

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOKAK KÖPEKLERİNDE İNDİREKT ELISA VE SABİN  
FELDMAN BOYA TESTLERİYLE *TOXOPLASMA GONDII*  
ENFEKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**FIRAS AUDA KHDIER ALALI**

**DOKTORA TEZİ**

**VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman  
Prof. Dr. FERDA SEVİNÇ**

**KONYA-2019**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOKAK KÖPEKLERİNDE İNDİREKT ELISA VE SABİN  
FELDMAN BOYA TESTLERİYLE *TOXOPLASMA GONDII*  
ENFEKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**FIRAS AUDA KHDIER ALALI**

**DOKTORA TEZİ**

**VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. FERDA SEVİNÇ**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **17102030** proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2019**

**S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne**

FIRAS AUDA KHDIER ALALI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Parazitoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK**

İmza

**Ankara Üniversitesi**

**Danışman: Prof. Dr. Ferda SEVİNÇ**

İmza

**Selçuk Üniversitesi**

**Üye: Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU**

İmza

**Ankara Üniversitesi**

**Üye: Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ**

İmza

**Selçuk Üniversitesi**

**Üye: Prof. Dr. Özlem Derinbay EKİCİ**

İmza

**Selçuk Üniversitesi**

**ONAY:**

**Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.**

**Prof. Dr. Ender ERDOĞAN**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Toxoplasmosis, dünya genelinde yaygın olarak görülen zoonoz bir hastalıktır. Hastalığın etkeni *Toxoplasma gondii*, kanatlı hayvanlar dahil olmak üzere tüm sıcakkanlı hayvanları ve insanları enfekte edebilen, alyuvar hariç bütün hücrelerde gelişme yeteneği gösterebilen tek hücreli bir protozondur.

*Toxoplasma gondii*'nin esas konağı evcil ve yabani kedilerdir. Ara konak yelpazesi çok geniştir. Koyun, keçi, sığır, at, deve, köpek gibi memeli hayvanlar, kanatlı hayvanlar, kemirgenler ve insanlar *T. gondii*'nin gelişmesinde ara konak ödevi görürler.

Bulaşma enfekte kedi dışkı ile tabiata atılan ve tabiatta sporlandıktan sonra enfektif özellik kazanan oocystlerin ya da ara konakların vücudunda bulunan doku kistlerinin ağızdan alınması ile olur. Sokak kedilerinin yoğunlukta bulunduğu bölgelerde yaşayan evcil hayvanlar ve insanlar daima enfeksiyon riski altındadır. Sığır, koyun ve keçilerde toxoplasmosis, hem yavru atmaya neden olduğundan dolayı ciddi ekonomik kayıplara, hem de etler ile hastalığın insanlara bulaşmasından dolayı önemli bir halk sağlığı problemine sebep olur.

Toxoplasmosisin son konakta teşhisi dışkıda oocystlerin görülmesiyle konulabilirse de, oocystlerin tespiti her zaman mümkün olmayabilir. Ara konaklarda ise genellikle immünolojik/serolojik metotlarla ya da biyopsi materyalinde etkenin kist ya da pseudokistlerini görerek teşhis konulabilir. Klinik belirtiler ve patolojik bulgular da hastalığın teşhisinde önemlidir.

*Toxoplasma gondii* enfeksiyonu köpeklerde klinik veya subklinik formlarda seyretmektedir. Dünyanın çeşitli ülkelerinde ve Türkiye'de toxoplasmosis ile ilgili hem insanlar hem de çeşitli hayvan türleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak köpeklerde hastalığın prevalansı ile ilgili çalışmalar diğer hayvan türleri ile kıyaslandığında daha az sayıdadır. Bu araştırma Konya yöresindeki sokak köpeklerinde toxoplasmosisin yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla kan plazmasında etkene spesifik antikorlar ELISA ve Sabin-Feldman boya testleri (SFDT) kullanılarak tespit edilmiştir. Sabin-Feldman boya testi "altın standart" metot olarak kullanılmıştır. Her iki testle elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak enfeksiyonun halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından önemi değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferda Sevinç'e, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Feyzullah Güçlü başta olmak üzere tüm

öğretim üyelerine, numune toplama ve laboratuvar analizi aşamalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Onur Ceylan ve Ceylan İlhan'a, tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim. Yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Cahit Babür'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora tezimi yapmama imkan sağlayan Irak Yüksek Öğretim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı (MOHESR) ile Türkiye'de Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğüne (BAP) teşekkür ederim.

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin yaşam döngüsü	3
1.1.1. Takizoitler	3
1.1.2. Bradizoitler ve doku kistleri	5
1.1.3. Oocystler	6
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin yaşam döngüsü	7
1.2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin son konaklarda yaşam döngüsü	7
1.2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin ara konaklarda yaşam döngüsü	9
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin epidemiyolojisi	10
1.3.1. Bulaşma şekilleri	11
1.3.2. Toxoplasmosisda risk faktörleri	12
1.3.3. Farklı konak türlerinde <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin prevalansı	15
1.3.4. Kedilerdeki yaygınlığı	15
1.3.5. Köpeklerdeki yaygınlığı	19
1.3.6. Diğer evcil hayvanlardaki yaygınlığı	23
1.4. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin suşları	27
1.5. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin teşhisi	30
1.5.1. Mikroskopik metotlarla Direkt Tanı ve Biyolojik metotlarla etken izolasyonu	30
1.5.2. Serolojik testler	31
1.5.2.1. Sabin-Feldman boyama yöntemi (dye-test)	31
1.5.2.2. ELISA yöntemi (Enzim İşaretli Anti-globulinlerle Antikor Araştırılması)	33
1.5.3. Moleküler yöntemler	36
1.5.4. Protein analizi	36
1.5.5. Son konaklarda teşhis	37
1.5.6. Ara konaklarda teşhis	38
1.6. Toxoplasmosisin tedavisi	39
1.7. Toxoplasmosise karşı korunma yöntemleri	40
1.7.1. Hijyenik tedbirler	40
1.7.2. Aşı ile korunma	41
1.8. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin antijenik proteinleri	43
1.8.1. Mikroneme proteinleri (MIC)	44
1.8.2. Rhoptry proteinleri (ROP, RON)	46
1.8.3. Dense granül proteinleri (GRA)	47
1.8.4. Rekombinant antijenik proteinler	50
1.8.5. Antijenik epitoplara, kimerik antijenler ve multi-epitoplara peptidler	52
1.8.6. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin teşhisinde yüzey protein antijenleri	53
1.8.7. Toxoplasmosis tamsında SAG2 antijeni	56
1.9. Köpeklerde Toxoplasmosis	59
1.9.1. Klinik belirtiler	59
1.9.2. Köpeklerde toxoplasmosisin teşhisi	60

2. GEREÇ ve YÖNTEM	61
2.1. Çalışma bölgesi, hayvan sayısı, örnek toplama	61
2.2. Laboratuvar incelemeler	62
2.2.1. İndirekt ELISA	62
2.2.1.1. <i>T.gondii</i> 'nin rekombinant SAG2 antijeninin (rTgSAG2) laboratuvarda üretilmesi	62
2.2.1.2. İndirekt ELISA testinin aşamaları	63
2.2.1.3. ELISA Testinde Kullanılan Solüsyonlar	64
2.2.2. Sabin-Feldman Boya testi	66
2.2.2.1. Antijenin hazırlanması	66
2.2.2.2. Kompleman faktörün hazırlanması	68
2.2.2.3. Pozitif kontrol serumu	69
2.2.2.4. Solüsyonların hazırlanması	69
2.2.2.5. Sabin Feldman boya testi	70
2.2.2.5.1. Sabin Feldman boya testi uygulaması	71
3. BULGULAR	73
4. TARTIŞMA	79
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
6. KAYNAKLAR	89
7. ÖZGEÇMİŞ	110



## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

Abs: Antikorlar

AIDS: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu

AMA: Apikal membran antijeni

CAG: Dolaşımdaki antijen

CDV: Köpek distemper virüsü

CFT: Komplement fikzasyon testi

DAT: Direkt aglutinasyon testi

DNA: Deoksiribonükleik asit

DT: Boya testi

ELISA: Enzim bağlı immünosorbent deneyi

GPI: Glikosil fosfatidil inositol

GRA: Yoğun granül

GST: Glutasyon-S-transferaz

IAAT: İmmünosorbent aglutinasyon testi

ICT: İmmünokromatografik testi

IFAT: İndirekt floresan antikor testi

Ig: İmmüoglobulin

IFN- $\gamma$ : İnterferon gama

IHAT: İndirekt hemaglutinasyon testi

IL: İnterlökin

LAT: lateks aglutinasyon testi

MAT: Modifiye aglutinasyon testi

MIC: Mikronemler

MJ: Hareketli Kavşak noktası

OD: Optik yoğunluk

PBS: Fosfat Tampon Tuzu

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PVM: Parazitofor zar

PV: Parazitofor boşluklar

RFLP: Kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizmi

RNA: Ribonükleik asit

ROP: Roptri proteinleri

RON: Roptri boyun proteinleri

SFDT: Sabin–Feldman boya testi

SAG: Yüzey antijeni

SRS: SAG1 ile ilgili dizi

SC: Deri altı

TEM: Transmisyon elektron mikrofafi

Tg: *Toxoplasma gondii*

TLA: *Toxoplasma* lizat antijeni

TRAP: Trombospondin ilişkili anonim protein

WB: Western blot testi

## ŞEKİL LİSTESİ

		<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> 'nin yaşam döngüsü (Dubey 2010)	9
<b>Şekil 2</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> takizoitinin ince yapısı (Ajioka ve ark 2001)	43
<b>Şekil 3</b>	Konya büyükşehir belediyesi hayvan bakımevi	61
<b>Şekil 4</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> takizoitlerinin in vivo kültivasyonunda kullanılan laboratuvar fareleri	66
<b>Şekil 5</b>	<i>T. gondii</i> takizoitlerinin laboratuvar faresinde periton içine enjeksiyonu	67
<b>Şekil 6</b>	Laboratuvar faresinin kabin içinde sedasyonu	68
<b>Şekil 7</b>	Laboratuvar faresinden periton sıvısının aspirasyonu	68
<b>Şekil 8</b>	Kompleman faktör ihtiva eden insan serumu	69
<b>Şekil 9</b>	Toxoplasma referans kontrol serum, <i>T. gondii</i> antijeni ve kompleman faktörün çalışıp çalışmadığının analizi yapılırken kullanılan test tüpleri	70
<b>Şekil 10</b>	Sabin-Feldman boya testinde kaydedilen pozitif ve negatif reaksiyonlar	74
<b>Şekil 11</b>	ELISA ile kaydedilen pozitif ve negatif reaksiyonlar	75

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 3.1.</b> Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve indirekt-ELISA ile tespit edilen anti- <i>Toxoplasma gondii</i> antikorlarının köpeklerdeki dağılımı.	73
<b>Çizelge 3.2.</b> Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve indirekt ELISA ile spesifik anti- <i>Toxoplasma gondii</i> antikorlarının yaşlara göre dağılımı	75
<b>Çizelge 3.3.</b> Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve indirekt ELISA'nın klinik belirtilerle ilişkisi	77
<b>Çizelge 3.4.</b> Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve ELISA testlerine göre cinsiyet ile klinik belirtiler arasındaki ilişki	78
<b>Çizelge 3.5.</b> Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve indirekt-ELISA sonuçlarının yeni ve eski girişli köpeklerde dağılımı	78

## ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### Sokak köpeklerinde indirekt ELISA ve Sabin Feldman Boya testleriyle *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun değerlendirilmesi

**FIRAS AUDA KHDIER ALALI**  
**Veterinerlik Parazitolojisi**  
**Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ / KONYA-2019**

Bu çalışma Konya yöresindeki sokak köpeklerinde toxoplasmosisin yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Temmuz 2017 ile Temmuz 2018 tarihleri arasında, 0-1 ve 1-3 yaş arasındaki her iki cinsiyete ait 334 köpekten genel klinik muayeneleri yapıldıktan sonra kan örnekleri alınmıştır. Enfeksiyonun teşhisi etkene spesifik antikorları tespit etmek suretiyle yapılmış ve teşhis için serolojik yöntem olarak Sabin-Feldman boya testi ve ELISA kullanılmıştır.

Enfeksiyonun prevalansı SFDT ile %98.5 (329/334), ELISA ile %33.8 (113/334) olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyonun cinsiyete göre yaygınlığı erkek ve dişilerde SFDT ile sırasıyla %99.2 ve %98.1, ELISA ile %40.3 ve %30 olarak belirlenmiştir. Yaş gruplarına göre enfeksiyonun yaygınlığı; 0-1 yaş arası köpeklerde SFDT ile %100 (14/14), ELISA ile %21.4 (3/14) oranında tespit edilirken, 1-3 yaş arasındaki köpeklerdeki oranlar sırayla %98.4 (315/320) ve %34.4 (110/320) olarak tespit edilmiştir.

