelerin karaciğerlerinin renginin koyulaştığı, hemorajik olduğu ve hepsinde safra kesesinin siyahlaştığı ve küçüldüğü saptanmıştır (Şekil 8) Ancak, karaciğer, beyin, dalak örneklerinin histopatolojik incelemesinde 96'ncı saatte karaciğerde takizoitler ve dalakta granülom yapıları saptanmıştır (Şekil 18 ve 19). Tüm

gruplarda kan örneklerinin Giemsa boyası ile hazırlanan preparatlarının mikroskopik incelemelerinde takizoitler görülmüştür (şekil 16, 17).

Çalışmamızın başında, moleküler yöntemlerden PZR'nin tanıdaki değerini incelerken *T.gondii* DNA'sı ile çapraz reaksiyona neden olabilecek diğer parazitlerin varlığının araştırılması amacıyla, deneye alınan 49 farenin kan, idrar ve dışkı örnekleri konvensiyonel yöntemlerle incelenmiştir. Örneklerin hiç birinde diğer kan ve doku parazitlerine rastlanmamıştır.

Kedi ve köpeklerin çeşitli örneklerinde *T.gondii* DNA'sı B1 gen bölgesine özgü primerler kullanılarak PZR yöntemi ile araştırıldığında, kan örneklerinden elde edilen sonuçların (100 takizoit) diğer vücut sıvılarına göre (10 takizoit) duyarlılığının daha az olduğu saptanmıştır^{1, 52}. Düşük yapmış koyunların plasental örneklerinde 10 parazit belirleyebildiği, aynı zamanda bu sonuçların fare inokülasyonu ile de doğrulandığı belirtilmiştir¹¹. Bununla birlikte gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak az sayıdaki *T.gondii* DNA'sı (bir bradizoitinkine eşdeğer 0,1 pg *T.gondii* genomik DNA'sı) belirlenebilmekte ve kantitasyonu yapılabilmektedir. Gerçek zamanlı PZR ile farede oluşturulmuş serebral toksoplazmoz modelinde bu B1 gen bölgesi ile 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni karşılaştırıldığında, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin on kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. B1 geniyle 200 fg genomik DNA belirlenirken

529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile 20 fg genomik DNA belirlenmiştir¹⁴. Çalışmamızda da B1 geni ile en az $1,4 \times 10^4$ takizoit/ml saptarken, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin en az $1,4 \times 10^2$ takizoit/ml saptayabildiği tespit edilmiştir (Tablo 15).

B1geni kullanılarak yapılan PZR çalışmalarında, bu testin hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğu ancak testin tekrarlanabilirliğinde yeterli miktarda örnek alınmasının önemli olduğu, sıvı örneklerin en az 2 ml, doku örneklerinin de en az 10 mg olmasının gerektiği belirtilmiştir⁶².

Farklı gen bölgelerinin duyarlılıklarının karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada, aköz humörde *T.gondii*'nin belirlenmesinde PZR yöntemiyle B1 (nested-PZR), P30 (nested-PZR) ve 18S rDNA genleri kullanılmış, B1 geninin P30 ve rDNA'ya göre 20 kat daha fazla genomik *T.gondii* DNA'sı belirlediği saptanmıştır⁵¹.

Toxoplasma gondii ile enfekte farelerde PZR yöntemi, yakalama (capture) ELISA ve 'immunoblotting' yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada periton içine 5×10^3 trofozoit enfekte edilen farelerin serumlarında 3-15'inci saatlerde üç metodla da enfeksiyonun belirlenemediği, PZR ile 18'inci saatte beş hayvanın üçünde ve 1-7'inci günlerde tüm hayvanlarda etkenin tanımlandığı, diğer yöntemlerde etkenin ancak 1-7'inci günler arasında tanımlanabildiği belirtilmiştir⁷⁶. Paugam ve

ark. B1 ve TGR 1_E genini kullanarak oral olarak infekte ettikleri farelerin kanlarından enfeksiyonun 2-21'inci günlerinde DNA saptadıklarını, hücre kültürlerinde ise bu süre boyunca üreme saptamadıklarını belirtmişlerdir⁷⁷. Weiss ve ark.nın RH suşuyla farelerde oluşturduğu akut enfeksiyon modelinde P30 geni ile dokulardan enfeksiyonun 2'inci gününde, kandan 5'inci günde DNA izolasyonu yapılmıştır. PZR yöntemi ile 10 parazite kadar belirleyebilmişlerdir⁶⁹. Çalışmamızda hem B1 geni hem de 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile enfeksiyonun birinci gününden itibaren kan, beyin, karaciğer ve dalak örneklerinde *T.gondii* DNA'sı belirlenebilmiştir.