Klinik bulgular gösteren köpeklerin %36'sı (22/61) ELISA ile, %98.3'ü SFDT ile seropozitif bulunmuştur. Arka bacaklarda felç ve atrofi ile deri lezyonu görülen iki hayvan serolojik yoklamada her iki test ile de pozitif sonuç vermiştir. ELISA testi baz alındığında; deri lezyonları görülen 18 hayvanın 7'si (%38,8), kene enfestasyonu olan 9 hayvanın 3'ü (%33,3), burun akıntısı olan 32 hayvanın 10'u (%31,2) pozitif bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** ELISA; Sabin Feldman Boya Testi; Sokak köpeği;  
TgSAG2

## SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY  
SELÇUK UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

### **Evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in stray dogs by indirect ELISA ve Sabin Feldman Dye test**

**FIRAS AUDA KHDIER ALALI**  
Department of Veterinary Parasitology  
PhD THESIS / KONYA-2019

The current study was aimed to investigate *Toxoplasma* infection among stray dogs in Konya province. During the period of July 2017 - July 2018, 334 blood samples were collected from the animals of both genders (males and females) aged between (0-1> years and 1-3> years). The diagnosis was performed by detecting *T. gondii* -specific antibodies in plasma. Sabin-Feldman dye test (SFDT) and Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) were the serological methods used in the study.

The results of this study showed that the total prevalence of Toxoplasmosis in stray dogs was 98.5% and 33.8% by SFDT and ELISA, respectively. The percentage of infection was 99.2% and 98.1% by SFDT in the males and females, respectively. The number of positive cases was 40.3% in males and 30% in females by ELISA, respectively.

The number of positive cases was 14 (100%) and 3 (21.4%) in 0-1 years old animals, and was 315 (98.4%) and 110 (34.3%) in the age group of 1-3 years by SFDT and ELISA, respectively.

During the study, it was recorded the clinical signs including paralysis and atrophy of hind limbs, nasal secretion, skin lesions, tick infestations, vomiting, diarrhea, nervous system disorders, and emaciation in 61 animals. Of the animals with clinical signs, 98.3% (60/61) and 36% (22/61) was positive SFDT and ELISA, respectively. Two dogs, with the signs of paralysis and atrophy in hind limbs and skin lesions, were found to be positive by two serological methods. Basing on the ELISA results; 7 of 18 animals with skin lesions (38,8%), 3 of 9 animals with tick infestations (33.3%) and 10 of 32 animals with noise secretions (31.2%) were positive for *T. gondii*-specific antibodies.

Key Words: ELISA; Sabin Feldman Dye Test; Stray dogs; TgSAG

## 1. GİRİŞ

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) memeliler, kuşlar ve insan dahil tüm sıcakkanlı omurgalıları enfekte edebilen zorunlu bir hücre içi protozoon parazittir. Ara konaklar, parazitin takizoit ve bradizoit evrelerini taşıırken, son konak kediler (Felidae), oocystlerin yayılmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu üç evrenin ana yapıları morfolojik olarak benzerdir. Bununla birlikte, her gelişme döneminde parazitin evresine spesifik olan antijenik yapıdaki proteinler farklıdır (Dubey 2010, Bruna-Romero ve ark 2012).

*Toxoplasma gondii*, ilk olarak Tunus'ta 1908 yılında Nicolle ve Manceaux tarafından hamster benzeri bir Kuzey Afrika kemirgeni olan *Ctenodactylus gundi* dokularında (dalak, karaciğer ve kan) tarif edilmiştir. Brezilya'da da aynı dönemlerde Splendore (1908), laboratuvar tavşanının dokularında bu parazitin bulunduğunu kaydetmiştir. Parazitin cins adı Yunanca'dan (toxos = yay ya da kavis, plazma = yaşam) köken almıştır ve parazitin hilal şeklindeki görünümü ilk olarak Nicolle ve Manceaux tarafından tanımlanmıştır. Parazitin tür adı, izole edildiği Kuzey Afrika kemirgeni olan *Ctenodactylus gundi* adından türetilmiştir. Bu hayvan, Tunus'un güneyinde dağlarda yaşar. Tunus'da bulunan Pasteur Enstitüsünde leishmaniosis üzerine yapılan bir çalışmada bu hayvanlarda *Toxoplasma gondii*'nin doku kistleri (bradizoit) ve pseudokistleri (takizoit) tespit edilmiştir. Ancak bu organizmanın bir coccidian parazit olduğu 1960 yılından sonra tespit edilmiştir (Weiss ve Dubey 2009).

*Toxoplasma gondii* de malaria etkeni *Plasmodium spp.*, koksidiyoz etkeni *Eimeria spp.* ve cryptosporidiosis etkeni *Cryptosporidium spp.* gibi tıbbi ve veteriner öneme sahip birçok protozoonu içinde barındıran Apicomplexa takımında yer alır (Sullivan ve Jeffers 2012).

Toxoplasmosis insanlarda genellikle asemptomatik seyreder. Ancak kanser tedavisi veya organ nakli yapılan bağışıklık yetmezliği olan hastalarda yaşamı tehdit edebilir. Bağışıklığı sağlam olan bireylerde toxoplasmosis asemptomatik olarak ömür boyu vücutta kalabilir. İnsan nüfusunun yaklaşık olarak üçte birine *T. gondii*'nin bulaştığı tahmin edilmektedir. Akut enfeksiyon kadınlarda aborta ve bağışıklık

yetmezliği olan hastalarda lenfadenopati sendromuna neden olur. Hayvanlardan insanlara geçmesinin birincil yolu, oocystleri ile kontamine içme suyunun ve doku kistleri içeren etlerin tüketimi ile olur. Hidrosefali, retinokoroidit ve ensefalit belirtileri gösteren yeni doğanlarda konjenital toxoplasmosis saptanmıştır (Halonen ve Weiss 2013). Hayvan enfeksiyonlarında *Toxoplasma*, dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Özellikle koyun ve keçi sürülerinde olmak üzere her türlü hayvancılıkta atık, ölü doğum ve yenidoğan kaybına neden olmaktadır (Ismael ve ark 2003).

İnsanlara toxoplasmosisin bulaşmasında köpekler mekanik vektör olarak rol oynayabilirler. Enfekte kedi dışkısındaki oocystleri ağızdan alan köpekler bu oocystleri kendi dışkılarıyla aynı ortamı paylaşan insanlara geçirebilirler. *Toxoplasma gondii* köpek etinin besin olarak tüketildiği bölgelerde insanlara ağız yoluyla bulaşabilir (Lindsay ve ark 1997, Dubey ve ark 2007).

Kedi ve köpeklerde toxoplasmosis, hepatik nekroz nedeniyle akut karaciğer yetmezliğine neden olur. Hastalık "feline immunodeficiency virüs" yönünden pozitif olan kedilerde daha sıklıkla görülür. Merkezi sinir sistemi ve göz problemlerine ilave olarak sarılık, abdominal effusion (karın boşluğuna kan veya lenf sıvısının sızması), ateş, uyuşukluk, kusma ve ishal görülür. Köpeklerde toxoplasmosisla ilgili karaciğer hastalığı genellikle gençlerde, büyük oranda da gençlik hastalığı (distemper virus) yönünden pozitif olanlarda görülür. Böyle hastalarda, hastalığın başlaması ile birlikte hızla ölüm gerçekleşir.

Apicomplexa takımındaki protozoonların invaziv evrelerinin anterior ucunda apikal kompleks organeller olarak tanımlanan yapılar bu protozoonların hücre içine girişleri ve hücre içindeki gelişmeleri sırasında aktif rol oynarlar. Bu organellerin en önemlileri roptri, mikronem ve subpellikler tubuller olup, bunların salgıladıkları roptri boyun proteinleri (RON), roptri proteinleri (ROP), microneme proteinleri (MIC), yoğun granül proteinler (GRA) ve yüzey antijenleri (SAG) olarak adlandırılan proteinler Apicomplexa takımında yer alan bütün protozoonlar için ortak yapılarıdır (Lebrun ve ark 2007).

Altbirim (subunit) aşısı geliştirmenin yanı sıra tanı için başvurulan en önemli recombinant proteinler; yüzey antijeni-1 (SAG1), yüzey antijeni-2 (SAG2),



mikroneme protein-3 (MIC3), roptri proteini-2 (ROP2), granül proteini-1 (GRA1) ve granül proteini-7 (GRA7)'dir. Protozoonun yapısında bol miktarda bulunan ve en immünojenik olan proteinler SAG1 ve SAG2 yüzey proteinleridir. Bunlar enfeksiyonun akut evresinde takizoitlerin yüzeyinde bulunabileceği gibi, kronik evrede bradizoitlerin yüzeyinde de bulunurlar. Bu nedenle toxoplasmosisin indirekt tanısında antijen materyali olarak bu proteinler sıklıkla kullanılmaktadır (Lekutis ve ark 2001, Cong ve ark 2013).

Sabin-Feldman Boya testi, *T. gondii* için spesifik olan antikorların saptanmasında altın standart olarak görülmektedir. Bu test, insanlarda aktif enfeksiyonun teşhisini mümkün kılar. Enfeksiyonun teşhisinde, rekombinant SAG2 antijeni kullanılarak yapılan ELISA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (Reiter-Owona ve ark 1999, Kotresha ve Noordin 2010).

Bu çalışma Sabin-Feldman boya testi ve ELISA testi kullanılarak Konya Büyükşehir Belediyesi, Veterinerlik Şube Müdürlüğüne bağlı köpek barınaklarında bulunan sokak köpeklerinde *T. gondii* enfeksiyonlarını tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

## **1.1. *Toxoplasma gondii*'nin biyolojisi**

### **1.1.1. Takizoitler**

Takizoit, son ve ara konakların tüm hücrelerinde hızla çoğalan evreyi tanımlamak için (tachos = Yunanca hız) kullanılan bir terimdir. Bu aynı zamanda endodezoitler, endozoitler veya trofozoit olarak da adlandırılmaktadır. Yapısal olarak takizoitler, merkezde yerleşik bulunan bir çekirdeğe sahiptir ve akut enfeksiyon esnasında bulunurlar. Takizoitlerde amilopektin granülü yok ya da çok azdır, roptri içeriği peteğe benzer bir görünümündedir.

Birçok takizoitin birikmesi ile klonlar, koloniler veya gruplar oluşur. Takizoitler endodiyogeni olarak adlandırılan belirli bir süreç halinde bölünürler (Dubey ve ark 1998, Dubey 2008). Takizoitler hassas yapıya sahiptirler ve sıcaklık, tuz konsantrasyonu, proteolitik enzimler, gastrik enzimler ile çevresel koşullara karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle konak veya besi ortamı dışında canlı kalamazlar (Tenter ve ark 2000, Robert-Gangneux ve Dardé 2012). *Toxoplasma gondii* takizoitlerinin

tripsin ve pepsin enzimlerine karşı olan duyarlılığı *in vitro* ve *in vivo* olarak takizoitleri, bradizoitlerden ayırmak amacıyla kullanılmıştır (Dubey 1998).

Doku kistleri, oocystler veya takizoitler ile farelere intraperitoneal enjeksiyondan sonra asites ve organlarda büyüme meydana gelir. Laboratuvar kazası veya kan nakli yoluyla takizoitler eğer bir konağa enjekte edilirse, konakta enfeksiyon oluşabilir. Virulent suşlu takizoitler genellikle farelerde hastalık oluşturur ve bunları 1-2 hafta içinde öldürebilir. Avirulent suşlar farelerde yavaş yavaş gelişir, bundan dolayı serbest takizoitleri bulmak genellikle zordur. Virulensi düşük olan takizoitlerin hızlı pasajı virulensi artırabilir. Bir anneden fetusa enfeksiyonun naklinde dikey geçiş (transplasental bulaşma) temel rol oynamaktadır. *Toxoplasma gondii* enfekte konağın spermalarında bulunmasına rağmen, venereal bulaşma riski neredeyse hiç yoktur. Gebelik döneminde şekillenen akut toxoplasmosis, fetal plasentitise ve parazitin fetusa yayılmasına neden olabilir (Tenter ve ark 2000).

Takizoitler hilal şeklinde, 2 µm × 6 µm büyüklüğünde, ön ucu sivri arka ucu yuvarlaktır. Kayarak, esneyerek, kıvrılıp bükülerek ve dönerek hareket edebilirler. Bunlar yapısal bütün halinde ve hücre hareketine sahip olan sitoskeleton (hücre iskeleti) ile yakından bağlı pelikül olarak adlandırılan, kompleks bir zar ile kaplıdır. Apikal kısım, spesifik bir sitoskelet yapısı (konoid ve çok sayıda salgı organelleri, roptripler, yoğun granül ve mikronemler) içermektedir (Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Takizoitler hücre zarının aktif diseminasyonu veya fagositoz yoluyla konak hücreye nüfuz etme kabiliyetine sahiptir. Hücre içine giren takizoit ovoid hale dönüşmektedir. Konakın bağışıklık sisteminden kendini koruyan bir parazitofor vakuol ile çevrilidir. Takizoitler, konak hücre yıkımına kadar sürekli ikili bölünmeler yoluyla aseksüel olarak çoğalırlar. *Toxoplasma gondii* takizoitleri, enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde doku kisti olarak adlandırılan başka bir ana evreye geçerler. Bunların bazıları hasardan kurtulmakta ve bradizoit olarak adlandırılan forma dönüşmektedirler. Bağışıklık yanıtının bozulması durumunda ise, takizoitler kontrolsüz büyümekte ve doku hasarına neden olmaktadır. Bu da konağın ölümü ile sonuçlanabilir (Dubey 2004, Bruna-Romero ve ark 2012).

### 1.1.2. Bradizoitler ve doku kistleri

Bradizoitler, bir doku kisti ile çevrilip yavaşça çoğalan paraziti tanımlamak için (Brady; Yunanca'da yavaş manasındadır) kullanılan bir terimdir. Bunlara ayrıca kistozoidler de denmektedir.

Bradizoit, kronik evrede daha etkin olan formdur. Dormant yapıdadır, yavaş büyür, enkistedir ve bulaşıcıdır (Bruna-Romero ve ark 2012). Doku kist duvarının yapısı elastik ve incedir ( $<0.5 \mu\text{m}$ ). Her biri  $7 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$  boyutlarında yüzlerce hilal şeklinde ufak tefek Bradizoit içerebilir (Dubey 2004). Doku kistleri boyut olarak farklılık göstermektedir. İntramusküler kistler uzayarak  $100 \mu\text{m}$  uzunluğuna çıkabilirken, beyinde bulunanlar genellikle yuvarlaktırlar. Küçük doku kistlerinin çapı  $5 \mu\text{m}$  olup, yalnızca iki bradizoit barındırırken, olgun olanları yüzlerce veya binlerce parazit barındırabilirler. Doku kistlerinin boyutları, kistin yaşına, enfekte hücre tipine bağlı olarak değişiklik gösterebilirler. Olgun kistlerin çapı  $60 \mu\text{m}$ 'ye ulaşır ve yaklaşık 3000 bradizoit içerebilir. Bradizoitler mide enzimlerinden etkilenmezler ve bu nedenle oral olarak bulaşırlar (Dubey 1998). Duvarı kalın ve sağlam olan doku kistleri konakta herhangi bir hasara sebebiyet vermeyebilir ve yangıya neden olmaksızın uzun süre konakta yaşayabilirler. Doku kistlerinin duvarı konak hücrenin sitoplazması ve parazite ait maddelerden oluşur. Duvarın iç tarafı bradizoitler arasındaki boşluğu dolduran granüler materyal ile kaplıdır. Bradizoitler posterior uca doğru yerleşik ve takizoitlerdekinden daha ince olan bir çekirdek ve birçok amilopektin granüle sahiptirler. Bradizoitler, 1-3 adet roptriye sahiptirler. Roptri içeriğinin kompozisyonu, doku kistinin yaşına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Dubey ve ark 1998).

Kist duvarının pepsin veya tripsin gibi sindirim enzimlerine dirençlidirler. Bu nedenle, *T. gondii*'nin yaşam döngüsünde doku kistlerinin daha anlamlı olduğu gösterilmiştir. Çünkü tüm karnivorlar çiğ et veya sakatat tüketimi ile enfekte olmaktadır. Bir ortamdaki tüm *T. gondii* şuşları doku kistlerini oluşturabilmektedirler. Takizoit, bradizoit veya oocystleri enjekte etmek suretiyle enjeksiyondan yaklaşık 6 ila 8 hafta sonra fare beyninde doku kistleri kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Kistlerin büyüklüğü parazit şuşuna göre farklılık gösterebilir.

Doku kistleri yoluyla bulaşma özellikle domuz ve koyunların, aynı zamanda vahşi av hayvanlarının, çok nadiren de sığırların etlerinin çiğ veya az pişmiş olarak yenmesiyle meydana gelmektedir. Ticari domuz kesimlerinde, etler merkezi sıcaklık 70 °C olacak biçimde pişirilerek, tuzlayarak veya konserve işleme yapılarak olası doku kistleri yok edilebilir. Doku kistleri, -20° C'de dondurularak da öldürülebilir. Gamma radyasyonu da etteki doku kistlerini etkisiz hale getirebilir. Bradizoitler kemoterapiden etkilenmezler (Dubey 1998).

AIDS gibi immüsuprese hastalarda, doku kistlerinden serbest kalan bradizoitler lokal olarak çoğalabilir ve vücudun tüm organlarına yayılabilirler. Doku kistlerinin en çok merkezi sinir sistemindeki sinir ve kas dokuları olmak üzere, göz ve bunun yanı sıra iskelet ve kalp kaslarını tercih ederler (Tenter ve ark 2000). Doku kistleri, fiziksel travma ya da stres veya spesifik ilaçlar ile (kortikosteroidler) parçalanabilmekte ve akut enfeksiyona sebep olarak takizoitlere dönüşebilmektedirler (Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

### **1.1.3. Oocystler**

Taze dışkıdaki *Toksoplasma* oocystleri sporlanmamıştır ve yuvarlak-oval şekildedir. Çapları 10×12 µm'dir. Her oocyst, büyüklüğü 6×8 µm olan iki elipsoidal sporocyste sahiptir. Her bir sporocyst subterminal nükleusa sahip 2 µm × 6-8 µm büyüklüğünde olan dört sporozoit içermektedir. Kediler oocystlerin tek kaynağı olarak düşünülmektedir ve kediler dışkılarıyla milyonlarca oocyst yayabilirler. Oocystler toprakta sinek, hamam böceği, gübre böcekleri, solucanlar ve iklim koşulları ile mekanik olarak yayılabilmektedir (Hill ve Dubey 2002, Dubey 2004). Yeterli havalandırma, nem ve sıcaklık gibi çevre koşullarında oocystler 1 ila 5 gün veya daha fazla süre içerisinde sporlanırlar. Sporlanan oocystler normal çevre koşulları altında uzun süre canlı kalabilirler. Kısa süreli soğukta, dehidrasyonda, nemli toprak veya kumda 1.5 yıla kadar varlıklarını sürdürmektedirler. Deneysel olarak, sporlanmış oocystler 54 aya kadar 4 °C'de ve 106 gün süreyle de -10 °C'de dondurularak kalmışlardır ve 55-60 °C'de ısıtılarak 1-2 dakika içinde öldürülmüşlerdir (Tenter ve ark 2000, Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Sporlanmış oocystlerin duvarı üç, sporocystlerin duvarı ise iki katmandan oluşur. Sporozoit, birleşiminde çok miktarda mikronem, roptri ve amilopektin granülü bulunması dışında takizoite benzemektedir (Dubey ve ark 1998).

*Toxoplasma gondii* oocystleri kedi dışkısında bulunması muhtemel olan *Isopora*, *Besnoitia* ve *Sarcocystis* türlerinin oocystlerinden kolaylıkla ayırt edilebilirken, *Hammondia hammondi* oocystlerinden ayırt edilemezler. Oocyst duvarı, çok katmanlı ve güçlü bir yapıya sahip olup; paraziti mekanik ve kimyasal hasarlardan, hattâ kromik asit, sodyum hipoklorit ve sodyum hidroksit gibi keskin kimyasallardan korur, dezenfektanlara karşı dirençlidir. Bu oocystler, kedilerin doku kistleri ile kronik enfekte farelerle beslenmesi suretiyle bol miktarda üretilebilirler. Genel olarak, doku kistlerinin yenmesinin ardından 3 ila 8 gün içinde kedi dışkısında oocystler tespit edilebilir (Fayer 1981, Robert-Gangneux ve Dardé 2012). Doku kistleri ile primer enfeksiyon sonrası dışkıda yüz milyondan fazla oocyst bulunabilir (Frenkel ve ark 2003). Oocystlerle bulaşma diğer ara konaklarla kıyaslandığında, kedilerde az patojenik ve az infektiftir (Dubey 1998).

Oocyst infektivitesini tespit etmek için kullanılan deneyler fare, tavuk ve kediler üzerinde uygulanmaktadır. Bu metotlar sadece canlı *T. gondii* oocystlerinin değerini vermektedirler (Dubey 2010).

## **1.2. *Toxoplasma gondii* 'nin yaşam döngüsü**

*Toxoplasma gondii*, insanlar ve kuşlar dahil olmak üzere birçok evcil ve yabani hayvanı ara konak olarak kullanan zorunlu bir hücre içi protozoon parazittir. Parazitin takizoit (proliferatif evre), bradizoit (doku kistleri) ve oocyst (sporozoitler) olmak üzere morfolojik olarak farklı üç enfeksiyon evresi vardır. Son konak olan evcil ve yabani kediler, *T. gondii*'nin bu üç bulaşıcı evresinden herhangi birini yedikten sonra oocystleri dışkılarıyla dışarı atarlar (Dubey 2010) (Şekil 1).

### **1.2.1. *Toxoplasma gondii* 'nin son konaklarda yaşam döngüsü**

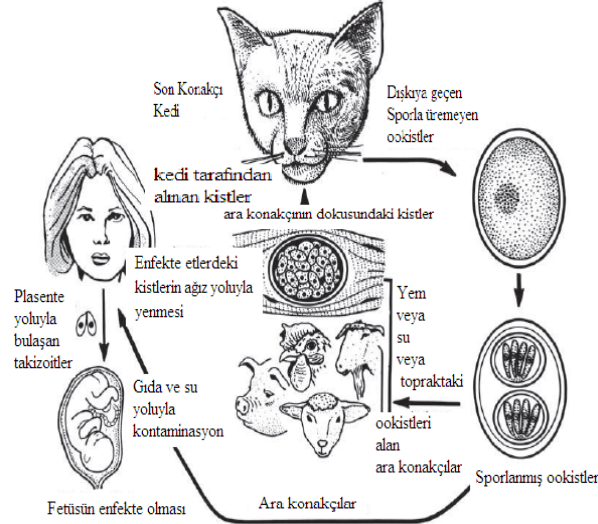
*Toxoplasma gondii*'nin son konaklardaki yaşam döngüsü tüm ara konaklardan farklıdır. Son konak kedi ile ara konaklar arasında heteroksen bir yaşam döngüsü vardır. Parazitin yaşam döngüsü boyunca, takizoit (psödokistlerin içinde), bradizoit (doku kistlerinin içinde) ve sporozoit (oocystlerin içinde) olmak üzere üç bulaşıcı

evresi bulunmaktadır. Her üç aşama hem ara hem de son konaklar açısından enfektiftir. Yaşam döngüsü, kedi ve diğer konakların enfeksiyonlarına bağlı olarak eşeyli ve eşeysiz şekillerde gelişir. Kedilerdeki enfeksiyonlar genelde asemptomatiktir ve transplasental geçiş nadiren meydana gelmektedir. Memeli ve kanatlı ara konakların neredeyse tüm çekirdekli hücrelerinin içerisine girip, çoğalma kabiliyetine sahiptir. Bulaşma kedi dışındaki oocystlerin veya enfekte etlerde bulunan doku kistlerinin ağızdan alınması ile veya takizoitlerin anneden fötusa transplasental yolla aktarılması neticesinde gerçekleşir (Tenter ve ark 2000, Dubey 2004). Enfekte olmuş son konak (kediler ve diğer kedigiller), dışkılarında bulunan milyonlarca oocysti çevreye dirençli biçime yayabilirler.

Bağırsak epitelinde gelişme sadece son konaklarda olur. Kediler, doku kistleri bulunan ara konakların etlerini yiyerek enfekte olurlar. Kist duvarları sindirim enzimleri tarafından imha edildiğinde, bradizoitler bağırsak lümeninde doku kistlerinden çıkarlar. Bu bradizoitler, ince bağırsak epitel hücrelerini istila ederek öncelikle şizontları oluştururlar. Şizontların içinde merozoitler gelişir ve bunlardan da erkek ve dişi, gamontlar gelişir (Speer ve Dubey 2005).

Kedilerde, ince bağırsakların epitelyum hücrelerinde gerçekleşen şizogoni (eşeysiz üreme) ve gametogoni (eşeyli üreme) olmak üzere iki gelişme evresi vardır. Sporlanmış oocystlerin, doku kistlerinin veya psödokistlerin son konak tarafından yenmesi durumunda; sporozoitler, bradizoitler ve takizoitler serbest kalarak sindirim kanalı hücrelerine girerler. Burada tüm enfektif formlar takizoit döneme geçer. Takizoitler hızla çoğalarak ekstra intestinal dokulara yayılırlar. Sporozoitler yendiği zaman, iki aseksüel evre geçirir. Bradizoitler, bağırsak epitel hücrelerinde tekrar endodyogeni, sonra endopolygeni ile çoğalırlar. Gelişmenin eşeyli üreme evresinde şizontlardaki merozoitlerden erkek ve dişi gametler oluşur. Erkek gametin iki kamçısı bulunmaktadır ve dişi gameti döllenmek için hareket etmektedir. Döllenmeden sonra döllenmiş dişi gamet etrafında oocyst duvarı oluşturulmaya başlar. Oocystler olgunlaşıp, epitel hücrelerini patlatıp bağırsak lümenine geçerler. *Toxoplasma gondii* en az aylarca ve belki de kedinin ömrü boyunca onun dokusunda kalabilir. Bradizoitlerin bir kısmı da ince bağırsağın epitel hücrelerine girerler ve A-E şizont tipleri denen birçok eşeysiz gelişme dönemini başlatırlar (Dubey ve ark 1998). Bu şizont tipleri büyüklük, organizma sayısı, bölünme yöntemi, gelişme zamanı ve lümendeki yerleri bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedirler (Fayer 1981). Olgunlaştıktan sonra bağırsak lümenine geçen oocystler dışkı ile

atılırlar ve tabiatta sporlanırlar (Dubey 2004, Black ve Boothroyd 2000). Prepatent dönem kedinin aldığı gelişme dönemine göre farklılık gösterir. Oocystlerin veya takizoitlerin yenmesinden sonra oocyst oluşumu 18 gün kadar sürerken, doku kistlerinin yenmesi durumunda 3 ila 10 gün sürmektedir (Dubey 2005).