Wastling ve ark. tarafından koyunlarda subkutanöz olarak *T.gondii* S48 suşuyla oluşturulan hayvan modelinde B1 ve P30 gen bölgelerinin kullanıldığı PZR yöntemi, fare inokülasyonu ile karşılaştırılmış, koyunların kan ve lenf sıvıları alınarak incelenmiştir. B1 geni, P30 genine göre daha duyarlı olarak bulunmuş ve bu sonuç fare inokülasyonu ile uyum göstermiştir. P30 geninin B1 genine göre yanlış negatifliğinin iki kat fazla olduğu saptanmıştır. Fare inokülasyonuna göre yanlış pozitifliğin görülmesi ise fare inokülasyonunda canlı olmayan takizoitlerin saptanma imkanının olmamasına bağlanmıştır⁷⁸.

Nguyen ve ark. çalışmalarında virulansı yüksek RH suşu ile enfekte farelerin idrar ve kanlarında enfeksiyonun 24–94'üncü saatleri arasında P30 geniyle *T.gondii* DNA'sı belirlenmiş fakat beyinde saptanamamıştır. PZR yöntemi ile MRC5 fibroblastlarını içeren hücre kültürü sonuçlarının uyumlu olduğu belirtilmiştir⁷⁹. Bizim çalışmamızda ise beyinde 24 saate *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır.

Garcia ve ark. tarafından domuzlarda *T.gondii* VEG suşu tarafından oluşturulan modelde ise infeksiyonun 60'ıncı gününde alınan beyin dokusu ile kalp, dil ve diyafram gibi kas dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanılarak yaptıkları PZR yöntemi ile fare inokülasyonu ve histopatolojik incelemeyi karşılaştırmışlar, histopatolojik olarak tüm dokularda negatif sonuç elde ederken, fare inokülasyonunun, PZR yöntemine göre, daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Bu durumun takizoitlerin dokularda heterojen olarak bulunmasından kaynaklandığını, takizoit dilüsyonlarında PZR yönteminin duyarlılığının yüksek olduğunu belirlemişlerdir⁸⁰. Bununla birlikte domuzlarda yapılan diğer bir çalışmada, B1 geniyle çalışılan iki türlü PZR yönteminin fare inokülasyonuna göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır⁸¹.

Filisetti ve ark. konjenital toksoplazmoz şüphesiyle izlenen yenidoğanların kordon kanı ile amniotik sıvı örneklerinde 18SrDNA, B1, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile PZR yönteminde ve fare inokülasyonu sonucunda 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin B1 genine göre duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olarak saptanmış ve fare inokülasyonu ile birebir uyum gösterdiği belirlenmiştir¹⁰.

Reaktif toksoplazmozlu 30 organ alıcısının kanlarında B1geni ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi genini gerçek zamanlı PZR yöntemiyle karşılaştırıldığında, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin tek bir

genomu belirlediği halde (80fg DNA), B1 geni ile on parazit genomunun (800fg DNA) belirlenebildiği saptanmıştır. Aynı zamanda 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile 0,8 fg'a kadar DNA saptama kapasitesinin olduğu belirlenmiştir⁸². Gerçek zamanlı PZR yönteminin hızlı, duyarlı ve kantitasyon özelliğinin olması *T.gondii* tanısında sık kullanılmasının nedeni olmaktadır. Yapılan çalışmalarda 0,05 parazit/reaksiyon düzeyinde DNA belirlenebilmesi duyarlılığın yüksek olduğunu göstermektedir⁸³. Cassaing ve ark. amniotik sıvı, plasenta, aköz hümor, kan, serebrospinal sıvı, bronkoalveolar sıvı örneklerinde B1 ve 529 bç ardışık tekrar bölgesi genini gerçek zamanlı PZR yöntemini kullanarak karşılaştırmışlar, amniotik sıvı örneklerinde daha belirgin olmak üzere tüm örneklerde 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir⁸⁴.