**Şekil 1** Tokso plazma gondii'nin yaşam döngüsü (Dubey 2010).

### 1.2.2. Tokso plazma gondii 'nin ara konaklarda yaşam döngüsü

Ara konaklardaki gelişmede, *T. gondii* iki evreli eşeysiz gelişme gösterir. Ara konak için üç enfektif dönem vardır. Bunlar ara konakların retiküloendotelyal hücrelerinde psödokistler içinde bulunan takizoitler, doku kistleri içinde bulunan bradizoitler ve son konaklar tarafından atılan oocystlerde bulunan sporozoitlerdir. Sporlanmış oocystler ara konak tarafından alındığında, kistten çıkan sporozoitler, bağırsak yüzeyine ve bağırsak epitelindeki goblet hücrelerine girerek, ödem ve lamina propria tabakasında nekroza neden olabilmektedir. Bağırsak mukozasında dökülmelere ve ağır enteritise yol açıp, diğer organlara yayılmaktadır (Dubey 2004).

*Toxoplasma gondii*, plasenta yoluyla fetusa geçen takizoitler tarafından dikey olarak da bulaşabilir. Yatay bulaşma, enfektif oocystlerin alınması, ara konakların çiğ ya da az pişmiş etlerinde bulunan doku kistlerinin veya takizoitlerin yenmesiyle meydana gelir. Ayrıca takizoit taşıyan kan ürünleri, pastörize edilmemiş süt ya da doku nakilleri ile de bulaşma gerçekleşebilmektedir. Bulaşma yolları kültür ve yeme alışkanlıklarında farklılık gösteren insan nüfuslarında farklıdır (Tenter ve ark 2000).

Doku kistleri bir ara konak tarafından alındıktan sonra, kistler bağırsakta parçalanır ve serbest kalan bradizoitler bağırsağa geçerler. Bradizoitler, konağın epitel hücrelerine girerler ve bağırsak dışındaki dokulara transfer için hızlı çoğalan takizoit dönemine geçerler (Robert-Gangneux ve Dardé 2012). Şizogoni evresinde, hücresel sitoplazmik bölünme olmaksızın çekirdek iki kere veya daha fazla bölünmektedir. Son hücre bölünmesi ile oluşan merozoitler başlangıçta şizontun merkezine yakındır daha sonra şizontun kenarına doğru hareket ederler. Şizont plazmalemması (plazma zarı), merozoitin çevresine invagine olarak merozoit plazmalemmasını oluşturur. Ara konaklarda her 6 ila 8 saatte bir endodyogeni ile çoğalan takizoit dönemi oluşmaktadır (Halonen ve Weiss 2013).

*Toxoplasma gondii*'nin ekstraintestinal fazı, köpekler, kediler ve insanlar dahil olmak üzere tüm konaklarda benzerdir. İnsan, koyun ve keçilerdeki *Toksoplasma*'nın dikey bulaşmasının bir sonucu olan konjenital toxoplazmosis, gebelik sırasında fetüsü öldürebilir (Dubey 2004). Toxoplazmosis, yavru köpeklere gebelik döneminde transplasental yolla veya emzirme döneminde sütle bulaşabilir (Dubey 2005). Son konak olmaksızın, ara konaklar arasındaki yaşam döngüsü doku kistleri ile olur. Ara konak olmaksızın, son konaklar arasındaki yaşam döngüsü ise oocystler ile devam edebilir (Tenter ve ark 2000).

Bağışıklık yetersizliği olan hastalarda, doku kistleri, yayılma kaynağı işlevi görmektedirler veya lokal enfeksiyonlu bir hastalık tablosu geliştirebilirler. Doku kistleri sinir ve kas dokusuna eğilim göstermekte olup, ensefalit veya koryoretinit olarak ifade edilen birçok hastalığın reaktivasyonu ile insan gözünün yanı sıra nöronlar içerisindeki gri maddeye yerleşirler. Merkezi sinir sistemi ve kaslar kronik hastalıkların ve latent enfeksiyonların en sık görüldüğü yerlerdir. Bununla birlikte karaciğer, böbrek ve diğer organlarda da doku kistleri görülebilir (Weiss ve Dubey 2009, Halonen ve Weiss 2013).

### **1.3. *Toxoplasma gondii* 'nin epidemiyolojisi**

*Toxoplasma gondii*, kanatlı hayvanlar da dahil olmak üzere tüm sıcakkanlı hayvanları ve insanları enfekte edebilen bir protozoondur. Alaska'dan Avustralya'ya kadar dünya çapında dağılım gösterir. *Toxoplasma gondii*'nin esas konağı, evcil ve yabani kedilerdir.



### 1.3.1. Bulaşma şekilleri

*Toxoplasma gondii*, tüm dünyada insanlarda ve sıcak kanlı hayvanlarda bulunan en yaygın parazitlerden biridir. İnsanlarda, dünyanın dört bir yanındaki bölgelerde enfeksiyon bulunmaktadır. İnsanların yaklaşık üçte birinde kronik enfeksiyon bulunduğu bildirilmektedir. Enfeksiyonlar, sıcak ve yağışlı ülkelerde artmaktadır. Çünkü oocystler kuraklık veya donmaya maruz kaldıklarında infektivitelerini kaybetmektedirler (Halonen ve Weiss 2013).

Bulaşmada konjenital bulaşma, enfekte dokuların yenmesi ve oocystlerle enfekte gıdaların ve suların tüketilmesi olmak üzere başlıca üç yol vardır. Kedi, *Toxoplasma* tarafından son konak olarak kullanılan tek evcil hayvandır ve dolayısıyla toxoplasmosis epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, toxoplasmosisda insanlar için gizli enfeksiyon kaynakları olarak oocystlerin önemli bir rolü vardır (Dubey 2005 ).

İnsanlara yatay bulaşmalar, doku kistleri içeren etin yenmesi, sporlanmış oocystlerle enfekte toprak, su ya da gıdaların yenmesi veya daha az yaygın olarak doğrudan enfekte kedi dışkılarından kaynaklanmaktadır. Pastörize edilmemiş keçi sütü tüketiminin de bulaşmada bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Kan nakli veya organ transplantasyonları ile de bulaşma mümkündür ancak nadiren görülür. Sinekler, hamamböcekleri ve solucanlar mekanik vektörler olarak rol oynayabilirler (Enstitü 2005, Sonar ve Brahmbhatt 2010).

Kediler ve güvercinler parazit epidemiyolojisinde önemli faktörlerdir. Kediler çevreye oocystleri dışkılayan tek son konaktır. Güvercinler, kedi ve insanlarla ortak alanları paylaştıklarından dolayı bulaşmada rol oynarlar (Vilares ve ark 2014). Önemli bir tokzoplazmoz kaynağı ise; az pişmiş et, çiğ süt ve pastörize edilmemiş süttür. Küçük ruminantlar, açık alan yetiştiriciliği nedeniyle hem pastörize edilmemiş süt, hem de et üretimi yönünden küresel olarak önemlidirler (Luptakova ve ark 2015). Köpekler, kedi dışkılarını yedikten sonra veya oocystler bulunan kedi dışkısı ile bulaşarak *T. gondii*'yi mekanik olarak bulaştırabilmektedirler. Köpekler sporlanmış oocystleri yediklerinde, köpek dışkısında 2 güne kadar canlı oocystler bulunmuştur (Lindsay ve ark 1997).

Köpekler mekanik vektörler olarak rol oynarlar. Köylerde köpekler, sıklıkla kedilerin bulunduğu ortamlarda *T. gondii*'nin insanlara bulaşmasına yardımcı

olmakta ve çocuklarda *Toxoplasma* seropozitifliği yüksek gözlenmektedir (Etheredge ve ark 2004).

### **1.3.2. Toxoplasmosisda risk faktörleri**

Evlerde bakılan kediler ev içerisinde yüksek miktarda oocyst yayarlar ve böylece sahipleri için önemli bir toxoplasmosis riski oluştururlar. Çiftliklerde dolaşan kediler ise, çevreye oocyst yayabildiklerinden dolayı, çiftlik hayvanları için risk oluştururlar. Enfekte kedi dışkısıyla kontamine olmuş hububat, saman ve kuru ot çiftlik hayvanı açısından hastalıkların kaynağı olarak bilinmektedir. Kedi toxoplasmosisında yaş, cinsiyet, yaşam alanı ve kedi bakıcılarının kediyi beslemesi gibi bir takım faktörler risk faktörleri olarak kabul edilmiştir. Sokak kedileriyle temas, eve alınan kedilerin kaynağı, sayısı ve kedilerin ev dışına çıkmaları da risk faktörleri olabilmektedir (Lopes ve ark 2008). Çiğ yumurta, çiğ et, pastörize edilmemiş süt, yıkanmamış meyve veya sebzelerin tüketilmesi, işlenmemiş su içilmesi ve de gıdalar hazırlanırken veya hazırladıktan sonra direkt gözlerle veya yüzle temas etmesi de risk oluşturabilmektedir (Kaye 2011).

Tek bir kedi, küçük miktarda bir dışkıyla günde 20 milyon oocyste kadar yüksek miktarda oocyst yayabilmektedir (Fayer 1981). Oocystler, çevreye yüzey suyu, yağmur, rüzgar veya hasat edilmiş yiyeceklerle yayılmaktadır. Ayrıca, oocystler solucan, koprofaj omurgasızlar veya konağın gübresi ile de yayılabilmektedir. Çeşitli barındırma şekilleri, hijyenik ahır önlemleri ve çeşitli yem türleri gibi epidemiyolojik faktörler de bulunmaktadır. Köpeklerde seropozitifliğin yaygın olarak yüksek olması, bunların doğal çevreyle kesintisiz temaslarını ve artan yaşın etkisini göstermektedir. Ayrıca, göl veya nehirlerden gelen kontamine olmuş suyun rekreasyonel (dinlenme) süreçler yoluyla tüketilmesi de toxoplasmosis kaynağı olabilir (Dubey 2004, Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Konjenital toxoplasmosis riski, maternal enfeksiyon zamanına, annenin bağışıklığına, parazit miktarına ve hastalık oluşturma derecesine ve de fetüsün yaşına dayandırılmaktadır. Ancak bu, oküler ve merkezi sinir sistemi anormalliklerine de neden olabileceği gibi bunun yanı sıra büyüme geriliğine, işitme ve görme bozukluklarına neden olur (Kaye 2011). Bağışık olmayan hamile kadınlar ve AIDS gibi hastalıklarla immün sistemleri baskılanmış hastalar risk grupları olarak değerlendirilmektedir. Bebekler, sindirim sisteminde daha az proteolitik enzim

konsantrasyonuna sahip olduklarından, yetişkinlere göre *Toxoplasma* enfeksiyonuna daha fazla duyarlıdırlar. Bağışık olmayan gebe kadınlar tarafından canlı doku kistlerinin tüketilmesi genellikle toxoplasmosis enfeksiyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, bir yabani hayvanın çiğ dalak ve karaciğerinin yenmesi sonrasında insanlarda akut toxoplazmozis oluşmaktadır. Bunlar, insanların farklı yeme alışkanlıklarını ve farklı alanlardaki et hayvanları ilgili çeşitli araştırmaları açıklamaktadır. İnsanlar, özellikle gebe kadınlar bahçe işleri esnasında kontamine olmuş toprakla temas etmek suretiyle de enfekte olmaktadır. *Toxoplasma* bulaşmasının görülme sıklığı yoksul ülkelerde, gelişmiş ülkelere göre daha yüksektir (Tenter ve ark 2000). *Toxoplasma*'nın kan nakli yoluyla da bulaşma riski bulunmaktadır (Robert-Gangneux ve Dardé 2012). Yüksek risk grupları ise hamile kadınlar, kedi sahipleri, veteriner hekimler, mezbahane işçileri, çocuklar, kasaplar ve aşçılardır (Sonar ve Brahmhatt 2010). Deve sahipleri atık deve fütüslerini eldiven kullanmadan ellerine alarak ve çiğ deve sütünü tüketerek toxoplasmosis riskine maruz kalabilirler (Gebremedhin ve ark 2014).

Bresciani ve ark (1999), gebelik dönemlerinde sporlanmış *T. gondii* oocystleri verilen üç dişi köpekten ikisinin konjenital toxoplasmosis belirtisi gösterdiğini, bir tanesinin ise düşük yaptığını bildirmişlerdir. Köpekler gebelik sırasında enfeksiyon kaptıklarında, dişi köpeklerde *T. gondii*'nin konjenital olarak bulaşabileceğini tespit etmişlerdir.

Köpeğin yaşı ve beraber seyreden diğer enfeksiyonlar, klinik köpek toxoplasmosisunu belirleyen iki önemli faktördür. Çoğu köpek toxoplasmosisu vakası, distemper (gençlik hastalığı) virüsü enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Distemper virüsünün oluşturduğu immünoşüpresyon, önceki *Toxoplasma* enfeksiyonuna karşı direnci düşürmekte ve köpek eşzamanlı bir hastalığa yatkın düşmektedir. Klinik köpek toxoplasmosisu, bir yaşın altındaki köpeklerde bildirilmiştir (Dubey 2010).

Köpekler, insanlara oocystleri mekanik olarak bulaştırabildikleri ve dünyanın sınırlı bölgelerinde insanlar tarafından köpek eti tüketildiği için, *T. gondii*'nin insanlara bulaşmasında, potansiyel bir tehdit olarak görülmektedirler (Dubey ve ark 2007).

Zhou ve ark (2017), bir gıda kaynağı olabildiklerinden rakun köpeklerinin (raccoon dogs) çok yüksek ekonomik değeri olduğunu, bu köpeklerin az pişmiş veya çiğ etlerinin tüketilmesi nedeniyle Çin'de potansiyel bir insan toxoplasmosis kaynağı

haline geldiklerini, *T. gondii* prevalansının sık sık kontrol edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ancak rakun köpeği eti diğer hayvanlar (köpekler, tavuklar, sığır, koyunlar ve domuzlar gibi) ile kıyaslandığında, insan gıdasının küçük bir kısmını oluşturmaktadır.

Köpekler, enfekte kedi dışkılarındaki oocystlerin tüylerine bulaşması sonucu oocystleri taşıyabilmekte ve *T. gondii*'nin dışkı yoluyla bulaşmasında rol oynamaktadırlar. Küçük çocuklar sıklıkla önce bir köpeğe temas edip, parmaklarını ağızlarına koyarak enfekte olabilmektedirler (Frenkel ve ark 2003, Yang ve ark 2013).

Jiang ve ark (2015), kedilerin çiftlik köpeklerinin bulunduğu yerlerde, köpeklerin yiyecekleriyle temasta bulduklarını gözlemlemişler ve bunun, köpek çiftliklerinde toxoplasmosis için bir ana risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir.

Kediler ve köpekler insanlarla yakın bir ilişki içinde olduklarından, potansiyel toxoplasmosis kaynakları olarak görülmektedirler (Oi ve ark 2015). Bundan dolayı evde bir köpek, eski bir sokak kedisi bulunması ve çiğ et tüketimi risk faktörleri olarak kabul edilmiştir. Bir başka faktör olan avcılıkla uğraşan insanlarda %35'e kadar *T. gondii* seropozitifliği gözlenmiştir (Opsteegh ve ark 2012).

Da Silva ve ark (2017), PCR testi kullanarak keçi ve koyunlarının çiğ süt örneklerinde *T. gondii* DNA'sı tespit etmişlerdir. Sürülerin hijyenik tedbirlerinin önemini ve insan sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturacağı düşünülen çiğ sütün alımından kaçınılmasını açıklamışlardır.

Dubey ve ark (2014) tarafından Birleşik Devletlerde eşeklerde (*Equus asinus*) *T. gondii* enfeksiyonu için serolojik araştırmalar yapılmış, eşek sütünün ve etinin toxoplasmosis için potansiyel bir kaynak olarak görülmesi gerektiği ileri sürülmüştür. Kedilerin çiftliklerde eşeklere toxoplasmosis bulaştırmadaki rolü araştırılmaktadır.

Yabani kuşlar da *T. gondii* enfeksiyonu için rezervuar konaklardır ve diğer zoonoz parazitlerle beraber *T. gondii*'ye de vektörlük yaparlar (Verma ve ark 2016).

Koyunlarda *T. gondii*'nin seropozitiflik seviyesinin yüksek olmasından dolayı, hayvan yetiştiriciliği insan toxoplasmosis için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır. Sürü büyüklüğü, rakım, cinsiyet, yaş, yönetim tipi, yerleşim yeri, kedilerin varlığı ve su kaynağı etkeni almak için önemli risk faktörleri olarak kabul edilmiştir (Gebremedhin ve ark 2013). Son zamanlarda deniz su samurlarında yaygın

olarak enfeksiyonun görülmesi, denizlerin de *T. gondii* oocystleri ile kontamine olduğunu göstermektedir (Dubey 2008).

### 1.3.3. Farklı Konak Türlerinde *Toxoplasma gondii* 'nin Prevalansı

#### 1.3.4. Kedilerdeki yaygınlığı

Kediler *T. gondii*'nin gelişmesinde önemli bir rol oynar ve oocystlerin gelişip atıldığı tek son konaktır. Sokak kedileri ve yabani kedilerle yapılan serolojik araştırmaların sonuçları; kent merkezleri ile kırsal alanlarda yaşayan evcil kedilerle yapılan çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur (Tenter ve ark 2000). Toxoplasmosis kedilerin çoğunda asemptomatik olarak seyrederek yaygın olarak akut, subakut ve kronik enfeksiyonlar genç ve bağışıklığı zayıf olan son konaklarda kaydedilmiştir. Enfekte kedilerde başlangıç belirtileri letarji ve geçici bir ateştir. Antibiyotik tedavisine rağmen, birçok kedide iştahsızlık, solunum güçlüğü ve diğer pnömoni belirtileri görülmekle birlikte, öksürük ve plevral effüzyona daha az rastlanabilir. Özellikle daha yaşlı kedilerde hepatit, pankreatit ve merkezi sinir sistemi (MSS) belirtileri (felç, refleks kaybı) de gözlenebilir. Diyare daha genel bir belirtidir. Kedi yavrularında viral solunum yolu hastalığı ve sekonder enfeksiyonlarla birlikte ağır bir enterik tabloya yol açabilir. Oküler semptomlar yaygın olup retinit tanımlanabilir. Hastalığın prevalansı kedi, koyun, keçi ve domuzlarda yüksek, sığırlarda ise düşüktür. Kedilerdeki toxoplasmosis Amerika Birleşik Devletleri'nde %15-58, tüm dünyada ise %25-100 oranında saptanmıştır (Enstitü 2005). Bir popülasyondaki kedilerin yalnızca %1'inin, yaşamlarının herhangi bir döneminde oocyst salgıladığı tespit edilmiştir (Hill ve Dubey 2002).

Huang ve ark (2002), Japonya'da evcil kediler üzerinde yaptıkları bir çalışmada toxoplasmosis için hassas ve spesifik bir serodiyagnostik teşhis metodu olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testinin sonuçları ile Lateks Aglutinasyon testinin (LAT) sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Test edilen 192 örneğin 42'si (%21,9) ELISA testi ile pozitif bulunmuştur. LAT ile 42 pozitif örneğin 39'u pozitif olarak saptanmıştır. Sonuçlar ELISA testinin kedi toxoplasmosisinin belirlenmesinde faydalı bir test olabileceğini göstermiştir.

Belçika'da De Craeye ve ark (2008) tarafından İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) testi ve iki farklı antijenin (SAG1 ve TLA antijeni ile) kullanıldığı ELISA metotları ile anti-*Toxoplasma* antikorlarını tespit etmek için yapılan araştırmalarda,

farklı yaşlardaki 567 ev kedisinin %25'i IgG ve/veya IgM açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Yüzey antijeni 1 (SAG1) ve TLA ELISA'nın duyarlılıklarını ve spesifikliklerini sırasıyla %84,1 ve %88,6 olarak saptamışlardır. Seroprevalans yaşla birlikte artarak 12 aylıktan küçük olan kedilerde %2 iken, 7 yaşına kadar olan kedilerde ise %44'e kadar yükselmiştir.

*Toxoplasma gondii* antikorlarının varlığı ile ilgili LAT kullanılarak yapılan serolojik bir araştırmada ise, 592 kedinin 65'inde (%11,0) ve 427 köpeğin 40'ında (%9,4) titreleri 1:64-1:2048 arasında değişen antikorlar belirlenmiştir. Dişilerde erkeklere göre daha yüksek enfeksiyon tespit edilmiştir. Bangkok metropol bölgesinde yaşayan her iki sokak hayvanının birinde *T. gondii* enfeksiyonu yaygın olarak gözlenmiştir. Bu nedenle, parazitin insan ve hayvanlara bulaşmasını önlemek için sokak kedi ve köpeklerinin sayısını kontrol etmek gerektiği kaydedilmiştir (Jittapalapong ve ark 2007).

*Toxoplasma gondii* antikorları yönünden Portekiz'de evcil kedilerde Modifiye Aglutinasyon testi (MAT) kullanılarak 207 kedinin 76'sı pozitif bulunmuştur. Erkek ve dişiler arasındaki farklılıkların anlamlı olmadığı, seroprevalansın yaşa bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Tek başına yaşayan kediler (%13,8) ile birlikte yaşayan kediler (%39,4) arasında, tamamen iç mekanlar (%7,7) ya da dış mekanlarda (%45,4) yaşayan kediler arasında anlamlı farklılıklar bulunduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, yalnızca ticari konserve veya kurutulmuş gıda ile beslenen kediler (%22,9) ile çiğ veya az pişmiş et ve / veya iç organ (sakatat) ile beslenen kediler (%53,5) arasında da anlamlı farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir (Lopes ve ark 2008).

İsviçre'de 252 kedi (44 sokak kedisi, 171 evcil kedi, 37 gastrointestinal hastalıkları olan kedi) ile yapılan bir araştırmada *T. gondii* oocystlerinin prevalansı koprolojik metotlarla incelenmiş ve ardından da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile oocystlerin türe özgü karakterizasyonu yapılmıştır. Kedilerin %0,4'ünde oocyst bulunduğu bildirilmiştir (Berger-Schoch ve ark 2011).

Modifiye aglutinasyon testi (MAT) ile yapılan başka bir çalışmada 42 kedinin 21'inde (%50) *T. gondii* antikorları belirlenmiştir. 42 kedinin canlı dokusu ve 360 kedinin dışkısı parazit izolasyonu yapabilmek için farelere inoküle edilmiş, ancak seropozitif olarak belirlenen 8 kedinin dokusu verilen farelerden ve dışkı verilen bir fareden izolasyon yapılabilmektedir (Yang ve ark 2015).

Toxoplasmosisin seroprevalansını belirlemek için Brezilya'da MAT ile yapılan bir araştırmada da 237 kedinin 84'ünde (%35,4) *T. gondii* tespit edilmiştir.

Seropozitif olan kedilerin 71'inden alınan farklı organ ve kas örnekleri pepsin içinde sindirilerek farelere verilmiş ve 47 kedinin kas homojenatında *T. gondii* saptanmıştır. Mikroskopik muayene sonucu oocyst tespit edilen 237 kedinin üçü (%1,3) dışkıında bulunan oocystlerin farelere inokülasyonu yapılarak sonuç teyit edilmiştir (Pena ve ark 2006).

Li ve ark (2015) tarafından, Çin'de yapılan bir çalışmada IgG antikorları kedilerin %63,16 (12/19)'sında, IgM antikorları ise kedilerin %21,53 (4/19)'ünde saptanmıştır. Bunun dışında, antijeni (CAG) sirküle eden *Toxoplasma* %10,5 oranında (2/19) tespit edilmiştir.

Ankara'da 99 kedi *T. gondii* antikorları yönünden Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve IFA testi kullanılarak, üç faktörün (yaş, cinsiyet ve iç mekan/ dış mekan) yayılışa olan etkisini belirlemek amacıyla incelenmiştir. 99 serumdan 40'ı (%40,3) SFDT ile pozitif bulunmuştur. Bir yaşın altındaki üç kedide (%13,6), 1-2 yaş arasındaki 22 (%47,8) kedide, 2 yaşından büyük 15 kedide (%48,4) pozitiflik tespit edilmiştir. İncelenen 61 dişi kedinin 27'si (%44,2), 38 erkek kedinin 13'ü (%34) pozitif bulunmuştur. İç mekandaki kedilerin %30,8'i, dış mekandaki kedilerin ise %52,8'i seropozitif bulunmuştur. IFA testi ile toplam 34 kedinin %34,3'ünde pozitiflik belirlenirken, 24 dişi (%39,3) ve 10 erkek kedi (%26,3) pozitif bulunmuştur. İç mekandaki kedilerde seroprevalans %23,1, dış mekandakilerde ise %41,7 olarak tespit edilmiştir. Seropozitiflik arasındaki farkın yaş ile anlamlı olduğu, ancak yaşama alanına göre anlamlı olmadığı kaydedilmiştir (Özkan ve ark 2008).

Niğde'de, toxoplasmosis prevalansını belirlemek için yapılan bir araştırmada Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile 72 sokak kedisinden 55'i seropozitif bulunmuştur. Seropozitiflik erkek kedilerde %77,1, dişi kedilerde %75,7 olarak belirlenmiştir (P>0.05). Dışkı muayenelerinde *Isospora spp.* (%12,5) ve *Eimeria spp.*(%4,1) tespit edilirken dışkı örneklerinde *T. gondii* oocystlerine rastlanmamıştır. Ayrıca dışkılarda *Toxocara cati* (%15,2) ve *Toxascaris leonina* (%20,8) bulunduğu bildirilmiştir (Karatepe ve ark 2008).

Brezilya Sao Paulo'da 400 evcil Siyam kedisi IFA testi ile *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşan antikorlar yönünden incelenmiş ve kedilerin 100'ünde (% 25, titres  $\geq 64$ ) enfeksiyon tespit edilmiştir. Enfeksiyonun kedilerde yaşla ilişkili olduğu, bir yaşından küçük kedilerin %13,2'sinde, daha büyük yaşlardaki kedilerin ise %39,2'sinde bulunduğu kaydedilmiştir (Bresciani ve ark 2007).

Hollanda'da 450 evcil kedide *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansı indirekt ELISA ile incelenmiş ve seropozitiflik oranı genç kedilerde %18,2, 4 yaşına kadar olan kedilerde ise %20-30 oranında tespit edilmiştir (Opsteegh ve ark 2012).

Japonya'da Tokyo'nun kent merkezlerinde ve kırsal alanlarında 1999-2001 yıllarında 233 kedi ve 219 köpek, 2009-2011 yıllarında 104 kedi ve 106 köpek olmak üzere 337 barınak kedisi ve 325 barınak köpeği LAT kullanılarak incelenmiştir. Toxoplasmosis kedilerde 1999-2001 yılları arasında %5,6 (233'ten 13'ü) ve 2009-2011'de %6,7 (104'ten 7'si) oranlarında tespit edilirken, köpeklerde ise sırasıyla %1,8 (219'undan 4'ü) ve %1,9 (106'sından 2'si) olarak tespit edilmiştir. Her iki zaman süresince kırsal alanlarda yaşayan kedilerde kaydedilen yüksek seropozitiflik, kentsel alanlarda yaşayan kedilerle kıyaslandığında anlamlı olarak kaydedilmiştir (Oi ve ark 2015).