Gebelerde primer akut toksoplazmoz tanısında doğrulayıcı testlerin kullanılması, özellikle anneden fetüse geçiş için riskli görülen gebeliklerde spesifik serolojik testlerle PZR yönteminin birlikte kullanılması önerilmektedir. Gebeliğin ilk yarısında IgG pozitifliği ile PZR pozitifliğinin olması yakın zamanda geçirilen bir enfeksiyon şeklinde yorumlanabilmekle birlikte, sadece serolojik pozitiflik olması, enfeksiyon açısından gebelik süresince artan antikor titrasyonunun takip edilebilmesine bağlı olduğundan yorum yapmak güç olmaktadır⁸⁵.

Serebral toksoplazmozun tanısında PZR pozitifliği ve yüksek titrede IgG tespit edilmesinin tanıda değerli olmasının yanında invaziv yaklaşımları önlemesi açısından da yeni ve faydalı bir tanı protokolü oluşmasına neden olmaktadır. Colombo ve ark. serebral toksoplazmozlu AIDS hastalarının kan örneklerinde PZR yönteminin duyarlılığını %80, özgüllüğünü %98 olarak belirlemişlerdir. BOS örneklerinde yapılan çalışmalarda PZR yönteminin duyarlılığı %11,5–100, özgüllüğü %96–100 arasında tespit edilmekle birlikte, invaziv yöntem uygulanması nedeniyle BOS örneklerinde çalışmanın avantajlı olmadığı ve elde edilen sonuçların kan ile elde edilen sonuçlarla uyum gösterdiği belirtilmektedir⁹.

Çalışmamızda enfeksiyondan 24 saat sonra B1 primerleri kullanılarak iki türlü PZR yönteminde, toplam 10 hayvanın üçünün kan örneğinde, üçünün beyin örneğinde, üçünde karaciğer örneğinde, dördünün ise dalak örneğinde pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo 5) 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni primerleri kullanılarak çalışılan PZR yönteminde ise enfekte edilen toplam 10 fareden üçünün kan örnekleri, üçünün beyin örnekleri, yedi farenin karaciğer örnekleri ve üç farenin dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 9). Enfeksiyondan 48 saat sonra B1 primerleri kullanılarak iki türlü PZR yönteminde 10 farenin beşinde kan örnekleri, altı farenin beyin örnekleri, sekiz farenin karaciğer örnekleri ve altı farenin dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 6) 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile genel olarak tüm örneklerde pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur.

On fareden 9'unun kan örnekleri, yedi farenin beyin örnekleri, sekiz farenin karaciğer örnekleri ve dokuz farenin dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 10). Enfeksiyondan 72 saat sonra B1 primerleri kullanılarak iki türlü PZR yönteminde sekiz farenin kan örnekleri, altı farenin beyin örnekleri, dört farenin karaciğer örnekleri ve sekiz farenin de dalak örnekleri pozitif bulunmuştur (Tablo 7). 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile 13 farenin 11'inde *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır. Yedi farenin beyin örnekleri, 11 farenin karaciğer örnekleri ve 11 farenin dalak örnekleri pozitif bulunmuştur. Bu grupta 13 fare çalışılmıştır, ancak sonuçlar 10 fare üzerinden değerlendirilmiştir (Tablo 11) Enfeksiyondan 96 saat sonra B1 primerleri kullanılarak iki türlü PZR yönteminde, sekiz farenin kan örneklerinde, beş farenin beyin örneklerinde, altı farenin karaciğer örnekleri ve sekiz fareninde dalak örneklerinde *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır (Tablo 8). 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile 10 fareden oluşan bu grubun tüm kan, beyin, karaciğer ve dalak dokularında 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni kullanarak yapılan konvansiyonel PZR yöntemi ile *T.gondii* DNA'sı saptanmıştır. En yüksek pozitiflik oranı bu grupta elde edilmiştir (Tablo 12 ve Şekil 12, 13).