Panama'nın çeşitli metropol bölgelerindeki 120 ev kedisinde *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansını belirlemek için indirekt ELISA testi kullanılmıştır. IgG antikorlarının seroprevalansı %25 olarak bildirilmiştir (Rengifo-Herrera ve ark 2017).

Györke ve ark (2011), Romanya'daki kedilerde *T. gondii*'ye karşı gelişen IgG antikorlarını saptamak için altı serolojik testi (bir ticari ? ve in house ELISA, ImmunoComb, IFA testi ve MAT) karşılaştırmışlardır. İnceleme, ticari ELISA'nın en yüksek duyarlılığa (% 95,7-%97,1) ve spesifikliğe (%97,3-%97,6) sahip olduğunu göstermiştir. Ticari ELISA ile 236 kedinin 111'i (%47) pozitif bulunmuştur. Yetişkin kediler, çoğunlukla karışık beslenen kediler, dış mekana erişimi olan kediler ve kırsal alanda yaşayan kedilerde yüksek seropozitiflik kaydedilmiştir.

Kuzey ve Batı Irak'ta bulunan askeri üslerden yakalanan sokak kedilerinin insanlarda potansiyel bir zoonoz etkeni olan *T.gondii*'yi taşıma risklerini belirlemek amacıyla LAT ile muayeneleri yapılmış ve 237 kedinin %30,4'ünde *T. gondii* enfeksiyonu tespit edilmiştir (Switzer ve ark 2013).

Evcil hayvanlarda toxoplasmosisa karşı gelişen antikorların belirlenmesi için rSAG1 tabanlı indirekt ELISA testinin uygun bir tanı aracı olduğu bildirilmiştir. Japonya'da *T. gondii*'ye karşı oluşan antikorlar yönünden incelenmiş ve 193 kedinin 40'ı (%20,7) rSAG1 tabanlı ELISA ile pozitif olarak tespit edilirken, kedilerin 153'ü (%79,3) negatif bulunmuştur (Kimbata ve ark 2001).

Çin'de *Toxoplasma gondii*'nin teşhisinde immünokromatografik test (ICT), ELISA testi ve Latex Agulasyon testi (LAT) kullanılarak yapılan bir araştırmada,



ICT de %22,9, ELISA da %19,6, LAT da %18,4 oranlarında enfeksiyon tespit edilmiştir (Huang ve ark 2004).

### 1.3.5. Köpeklerdeki yaygınlığı

Mello tarafından 1910 yılında, İtalya Torino'da ilk kez dört aylık bir köpeğin akut viseral toxoplasmosisden öldüğü bildirilmiştir. Parazit karaciğer, akciğer, dalak ve bağırsağın ülserleşmiş bölgelerinden alınan dokuların mikroskopta histopatolojik olarak incelenmesi sırasında fark edilmiştir. Köpeklerde klinik toxoplasmosis, sıklıkla Köpek Gençlik Hastalığının bağışıklık sistemini baskılaması sonucu ortaya çıkabilir. Köpekler, insanlar ve diğer ara konaklar için *T. gondii* enfeksiyonlarının rezervuarıdır. Yapılan çalışmalar da köpeklerde, *T. gondii*'nin görülme oranı farklı ülkelerde %0 ila %100 arasında değişmekte olup toxoplasmosis tüm dünyada yaygındır (Dubey ve Beattie 1988, Dubey 2010).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada 3 ila 10 aylık iki köpeğin dokularında primer ölümcül viseral toxoplasmosis bildirilmiştir. Dokulardaki takizoitler anti-*T. gondii* serumu ile reaksiyona girerken, *Neospora caninum* serumu ile reaksiyona girmemiştir (Pimenta ve ark 1993).

Toxoplasmosis, Akçay ve ark (1950) tarafından Türkiye'de ilk defa bir köpeğin akciğer kesitlerinde saptanmıştır.

Babür ve ark (2007) tarafından Şanlıurfa'daki sokak köpeklerinde SFD testi kullanılarak *T. gondii* seropozitifliği saptanmıştır. İncelenen 80 köpeğin %97,5'i *T. gondii* enfeksiyonu yönünden pozitif bulunmuştur. Toxoplasmosisin erkeklerde %100, dişilerde %96,2 oranında yaygın olduğu tespit edilirken, 0-2 yaş grubunda %100, 3-5 yaş grubunda %98 ve 5 yaş grubunda %93,75 oranında pozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir.

Erzurum'da 72 sokak köpeğinde *T. gondii*'nin seroprevalansı SFD testi ile araştırılmış, %97 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Bir yaşlı ve daha küçük köpeklerin %82'si, daha yaşlı köpeklerin ise hepsi pozitif bulunmuştur. Erkeklerde %100, dişilerde ise % 95,5 oranlarında enfeksiyon tespit edilmiştir (Balkaya ve ark 2010).

Kocaeli'de SFD testi kullanılarak yapılan bir araştırmada, 116 ev köpeği ile sokak köpeği incelenmiş ve 81(% 69,8) köpekte seropozitiflik tespit edilmiştir. Erkeklerde %59,6, dişilerde %78,1 oranında seropozitiflik tespit edilirken ( $p<0.05$ ),

ev köpeklerinde %62,5 ve sokak köpeklerinde %71,7 seropozitiflik bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Yaşa göre seropozitiflik 0-1 yaşındaki köpeklerde %68,2, 1-3 yaşlarındaki köpeklerde %75,6 ve 3 yaşın üstündeki köpeklerde %62,5 olarak bulunmuştur (Şimşek ve ark 2006).

SFDT kullanılarak Sivas'da bulunan 60'ı ev, 60'ı sokak köpeği olmak üzere toplam 120 köpek *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansını belirlemek amacıyla incelenmiştir. Köpeklerin 115'i (%95,8) pozitif bulunmuş, erkeklerde %95,6, dişilerde %96,2 oranında enfeksiyon tespit edilirken, ev köpeklerinde %96,7, sokak köpeklerin de ise %95,0 oranında enfeksiyon bulunmuştur. 0-2 yaşındaki köpeklerin %93,9'unda, 3-5 yaşlarındaki köpeklerin %95,4'ünde ve 6 yaş üstündeki köpeklerin ise %100'ünde enfeksiyon tespit edilmiştir. Köpeklerin parazitin epidemiyolojisinde önemli bir rol oynadığı, veterinerlik ve insan sağlığı açısından bir risk faktörü olarak görülmesi gerektiği kaydedilmiştir (Altay ve ark 2013).

Van'da SFDT ile *T. gondii* prevalansı araştırılmış ve 69 köpeğin (32 erkek, 37 dişi) 40'ında (%57,9) antikör tespit edilmiştir. Ev köpeklerinin 14'ü (%40), sokak köpeklerinin 26'sı (%76,4) seropozitif bulunmuştur. Sonuçlar seropozitifliğin yaşla ilişkili olduğunu ve ileri yaşlarda artış gösterdiğini, cinsiyetin ise anlamlı bir şekilde etkilemediğini göstermiştir. Köpeklerdeki *T. gondii* prevalansının yüksek olması, insan ve hayvan sağlığı açısından büyük bir sağlık riski teşkil etmesinden dolayı önleyici tedbirlerin alınması gerektiği bildirilmiştir (Babür ve ark 2007).

Ankara'da *T. gondii* ve *Leishmania infantum*'un seroprevalansını belirlemek için yapılan çalışmada, SFDT ile 116 sağlıklı sokak köpeğinin 72'sinde (%62,06) *T. gondii* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Erkek ve dişiler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Yaş grupları arasında farklılıklar bulunduğu ve bir yaşın atındaki köpeklerde %61,1, 1-3 yaş grubunda %56,3, 3-5 yaş grubunda %80, 5 yaşından büyüklerde ise %55,6 oranlarında enfeksiyon bulunduğu bildirilmiştir (Aslantas ve ark 2005).

Ankara'da yapılan diğer bir çalışmada SFDT ile 107 sokak köpeğinin 58'i (%54) seropozitif olarak bulunmuştur (Şahal ve ark 2009).

Diyarbakır'da köpeklerde toxoplasmosis ve layşmanyazın prevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada, SFDT ile 100 sağlıklı köpekten 94'ü (%94) toxoplasmosis açısından seropozitif bulunmuştur. Erkek ve dişiler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (İçen ve ark 2010).

Elazığ'da sokak köpeklerinde *T. gondii*'nin seroprevalansını belirlemek için SFDT ile yapılan başka bir araştırmada, 53 köpekten 40'ı (%75,4) seropozitif bulunmuştur. Serumlarda 1/16 titrede 17 (%42,5), 1/64 titrede 12 (%30), 1/256 titrede 8 (%20) ve 1/1024 titrede 3 (%7,5) oranlarında antikor tespit edilmiştir (Aktaş ve ark 1998).

Kars'ta yapılan araştırmada, yine SFDT ile köpeklerde *T. gondii*'nin seroprevalansı %96,1 olarak tespit edilmiştir. Dişi köpeklerin %96,3'ü, erkek köpeklerin %93,3'ü pozitif bulunmuştur. Yaşa göre seropozitiflik, 1-3 yaş grubunda %94,8, 4 yaş ve üzerinde %96,3 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bu bölgede yüksek bir toxoplasmosis enfeksiyonu olduğunu göstermiştir (Gıcık ve ark 2010).

Sivas'da Kangal köpeklerinde toxoplasmosis ve layşmanyaz yönünden yapılan araştırmada, 50 Kangal köpeğinden 48'i SFD testi ile *T. gondii* açısından seropozitif bulunmuştur. Toxoplazmozda titreler 1:16'dan 1:1024'e kadar değişirken, 1'i 1:128 titrede ve 5'i 1:64 titrede pozitif bulunmuştur. Enfeksiyonun yayılışında köpeklerin cinsiyetinin ve yaşının anlamlı bir etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Kılıç ve ark 2008).

Doğan ve ark (2014), Eskişehir'de *T. gondii* enfeksiyonunu tespit etmek için SFD testi ile ve IFA testi kullanmışlar, SFD testi ile %54,1 (1/16 ve üzeri titrede), IFA testi ile % 19 oranında düşük titrede (1/16 ve 1/64 titrede) seropozitiflik tespit etmişlerdir. Cinsiyet, yaş ve ırkın yayılışta anlamlı bir etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir.

Konya'da bulunan 164 sokak köpeğinden alınan serumlar, *T. gondii* antikorlarını tespit etmek amacıyla incelenmiş, SFD testi ile %64,02, IFA testi ile %66,46, Modifiye Aglutinasyon testi ile %59,14 oranlarında enfeksiyon tespit edilmiştir. Serumlardan 98'i (%59,75) hem IFA testi hem de SFD testinde pozitif, 48'i de (%29,26) negatif bulunmuştur. Hem IFA testi hem de MAT tarafından serumların 78'inde (% 47,56) pozitiflik, 36'sında (%21,95) negatiflik, hem MAT hem de SFD testi ile 72'sinde (%43,90) pozitiflik, 34'ünde (%20,73) negatiflik tespit edildiği bildirilmiştir (Sevinç ve ark 2000).

Konya'da yapılan diğer bir araştırmada rekombinant TgSAG2 antijeni ile uygulanan indirekt ELISA metodu ile köpeklerin %19,8'inin seropozitif olduğu belirlenmiştir (Zhou ve ark 2016).

Kırıkkale'de 121 köpeğin kan örneklerinde *N. caninum* IgG antikorlarının tespit edilmesi için, IFA testi kullanılmış, pozitif serum örnekleri SFD testi ile *T.*

*gondii* yönünden incelenmiş, 35 *N.caninum* seropozitif köpekten 19'u (%54,3) 1/16 ve daha yüksek titrelerle *T.gondii* yönünden de pozitif bulunmuştur (Yıldız ve ark 2009).

İstanbul'un beş bölgesinde *T.gondii* enfeksiyonunu belirlemek amacıyla yapılan IFA testi ile 150 sokak köpeğinin 77'si (%51,3) seropozitif bulunmuştur. Bölgeler arasında anlamlılık farklılık olduğu tespit edilmiştir. Yaş ve cinsiyet arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sonuçlar insanlar için toxoplasmosis yönünden, köpeklerin potansiyel bir risk oluşturduğunu göstermiştir (Öncel ve ark 2007).

Brezilya'da ölü doğan yavru köpekler *Brucella canis*, *Ehrlichia canis*, *N. caninum* ve *T. gondii* gibi fırsatçı patojenler yönünden IFA testi kullanılarak incelenmiş, 41 köpeğin %78,6'sında *T. gondii* tespit edilmiştir (Tagues ve ark 2016).

Vietnam'ın kırsal kesimlerinde 42 köpekte *T. gondii*'ye karşı oluşan antikorları saptamak için MAT ile yapılan bir araştırmada, 42 köpekten 21'inde (%50) pozitiflik tespit edilmiş, altı köpekte 1:20, yedi köpekte 1:40, iki köpekte 1:80, iki köpekte 1:160, iki köpekte 1:320, bir köpekte 1:640 ve bir köpekte 1:1280 ve daha yüksek titrelerde pozitif sonuç alınmıştır. Seropozitif köpeklerden alınan kalp, dil ve beyin dokuları kedi ve farelere verilerek yapılan biyo-deneysel, köpek dokuları verilen sekiz kedide *T. gondii* izole edilmiştir (Dubey ve ark 2007).