Çalışmamızda 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin B1 geninden 100 kat daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *T.gondii* DNA'sının her iki gen bölgesi ile enfeksiyonun ilk gününden itibaren belirlenebildiği, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile daha çok sayıdaki örnekte pozitiflik

saptandığı belirlenmiştir. Kan, beyin, karaciğer örneklerinde 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile saptanan pozitiflik oranını B1 gen bölgesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak tespit edilmiştir. Dalak örneklerinde ise her iki gen bölgesinin pozitiflik saptama oranları istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

Moleküler testler, toksoplazmozun tanısında kullanılan serolojik, histopatolojik, hücre kültürü ve hayvan inokülasyonu testlerine göre, kısa zamanda sonuç vermesi, duyarlılığının yüksek olması ve immün sistemden bağımsız olarak değerlendirilebilmesi nedeniyle, tanının bu yönde de geliştirilebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda, 0,1 mililitrede 50.000 takizoit ile enfekte edilen farelerin çeşitli organlarında oluşan patolojik lezyonlar en iyi enfeksiyonun 96'ıncı saatinde makroskopik olarak gözlenmiştir. Beyinlerinde 96'ıncı saatte kanama odakları, dalağında büyüme, kanama ve nekroz, karaciğerde renk koyulaşması, hemoraji, safra kesesinde siyahlaşma ve küçülme saptanmıştır. Ancak, karaciğer, beyin, dalak örneklerinin histopatolojik incelemesinde 96'ıncı saatte yalnızca karaciğerde takizoitler ve dalakta granülom yapıları görülmüştür. Tüm gruplarda ise kan örneklerinin Giemsa boyası ile hazırlanan preparatlarının mikroskopik incelemelerinde takizoitler bulunmuştur.

Çalışmamızda B1 primerleri kullanılarak yapılan iki türlü PZR yönteminde, tüm hayvanların kan, beyin, karaciğer, dalak örneklerinde toksoplazma DNA'sı saptanmıştır. Enfeksiyonun 96'ıncı saatinde saptanan band sayısı diğer saatlere göre çok daha fazla olmuştur. 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni primerleri kullanılarak çalışılan konvensiyonel PZR yönteminde ise enfekte edilen tüm farelerin kan, beyin, karaciğer, dalak örnekleri de pozitif sonuç vermiştir. Bu primerle, özellikle enfeksiyonun 96'ıncı saatindeki örneklerin tümünde, toksoplazma DNA'sı gösterilmiştir. En yüksek pozitiflik oranı bu grupta elde edilmiştir.

Çalışmamızda 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin B1 geninden 100 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *T.gondii* DNA'sının her iki gen bölgesi ile enfeksiyonun ilk gününden itibaren gösterilebildiği, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile daha çok sayıdaki örnekte pozitiflik saptandığı belirlenmiştir. Kan, beyin, karaciğer örneklerinde 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile saptanan pozitiflik oranı, B1 gen bölgesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Dalak örneklerinde ise her iki gen bölgesi primerlerinin pozitiflik saptama oranları istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çalışmamızda B1 gen primeri ile en az $1,4 \times 10^4$ takizoit/ml saptarken, 529 bç ardışık tekrar bölgesi gen primerinin en az $1,4 \times 10^2$ takizoit/ml saptayabildiği tespit edilmiştir.

Moleküler testlerden PZR yöntemi, toksoplazmozun tanısında kullanılan serolojik, histopatolojik, hücre kültürü ve hayvan inokülasyonu testlerine göre, kısa zamanda sonuç vermesi, duyarlılığının yüksek olması ve immün sistemden bağımsız olarak değerlendirilebilmesi ve konvansiyonel yöntemlere yardımcı olması nedeniyle rutinde uygulanabilir bulunmuştur.

7. ÖZET

Apicomplex gurubundaki *Toxoplasma* cinsinin insan, diğer memeliler ve kanatlılarda yerleşip hastalık etkeni olabilen tek türü *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*)'dir. Primer enfeksiyon başlangıçta genellikle subkliniktir. Enfekte kişilerin çoğu asemptomatik kalırlar. Bazılarında ise hafif belirtiler ortaya çıkar. Bununla beraber morbidite ve mortiliteye neden olabilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ise, latent enfeksiyonun reaktif olması ensefalit, oküler toksoplazmoz gibi hastalıklara neden olur. Primer maternal toksoplazmoz enfeksiyonu fetüse geçme riski taşır. Bu da konjenital toksoplazmoza yol açar. Serolojik tanı yöntemleri ile doğum öncesi ve immün sistemi baskılanmış hastalarda toksoplazmoz tanısını koymak kolay olmamaktadır. Bu gibi durumlarda moleküler tanı yöntemleri önem kazanır ve bu tür hastalarda, hastanın immünolojik durumundan bağımsız olarak tanı konulabilmektedir. Bu yüzden *T.gondii* için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi değerli bir alternatif yöntem olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda 10'ar fareden 4 grup oluşturulmuş ve tüm bu fareler intraperitoneal yolla 50,000 *T.gondii* RH suşunun takizoiti ile enfekte edilmiştir, ayrıca çalışmaya 6 fareden oluşan bir kontrol grubu da alınmıştır. Daha sonra farelerin kan, karaciğer, beyin ve dalak dokularından enfeksiyonun 24'üncü, 48'inci, 72'inci ve 96'ıncı saatlerinde örnekler alınmıştır. Patolojik lezyonlar en iyi enfeksiyonun 96'ıncı saatinde