İspanya'nın Endülüs ve Ceuta bölgelerindeki köpeklerde *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansını ve risk faktörlerini belirlemek için, modifiye MAT kullanılarak yapılan araştırmada 769 köpekten 235'i (%30,6) pozitif bulunmuştur. MAT eşik değeri 1:25 alınarak, köpeklerin 91'i 1:25 titrede, 43'ü 1:50 titrede, 84'ü 1:100 titrede ve 17'si 1:500 ve üzeri titrelerde pozitif bulunmuştur. Köpek toxoplasmosisinde köpeğin avlanma aktivitesi, yaş ve vücut büyüklüğünün önemli risk faktörleri olduğu bildirilmiştir (Cano-Terriza ve ark 2016).

Meksika'nın Veracruz şehrinde köpeklerde toxoplasmosisin prevalansını tespit etmek için MAT (eşik değeri:1:25) kullanılarak yapılan araştırmada, 101 köpekten 68'i (% 67.3), (16'sı 1:25, 8'i 1:50, 9'u 1:100, 10'u 1:200, 10'u 1:400, 10'u 1:800, 3'ü 1:1600 ve 2'si 1:3200 veya daha fazla titrelerde) seropozitif bulunmuştur. Sonuçlar bu bölgede yüksek oranda *T. gondii* kontaminasyonu olduğunu, bunun da halk sağlığını etkileyebileceğini insanlarda toxoplasmosisa karşı önleyici tedbirlerin alınması gerektiğini göstermiştir (Alvarado-Esquivel ve ark 2014).

Çin'de 328 ev köpeğinde *T. gondii* seroprevalansı indirekt hemagglutinasyon antikor (IHA) testi ile %10 bulunmuştur. Cinsiyet, yaş ve bölgelerin yayılıştta çok anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Toxoplasmosis yönünden Ev köpeklerinin, halk sağlığı için potansiyel bir risk oluşturduğu kaydedilmiştir (Yang ve ark 2013).

Çin'in Guangzhou şehrinde, sokak ve ev köpeklerinde *Toxoplasma* antikorlarını tespit etmek amacıyla ELISA kullanılarak yapılan araştırmada, 36 sokak köpeği ve 114 ev köpeği olmak üzere toplam 150 hayvan incelenmiş ve seropozitiflik %21,3 olarak saptanmıştır. Erkek ve dişiler arasında anlamlı bir fark bulunmamış, sokak köpeklerinde (%33,3) ev köpeklerine (%17,5) göre daha fazla enfeksiyon bulunduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark 2010).

Panama'daki 456 ev köpeğinde *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansı, indirekt ELISA testi kullanılarak incelenmiştir. IgG antikorlarının seropozitifliği %32,23 bulunmuştur. Köpek toxoplasmosisinin bu bölgede yüksek oranda bulunduğu ve yaşla birlikte arttığı bildirilmiştir (Rengifo-Herrera ve ark 2017).

Serolojik ve moleküler testler kullanarak, Çin'de 364 köpek serumu ve 432 köpek karaciğer dokusu örneği *T. gondii* enfeksiyonuyönünden incelenmiştir. ELISA ile köpeklerin %51,9'u seropozitif bulunmuştur. Semi-nested PCR ile incelenen karaciğer doku örneklerinin %8,6'sında parazit DNA sı tespit edilmiştir (Jiang ve ark 2015).

Çin'de *T.gondii*'nin çevreye bulaştırılmasında önemli rol oynayan Rakun köpekleri (*Nyctereutes procyonoides*), semi-nested PCR kullanarak, parazitin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi açısından incelenmiş, 314 beyin dokusu örneğinden 35 (%11,15)'i pozitif bulunmuştur (Zhou ve ark 2017).

İran'da farklı bölgelerden temin edilen 245 köpek serumu, indirekt ELISA (30 kDa) ve IFA testi ile toxoplazmoz yönünden incelenmiş, IFA testi ile 73 köpekte 1:16-1:1024 titrelerde pozitiflik tespit edilmiştir. ELISA testi ile 80 köpekte seropozitiflik belirlenmiş, testin duyarlılığının %94,52 ve spesifitesinin %93,60 olduğu bildirilmiştir. Toxoplasmosisa karşı oluşan antikorlar arasında herhangi bir çapraz reaksiyon bulunmadığı kaydedilmiştir (Hosseininejad ve ark 2009).

### **1.3.6. Diğer evcil hayvanlardaki yaygınlığı**

*Toxoplasma gondii* dünyanın her yerinde yaygın olup, hayvanlarda ve insanlarda abort ve konjenital bozukluklara neden olabildiğinden veteriner ve insan

hekimliği açısından öneme sahiptir. İnsanlarda seroprevalans değerlendirmeleri, çeşitli ülkelere, bir ülke içerisindeki çeşitli coğrafi bölgelere ve yine benzer bölgelerde yaşayan çeşitli etnik gruplara göre büyük oranda farklılıklar göstermektedir. *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşan antikorlar, farklı insanlarda %0 ila %100 arasında değişmektedir. Bu nedenle, *T. gondii* enfeksiyonları üzerine yapılan epidemiyolojik araştırmalarda antikor tanısı için çeşitli testler kullanılmaktadır. Bu testler hassasiyet, spesifiklik ve analitik değerler açısından farklılık göstermektedir. Bu nedenle aynı nüfus, yaş, kültürel alışkanlıklar, çevresel ve diğer faktörler arasındaki çeşitli yaygınlık seviyeleri karşılaştırılmıştır. Son değerlendirmelerin, serolojik testlere bağlı olarak, gebelik yoluyla primer maternal enfeksiyon görülme sıklığının, dünyadaki çeşitli popülasyonlarda 1-310/10 000 gebelik arasında değiştiğini gösterdiği ileri sürülmektedir (Dubey 2010).

Yapılan serolojik araştırmalar, sağlıklı erişkinlerin %3 ila %80'inin *T.gondii* enfeksiyonuna maruz kaldığını göstermektedir. Gebe olmayan, bağışıklığı yeterli olan insanların %80 ila %90'ında asemptomatik seyreder (Enstitü 2005). Ayrıca, *T. gondii* enfeksiyonu organ veya kemik iliği naklinden de kaynaklanabilir. Aynı zamanda AIDS'li insanlarda da önemli bir fırsatci parazittir. Dolayısıyla, genellikle *Toxoplasma* takizoitlerinin horizontal yolla bulaşması epidemiyolojik araştırmalarda önemli değildir. AIDS hastalarında, toksoplazmik ensefalit gelişiminin, HIV ile enfeksiyon dönemi boyunca seropozitif hastaların%40'ına ulaştığı kaydedilmiştir (Tenter ve ark 2000).

*Toxoplasma gondii* doku kistleri, enfekte olmuş domuz, koyun ve keçi dokularında yaygın olarak bulunurken; at, tavşan, köpek ve kümes hayvanlarında daha az yaygındır. Sığırlarda %92 ve mandalarda %20'ye kadar antikorlar bulunmasına rağmen, etlerinde nadiren parazite rastlanmaktadır. Hayvancılık yönetimi ve üretimi, mezbaha hijyeni tedbirleri, gıda prosedürü ve teknolojisini, çevrede çok sayıda kedi bulunması, çeşitli insan alışkanlıkları ve coğrafi bölge gibi *T. gondii* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi üzerinde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır (Lindsay ve Dubey 2007).

Toksoplasma en çok evcil hayvanlardan kedi, koyun, keçi ve domuzlarda görülmektedir. Yaban tavşanı, yaban domuzu, geyik ile diğer geyikgiller, kangurular ve ayılar da dahil olmak üzere birçok hayvanın etlerinde bulunan *T. gondii*'nin latent doku kistleri insan toxoplasmosisinun kaynağı olarak düşünülmektedir (Tenter ve ark 2000). Ayrıca, *T.gondii* nedeniyle oluşan klinik hastalık belirtileri ve abort,

koyunlarda daha sık, domuzlarda oldukça az ve sığırlarda ise nadir olabilmektedir. *T.gondii* koyunlarda ve insanlarda ağır şekilde seyrederek (Fayer 1981).

Yalova'da bir yaşından büyük 63 koyunda *T. gondii* antikorlarını tespit etmek amacıyla SFD testi ve Lateks Aglütinasyon Testi (LAT) kullanılarak yapılan araştırmada SFDT ile %66,66, LAT ile %65,08 oranlarında enfeksiyon bulunmuştur. İki test arasındaki uyumluluğun %73,01 olduğu bildirilmiştir (Öncel ve ark 2005).

Ankara'da atlarda *T. gondii* seroprevalansı, SFD testi ile 23'ü 1:16 (%82,1), 5'i 1:64 (%17,8) titrede olmak üzere %28 olarak bildirilmiştir (Güçlü ve ark 2007).

SFD testi ile Samsun ve Afyon'da bulunan mandalarda *T. gondii* enfeksiyonu araştırılmış, 1:16 ve daha yüksek titrelerde hayvanların %87,79'u pozitif bulunmuştur. Yaş ve cinsiyetler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Beyhan ve ark 2014).

Karatepe ve ark (2010) tarafından Niğde'deki atlarda spesifik *T. gondii* antikorlarını tespit etmek için SFD testi kullanılarak yapılan bir araştırmada, 8 atta 1:16, 1 atta 1:64 titrede olmak üzere toplanan 125 serumun 9'unda (%7,2) enfeksiyon bulunmuştur. Yaş grupları ve cinsiyetler arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.

SFD testi kullanılarak, Niğde'de bulunan 105'i evcil (55 dişi, 50 erkek) ve 111'i yabani (53 dişi, 58 erkek) güvercin, spesifik *T. gondii*'nin antikorlarını tespit etmek amacıyla incelenmiştir. Araştırmada 1:16 titrede 105 ev güvercininden biri (%0,95) ve yabani güvercininden biri (%0,90) seropozitif bulunmuştur (Karatepe ve ark 2011).

Tavuklar, toxoplasmosisin yayılmasında oldukça önemli konaklardan biri olarak görülmektedirler. Çünkü enfekte olan tavuğun az pişmiş etinin yenmesi kediler ve insanlar için iyi bir enfeksiyon kaynağıdır. Organik çiftliklerde yetiştirilen tavuklarda %100'e kadar serbest alanlarda yemlenerek yetiştirilen tavuklarda %30-50 arasında enfeksiyon bulunabilmektedir (Dubey 2008).

Konya'da yumurta tavuklarında, spesifik *T. gondii* antikorlarını tespit etmek amacıyla Sabin Feldman Boya testi (SFDT) kullanılarak yapılan bir araştırmada, 287 yumurta tavuğunun %0,34'ü pozitif bulunmuştur (Altınöz ve ark 2007).

Adana'da çeşitli yaş ve cinsiyete sahip sığırlarda toxoplasmosis seroprevalansı SFD testi ile araştırılmış ve %56,06 seropozitiflik tespit edilmiştir. Yaşlar arasında anlamlı fark olmadığı kaydedilmiştir (Yücel ve ark 2014).

Kars'taki atlarda *T. gondii*'nin yayılışı SFD testi ile kullanılarak araştırılmış, 189 at serumunun 39'unda (% 20,6) antikor tespit edilmiştir (Akca ve ark 2004).

Bazı ülkelerde eşeklerin etleri ve sütleri insanlar tarafından tüketilmektedir. Modifiye aglutinasyon testi (MAT) ile Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 373 eşekte yapılan serolojik araştırmada seropozitiflik (25 ila  $\geq 200$ ) titreler ile) %6,4 olarak bulunmuştur. Seropozitiflik dişilerde %7,0 ve erkeklerde %4,1 olarak tespit edilmiştir. İki yaşından küçük hayvanlarda parazitin doğum sonrası bulaştığını gösteren seropozitifliğe rastlanmadığı bildirilmiştir (Dubey ve ark 2014).

Kanada kazlarında *T. gondii*'ye karşı oluşan spesifik antikorları belirlemek için Modifiye Aglutinasyon testi (MAT) (eşik değer 1:25) kullanılarak yapılan çalışmada, 169 kazın 12'sinde enfeksiyon tespit edilmiştir (Verma ve ark 2016).

Amerika Birleşik Devletleri'nin Maryland şehrinde kesimhanede kesilen 383 kuzunun kalbinden alınan kan, Modifiye Aglutinasyon testi (MAT) ile *T. gondii* seropozitifliğini belirlemek amacıyla incelenmiştir. Kuzuların 104'ünde (%27,1) seropozitiflik (MAT, 1:25 veya daha fazla) bulunmuştur (Dubey ve ark 2008).

Bir başka çalışmada, ABD'de 234 keçinin kalbinden alınan kanda *T. gondii* seropozitifliğini belirlemek amacıyla Modifiye Aglutinasyon testi (MAT) kullanılarak yapılan araştırmada, keçilerin 125'inde (%53,4) antikor bulunduğu tespit edilmiştir (Dubey ve ark 2011).

Etiyopya'da develerde *T. gondii* enfeksiyonunun serodiyagnozu Direkt Aglutinasyon testi (DAT) ve indirekt ELISA testi kullanılarak incelenmiş, seropozitiflik oranı Direkt Aglutinasyon testi (DAT) ile %49,62 (220/455) ve indirekt ELISA ile %40,49 (179/451) olarak tespit edilmiştir. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu 8 yaşından büyük develerde %56,52, 4-8 yaş arası develerde %52,97, 4 yaşından küçüklerde (%34,26) oranlarında bulunmuştur (Gebremedhin ve ark 2014).