makroskobik olarak gözlenmiştir. Tüm grupların kan örneklerinde Giemsa boyası ile hazırlanan preparatlarında takizoitler saptanmıştır. Doku ve kan örneklerinin DNA ekstraksiyonları B1 gen bölgesi için iki türlü PZR ile, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni için konvansiyonel PZR ile çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hem B1 gen bölgesi genine, hemde 529 bç ardışık tekrar bölgesi genine ait bandlar enfeksiyonun 24'üncü saatinden itibaren tüm örneklerde genel olarak elde edilmiştir. Ancak 529 bç ardışık tekrar bölgesi geninin daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda B1 geni ile en az $1,4 \times 10^4$ takizoit/ml saptarken, 529 bç ardışık tekrar bölgesi geni ile en az $1,4 \times 10^2$ takizoit/ml saptanabildiği ve bu gen bölgesinin 100 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; deneysel fare toksoplazmozunda, PZR yönteminin kısa zamanda hızlı sonuç vermesi, duyarlılığının yüksek olması ve immün sisteminden bağımsız olarak değerlendirilebilmesi nedeniyle toksoplazmoz tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemlere yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır. Çalışmamızda kullanılan primerlerden 529bç ardışık tekrar bölgesi gen primeri B1 gen bölgesi primerinden daha duyarlıdır.

8. SUMMARY

DETECTION OF TOXOPLASMOSIS IN BLOOD AND TISSUE SAMPLES OF EXPERIMENTALLY INFECTED MICE, BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Toxoplasma gondii is the only species of *Toxoplasma* genus which able to infects human and winged and other mammalian. The primary infection is generally subclinical. The majority of infected population remains asymptomatic, but some patients present mild symptoms. However, the infection can cause morbidity and mortality. The reactivation of the latent infection cause ocular toxoplasmosis and encephalitis in immunocompromised patients. Primary maternal toxoplasmosis exposes the risk of transmission of the fetus leading to congenital toxoplasmosis. Serological diagnosis can be difficult in the immunodeficiency or in the pregnancy. The use of molecular techniques in these group of patient gain importance particularly. Because molecular techniques are not affected from the immune status of the patients. Thus, polymerase chain reaction (PCR) consider a valuable alternative for the diagnosis of toxoplasmosis.

In our study, four groups of mice including 10 mice in each of these groups, were infected with 50.000 tachyzoites of *S. m.* Brain, liver, spleen and blood samples were obtained from infected mice at 24, 48, 72 and 96 hours of infection. Pathologic lesions were best visualised

macroscopically and microscopically at 96 hours of infection. DNA were isolated from blood and tissue samples. The extracted DNA were amplified with B1 gene specific primers by using a nested PCR protocol. Comparatively, 529 bp repeatative element were also amplified by using a single step PCR. PCR products of B1 gene and the repeatative element of 529 bp were both detected in tissue samples of the mice after 24 hours of infection. Detection limit was $1,4 \times 10^4$ tachyzoites/ ml by using B1 primers, which it was $1,4 \times 10^2$ tachyzoite/ ml by using primers selected from repeatative element. Thus, repeatative element detection by PCR was found to be more (100 fold) sensitive than B1 detection.

As a result of our study, PCR was evaluated as a rapid, highly sensitive method which is not affected from the immune system of the patient. For these reasons, this method can be used as a complementary method with conventional methods in the diagnosis of toxoplasmosis.

Thus, repeatative element primer detection by PCR was found to be more sensitive than B1 gene primer detection.

9. KAYNAKLAR

1. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. İkinci baskı. Sivas: Es-Form Ofset Ltd. Şti; 2002.
2. Schwartzman JD, Toxoplasmosis. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. Principles and Practice of Clinical Parasitology. Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 2001.p.113-38.
3. Garcia L. Diagnostic Medical Parasitology. 4th ed.. California: ASM Pres; 2001.
4. Altıntaş N, Yolaşığmaz A, Yazar S, Şakur N, Kitapçıoğlu G. İzmir ve çevresindeki yerleşim bölgelerinde yaşayan insanlarda *Toxoplasma* antikorlarının araştırılması. T Parazitol Derg 1998; 22: 229–232.
5. Tanyüksel M, Guney C, Araz E, Saracli MA, Doganci L. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. J Microbiol 2004; 42: 211–15.
6. Kaleli B, Kaleli İ, Aktan E, Akalın H, Akşit F: Gebelerde Toxoplasma IgG ve IgM seropozitifliği. T Parazitol Derg 1997; 21: 241–43.

7. Türk M, Güngör S, Bayram D, Bilgin N, Er H, Kurultay N, Türker M. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne bir yılda başvuran toksoplasmosis şüpheli hastaların ELISA yöntemiyle taranması. T Parazitol Derg 2004; 28(2): 80–2.
8. Özçelik S, Poyraz Ö, Güler H, Saygı G. Düşük, ölü doğum ve anormal doğum yapan kadınlarda *Toxoplasma gondii* IgG ve IgM antikorlarının varlığının araştırılması, T Parazitol Derg 1996; 20(2): 159–62.
9. Colombo F, Vidal J, Oliveira A, Hernandaz A, Filho F, Nogueira R, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples, J Clin Microbiol 2005; 43(10): 5044– 47.
10. Filisetti D, Gorcii M, Marino E, Villard O, Candolfi E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR, J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4826– 8.
11. Piergili Fioretti D. Problems and Limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. Parassitologia 2004; 46(1–2); 177–81.

12. Karagenç T, Ertabaklar H, Ulutaş B, Aypak S, Ertuğ S. Aydın yöresindeki sığırlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. YYÜ Vet Fak Derg 2005; 16(1); 67–70.
13. Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnosis for *Toxoplasma gondii* infections. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 170- 6.
14. Homan W, Vercammen M, Braekeleer J, Verschueren H.: Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR, Int J Parasitol. 2000;.30: 69-75.
15. Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology and Immunology. 4th ed. Samford: Appleton and Lange; 1996.p. 276-77.
16. Black M, Boothroyd J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(3): 607–23.
17. Kook J, Lee H, Kim B, Yun C, Guk S, Seo M, et al. *Toxoplasma gondii* antibody titers in sera of children admitted to the Seoul National University Children's Hospital. Korean J Parasitol.1999; 37(1):27–32.

18. Altıntaş K. Tıbbi Parazitoloji. İstanbul: Kozan Ofset Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
19. Çetin ET, Anđ Ö, Töreci K. Tıbbi Parazitoloji. Beşinci baskı. İstanbul: İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi; 1995.
20. Kuman HA, Altıntaş N, Üstün Ş, Gürüz AY. Toksoplazmoz. İçinde; Özcel MA, editör. İmmün Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. Bornova- İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1995.p. 121-135.
21. Mete M. Toxoplasma gondii. İçinde: Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.p. 1231-34.
22. Dubey J, Lindsay D, Speed C. Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2): 267-99.
23. Biesiada G, Kalinowsk-Nowak A, Czepiel J, Mach T. Toxoplasmosis epidemiology, clinical manifestation and infection in pregnant women Int J Parasitol 2006; 36(13):1373- 82.

24. Lucas S, Hagiwara M, Loureiro V, Ikesaki J, Birgel E. *Toxoplasma gondii* Infection in Brazilian Domestic Outpatient Cats. Rev Inst Med Trop. S Paulo 1999; 41(4): 221- 4.
25. Dumetre A, Darde M. How to detect *Toxoplasma gondii* oocyst environmental samples?. FEMS Microbiol Rev 2003; 27: 651- 61.
26. Arkush K, Miller M, Leutenegger C, Gardner IA, Packham A, Heckeroth A, Tenter AM, et al. Molecular and Bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Int J Parasitol 2003; 33: 1087- 97.
27. Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* for cats. J Parasitol 1996; 82: 957–61.
28. Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. Journal of Parasitology 1989; 75: 750- 5
29. Dubey JP. Tachyzoite- induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats Dergi J Parasitol 2002; 88(4): 713–17.

30. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 634- 40.
31. Dubey JP, Lappin M. Toxoplasmosis and Neosporosis. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Grene CE, ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.p. 493–509.
32. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64(3): 607–23.
33. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans.Int J Parasitol 2000;30:217-58.
34. Gajadhar AA, Scandrett WB, Forbes LB. Overview of food- and water-boren zoonotic parasites at the farm level. Rev Sci Tech 2006; 25(2): 595-606.
35. Powell CC, Brewer M, Lappin MR. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. Vet Parasitol 2001; 102(1–2): 29–33.

36. Öncel T, Vural G, Babür C, Kılıç S. Detection of *Toxoplasmosis gondii* Seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman Dye Test and Latex Agglutination Test. T Parazitol Derg 2005; 29(1): 10–12.
37. Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. Mechanical trasmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. Vet Parasitol 1997; 73(1–2): 27–33.
38. Dubey J.P. Servival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0,85–6% NaCl solution at 4–20 C. J Parasitol 1997; 83(5): 946- 9.
39. Hill D, Benedetto SM, Coss C, Mccary JL, Fournet VM, Dubey JP. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. J Food Prot 2006; 69(8): 1961- 5.
40. Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of hight temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J Parasitol 1990; 76(2): 201- 4.
41. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study, BMJ 2000; 321: 142- 7.

42. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363: 1965- 76.
43. Nishiya K, Norose K, Aosai F, Chen M, Mun HS., Kang HK, et al. Heat stress-induced modulation of host defense against *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Parasitol 2005; 91(3): 702- 6.
44. Kankova S, Sulc C, Nouzova K, Fajfrlik K, Frynta D, Fleqr J. Women infected with parasite *Toxoplasma* have more sons. Naturwissenschaften 2007; 94(2): 122-7.
45. Nimri L, Pelloux H, Elkhatib L. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA Specific Antibodies in High-Risk Pregnant Women. Am J Trop Med Hyg 2004; 71(6): 831- 5.
46. Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis. Obstet Gynecol Surv 2001; 56(5): 296–305.
47. Furuta T, Kikuchi T, Akira S, Watanabe N, Yoshikawa Y. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. Int Immunol 2006; 18: 1655- 62.

48. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. JID 2002; 185: 73–82.
49. Derouin F, Mazon MC, Garin YJ. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 1987; 25(9):1597–1600.
50. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. ikinci baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
51. Jones C, Okbravi N, Adamson P, Tasker S. Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30, and 18S r DNA Genes of *T.gondii* in Aqueous Humor. IOVS 2000; 41(3): 634–644.
52. Stiles J, Prade R, Grene C. Detection of *Toxoplasma gondii* in feline and canine biological samples by use of the polymerase chain reaction. Am J Vet Res 1996; 57(3): 264- 7.
53. Macpherson MM, Gajadhar AA. Sensitive and Specific Polymerase Chain Reaction Detection of *Toxoplasma gondii* For Veterinary and Medical Diagnosis. Can J Vet Res 1993; 57: 45- 8.

54. Burney DP, Chavkin MJ, Dow SW, Potter TA, Lappin MR. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* within aqueous humor of experimentally-inoculated cats. *Vet Parasitol* 1998; 79: 181- 6.
55. Guy EC, Pelloux H, Lappalainen M, Aspöck H, Hassl A, Melby KK, et al. Interlaboratory comparison of polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA added to samples of amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15(10): 836- 9.
56. Cingolani A, De LA, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, et al. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J Med Microbiol* 1996; 45(6): 472- 6.
57. Van De Ven W, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* Infections by B1 Gene Amplification. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2120- 4.
58. Bretagne S, Costa JM, Fleury-Feith J, Poron F, Dubreuil-Lemaire ML, Vidaud M. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6): 1662– 4.

59. Lamoril J, Molina JM, Gouvello A DE, Garin YJ, Deybach JC, Modaï J, Derouin F. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. J Clin Pathol 1996; 49(1): 89–92.
60. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. J Clin Microb 1995; 33(9):2421- 6.
61. Ho-Yen DO, Joss AW, Balfour AH, Smyth ETM, Baird D, Chatterton JMW. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. J Clin Pathol 1992; 45: 910-3.
62. Jalal S, Nord C, Lappalainen M, Evengard B. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 937- 9.
63. Özcel MA, Altıntaş N. Parazit Hastalıklarında Tanı. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1997.
64. Bahar H, Karaman M, Kırdar S, Yılmaz Ö, Celiloğlu M, Mutlu D. Gebelikte Toxoplasmosis Tanısında Anti- *Toxoplasma gondii* IgM, IgG,

IgA Antikor ve IgG Avidite Testlerinin Birlikteliği ve Önemi. T Parazitoloj Derg 2005; 29(2): 76–9.

65. Many A, Koren G. Toxoplasmosis during pregnancy. CFP 2006; 52: 29–32.

66. Yeğen BC, Gören MZ. Editörler. Biomedikal Araştırmada Deney Hayvan “Temel Bilgiler ve Etik İlkeler”. İstanbul: Yüce a.ş. tavsallı matbası; 2005.

67. Dolapçı İ. İn vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. İçinde: Tekeli A, Ustaçelebi Ş, editörleri. Moleküler Mikrobiyoloji-Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.s.50.

68. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis. JID 2001; 184. 633- 9.

69. Weiss L, Udem S, Salgo M, Tanowitz H, Wittner M. Sensitive and Specific of Toxoplasma DNA in an Experimental Murine Model: Use of Toxoplasma gondii-Specific cDNA and the Polymerase Chain Reaction. JID 1991; 163: 180- 6.

70. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Pres; 2001.
71. Araz RE, Babür C, Tanyüksel M. Toksoplasmosis tanısında kullanılan test kitlerinin (ELISA, IFA) hazırlanması, PCR kullanımının geliştirilmesi. T Parazitol Derg 2004; 24 (4): 337- 42.
72. Kurdova R, Krüger D, Janitschke K. Polymerase chain reaction (PCR) in the laboratory diagnosis of acut toxoplasmosis. Exp Pathol Parasitol 1998; 1: 55–61.
73. Minotti J, Vlela G, Romand S, Garin YJF, Ades L, Glukman E, et al. Comparison of PCR- Enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. J Clin Microbiol 2003; 41(11): 5313-531.
74. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans Roy Soci Trop Med Hyg 2002; 96: 205- 15.
75. Langohi H, Das Dores CB, Silva RC, Pezerico SB, Castro PB, Da Silva AV. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in sera samples of mice experimentally infected. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2006; 12(2): 202- 14.

76. Hafid J, Flori P, Raberin H, Tran Manh Sung R. Comparison of PCR, capture ELISA and immunoblotting for detection of *Toxoplasma gondii* in infected mice. J Med Microbiol 2001; 50: 1100– 4.
77. Paugam A, Dupouy-Camet J, Sumuyen MH, Romand S, Lamoril J, Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. Parasite 1995; 2(2):181- 4.
78. Wastling JM, Nicoll S, Buxton DJ. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. Med Microbiol 1993; 38(5): 360- 5.
79. Nguyen TD, De Kesel M, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. Clin Diag Lab Immunol 1996 ; 3(6): 635- 9.
80. Garcia JL, Gennari SM, Machado RZ, Navarro IT. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. Exp Parasitol 2006; 113(4): 267- 71.

81. Yai LEO, Vianna MCB, Soares RM, Cortez A, Freire RL, Richtzenhain LJ, et al. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. Braz J Vete Research Anim Sci 2003; 40: 227–34.
82. Edvinsson B, Lappalainen M, Evengard B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin Microbiol Infec 2006; 12(2): 131–136.
83. Lin M, Chen T, Kuo T, Tseng C, Tseng CC. Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 2000; 38(11): 4121- 5.
84. Cassaing S, Bessieres MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 720– 4.
85. Nimri L, Pelloux H, Elkhatib L. Detection Of *Toxoplasma Gondii* DNA And Specific Antibodies In High-Risk Pregnant Women. Am J Trop Med Hyg 2004; 71(6): 831- 5.

10.ÖZGEÇMİŞ:

Adı: Muhammad-Y-

Soyadı: Noral-Din

Doğum Yeri ve Tarihi: Kerkük 15.01.1980

Eğitimi:

Lisans: Musul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi

Lise: Al-Valid Lisesi

Ortaokul: Al-Muhalab Orta Okulu

İlkokul: Al-Adnaniya İlk Okulu

Yabancı Dili: Arapça, İngilizce

Aldığı Burs: Milli Eğitim Bakanlığı- Türk Cumhuriyetleri-Doktora Bursu