Etiyopya'da P30 protein antijeni kullanılarak yapılan indirekt ELISA testi ile koyunların %70,48'i pozitif bulunmuştur (Gebremedhin ve ark 2013).

Batı Hint Adalarında (Antillerde) mezbahalarda kesilen domuz, koyun ve keçilerden toplanan serum, kalp dokusu ve et suyunun *T. gondii*'ye karşı oluşan reaktif antikorlar yönünden incelenmesinde In-house ELISA kullanılmıştır. İncelenen serumlarda domuzların %48'inde, koyunların %26'sında ve keçilerin %34'ünde, kalpten elde edilen et sularında domuzların %55, koyunların %22 ve keçilerin %31'inde antikorlar tespit edilmiştir. Kalp dokusunda Quantitative PCR ile



yapılan incelemelerde domuzların %21'inde, koyunların %16'sında, keçilerin %23'ünde *T. gondii*'nin DNA'ları bulunmuştur (Hamilton ve ark 2015).

Çin'in Guizhou şehrindeki domuzlarda *T. gondii* (CAG)(sirkülasyon antijeni) ELISA ile %16,9 (18/70) olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında anti-*T. gondii* IgG'nin varlığı %70 (49/70) olarak tespit edilirken, anti-*T. gondii* IgM'ye rastlanmamıştır (Li ve ark 2015).

Hindistan'da rec-SAG2-ELISA metodu ile koyunların %50'sinde, keçilerin %41,26'sında ve sığırların %64,44'ünde pozitiflik tespit edilmiştir. Spesifiklik (%85,71-91,43) iken, duyarlılık (rec-SAG2-ELISA) (%81,25-87,10) olmuştur (Singh ve ark 2015).

İsviçre'de bulunan 250 koyun, 406 sığır, 270 evcil ve 150 yaban domuzunda *T. gondii*'ye özgü real-time PCR kullanılarak yapılan araştırmada gDNA prevalansı, yaban domuzunda %0,7, domuzda %2,2, koyunda %2 bulunmuştur. Enfeksiyon oranı sığırlarda %4,7 iken, buzağılarda %29,8 olarak tespit edilmiştir (Berger-Schoch ve ark 2011).

Hindistan'daki çiftlik hayvanlarında rekombinant (SAG1) ELISA kullanılarak yapılan araştırmada %71,8 oranında spesifik IgG bulunmuş, testin duyarlılığının %84,38 ve özgünlüğünün ise %87,88 olduğu bildirilmiştir (Sudan ve ark 2015).

#### **1.4. *Toxoplasma gondii*'nin Suşları**

*Toxoplasma gondii* karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Eşeyli üreme yalnızca kedi bağırsağında olurken, eşeysiz üreme birçok omurgalı konakda gerçekleşmektedir. Bu ölçütler olağandışı bir çoğalmaya sebep olmaktadır. *Toxoplasma gondii*'nin I, II ve III olmak üzere üç farklı klonol suşu bulunmaktadır ve tip I suşları insanlar için akut patojeniteye sahip iken, diğerleri daha az patojendir (Halonen ve Weiss 2013). Üç suşun arasında DNA dizisi bakımından genetik farklılıklar (sadece %1-2 ) bulunmaktadır (Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Tip I (RH), Tip II (Prugniud veya Pru, ME49 ) ve tip III suşlarından (VEG) klinik toxoplasmosisda en yaygın olan izolat, tip II suşudur (Howe ve ark 1997). *T. gondii*'nin RH suşu farelerde oldukça virulent ve öldürücüdür, yalnızca domuzlarda orta derecede bir enfeksiyona neden olmaktadır. Ek olarak, inoküle edilen RH suşları konaklarda doku kistleri oluşturmamaktadır. Ayrıca takizoit (VEG) suşundan üretilen *Toxoplasma gondii* oocysti ile beslenen kediler daha sonra oocystleri yaymaktadırlar.

Bu suş AIDS hastalarından da izole edilmiştir (Dubey 1998). T-263 mutant suşu, konaklarda doku kistleri oluştururlar. Şayet bu kistler kediler tarafından alınır, bağırsakta inkomplet gelişmeye maruz kalıp dışkılarda oocyst oluşturamazlar (Araujo 1994).

Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da insan toxoplasmosisi daha çok tip II suşlarından kaynaklanmaktadır (Sibley ve ark 2009). Tip I insan kaynağından nadir olarak izole edilir ve fareler için yüksek derecede virulent özellik taşımaktadır. Tip II insan, koyun ve domuzlardan daha sık izole edilmekte olup, Avrupa'da ve Amerika'da toplanan suşların %80'i fareler için virulent değildir. *Toxoplasma* izolatları arasında nadir olarak bulunan Tip III (rekombinant genotipler), yabani hayvanlar arasında en yaygın olan suştur. Genellikle farelerde tip II'den daha virülanıdır (Darde 2004). Kuzey Amerika'nın yabani hayatında egemen olan (%46,7) yeni bir suş olarak Tip 12 keşfedilmiştir. Tip 12 genetik hattında, su samurundan kaynaklanan tip A ve X suşlarını elde edilmiştir (Dubey ve ark 2011). Tip 12 hattı, haplogrup 12 olarak kabul edilmiştir. Başlangıçta vahşi hayvanlarda mevcut olup, insanlarda seyrek olarak bulunmasına ek olarak yüksek klonal popülasyon değişikliğine sahiptir (Khan ve ark 2011).

*Toxoplasma gondii* suşlarının genotiplendirilmesi amacıyla SAG2 geni kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır. Dünyada PCR-RFLP ile incelenen en az 1500 örnek içinde 189 çeşit genotip keşfedilmiştir (Ajioka ve Sibley 2007).

*T.gondii*'nin GT-1 suşu yedirilen hayvanların (koyun, keçi, at, sığır, domuz, Kanada geyiği, bizon, çakal ve köpek) çeşitli organlarına doku kistleri yayılmıştır. Farelerde enfeksiyon oluşturmak için en yaygın kullanılan suşlar Beverley ve ME-49 suşlarıdır. Fareler için daha az patojenik olan suşlar yavaş üreme yeteneğine sahip olan VEG, ME-49, Beverley, Prugnau ve NTE gibi suşlardır. Daha hızlı çoğalan ve daha fazla doku kisti oluşumuna sebep olan RH ve BK gibi suşlar ise patojenik suşlardır (Dubey ve ark 1998).

Brezilya'da, kedilerde *T. gondii*'nin 46 farklı genotipi izole edilmiştir. 20 genotipte yüksek bir genetik çeşitlilik olmakla birlikte; Tip I, II veya III olarak bilinen klonal soylar belirlenmemiştir. Tavuk, köpek ve kedi gibi çeşitli hayvanlarda (toplam 125 izolat) 48 genotip belirlenmiş ve bu genotiplerden 26'sının tüm konaklarda tek izolata sahip olduğu kaydedilmiştir. 48 genotipin dördü BrI, BrII,

BrIII ve BrIV olarak tanımlanmıştır. *Toxoplasma gondii* popülasyonu yüksek genetik çeşitliliğe sahip iken izolatların hiçbirinde Tip II suşuna rastlanmamıştır. Farelerde mortalite oranlarının incelenmesi ile Tip BrII ve BrIV'ün klonal soylarının orta şiddette virulent olduğu bildirilirken Tip BrI'in oldukça virulent, Tip BrIII'ün ise nonvirulent olduğu bildirilmiştir (Pena ve ark 2008).

Etyopya'da, 26 kedinin kalbinden, 1 kedinin dışkılarından ve 6 kedinin ise dışkı ve dokusundan elde edilen etkenlere ait DNA üzerinde yapılan genotiplendirme çalışmasında, PCR-RFLP ile ToxoDB-1 (Tip II klonal), ToxoDB-2 (Tip III), ToxoDB-3 (Tip II varyant) ve ToxoDB-20 olmak üzere dört genotip bulunmuştur (Dubey ve ark 2013).

ABD'nin, Maryland, Virginia ve Batı Virginia eyaletlerinde 383 kuzuda (<1 yaş) *T. gondii* prevalansı araştırılmıştır. PCR-RFLP ile izole edilen 53 etkenin genotiplendirilmesinde 15 genotip ile 57 suş ortaya çıkarılmıştır. Bu suşlardan biri Tip I, 26'sı (%45,6) Tip II, 8'i (%15,7) Tip III olarak değerlendirilmiştir. Diğer suşlardan 11'inin atipik genotipe sahip olduğu bildirilmiştir. Kuzularda *T. gondii*'nin yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahip olduğu kaydedilmiştir (Dubey ve ark2008).

Portekiz'in Lizbon şehrinde SAG2 tabanlı genotiplendirme ile 41 güvercin ve 164 sokak kedisinin beyin örnekleri incelenmiştir. Yapılan genotiplendirme sonucu 41 güvercinde tip I, tip II, tip III; kedi beyinlerinden ise Tip II ve tip III izole edildiği bildirilmiştir (Vilares ve ark 2014).

Çin'de, PCR-RFLP ile kedi dışkılarından izole edilen *T. gondii*'nin hücre kültüründe gelişen takizoitlerinden DNA genotiplendirmesi yapılmış ve dışkı izolatu olarak ToxoDB-1 bildirilmişken, doku izolatları olarak da ToxoDB-9, ToxoDB-2 ve ToxoDB-17 bildirilmiştir (Yang ve ark 2015).

Kanada kazlarında yapılan bir çalışmada, 12 seropozitif kazın kalbi, *T. gondii* izolasyonu için farelere ve kedilere verilmiş, elde edilen bir izolat hücre kültüründe çoğaltılmış ve hücre kültürü kaynaklı takizoitlerden genetik belirteçler (PCR-RFLP) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Sonuçlar, 5 farklı *T.gondii* genotipinin varlığını göstermiştir (Verma ve ark 2016).

Kore Cumhuriyeti'nde, hasta kanı ile enfekte edilen farelerden *T. gondii* takizoitleri izole edilmiştir. Kore izolatu-1 (KI-1) adında yeni bir suş tanımlanmış ve bu suşun RH suşu ile benzer özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Chai ve ark 2003).

İzmir'de sokak kedilerinde *T. gondii*'nin Tip II, Tip III ve Afrika 1 genotipleri bulunmuştur (Can ve ark 2014).

### **1.5. *Toxoplasma gondii*'nin Teşhisi**

*Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun teşhisinde aşağıda belirtilen çeşitli tanı teknikleri kullanılmaktadır.

#### **1.5.1. Mikroskopik metotlarla Direkt Tanı ve Biyolojik metotlarla etken izolasyonu**

Kesin tanı, hastalık etkeninin görülmesiyle konabileceğine göre tanıya yardımcı olacak muayene materyali iyi seçilmelidir. Özellikle lenf bezi ponksiyonu, beyin omurilik sıvısı, kemik iliği ponksiyonu ve ateşli olgularda kan alınarak yayma veya sürme preparatlar yapılır ve Giemsa ile boyanarak parazit aranır. Eğer alınan muayene materyali bir kaç ml hacimde sıvı ise, bu sıvı santrifüj edilerek çökeltiden preparat hazırlanır ve yine giemsa ile boyanır.

Eğer muayene materyali biyopsi ise doku kesitleri hematoksilin-eozin ile boyanarak incelenir. Parazitler bu sayılan preparatlarda genellikle çekirdekli hücreler içinde, nadiren hücre dışında trofozoit formda görülebilir. Bu şekilde etken aranması ve görülmesi oldukça zordur. *Toxoplasma gondii* trofozoitleri görüldüğü zaman kesin tanı konduğu halde, parazitler görülemediği zaman toxoplasmosis yoktur denilemez.

Alınan muayene materyalinde parazit görülemez ise deney hayvanlarına inokülasyon yöntemi uygulanabilir. Deney hayvanı olarak en fazla beyaz laboratuvar fareleri kullanılır. Laboratuvar faresi bulunamadığı zaman kobay veya hamstere inokülasyon yapılabilir. Toksoplasmoza karşı en duyarlı laboratuvar hayvanı beyaz laboratuvar fareleri olduğundan inokülasyon daima bu hayvanlara yapılır. Deney hayvanları kullanılmadan önce bu hayvanlarda toksoplasmoza karşı direnç bulunup bulunamadığının kontrolü gereklidir.

Hastalardan alınan ponksiyon veya biyopsi materyali ayrıca toksoplazmozun ölüm sebebi olduğu şüpheli olgulardan alınan beyin, akciğer, karaciğer, dalak ve özellikle lenf yumrusu parçaları ezilerek tiroid eriyiğinde %10 süspansiyonları yapılır. Bu süspansiyonlardan farelerin peritonu içine 0,1-0,2 ml ve beyine 0,02 ml verilir. Her inokülasyon için en az üç fare kullanılması gereklidir. Eğer toksoplazmoz pozitif ise, periton içine verilen fareler 5-6 günde, beyin içine verilen fareler 4-5 gün içinde ölürlür. Fareler ölmek üzereyken veya hemen öldükten sonra periton sıvısından bir miktar fizyolojik tuzlu su (FTS) ile karıştırılıp 2. grup farelere Toxoplasma görülsün veya görülmesin pasaj yapılır. Aynı şekilde de beyin dokusu ezilerek yine 2. grup farelere pasaj yapılır. Sonra ölen farelerin periton sıvısı, beyin dokusu ve diğer iç organlarından yapılan sürme preparat veya kesitlerde Toxoplasma trofozoit veya kist şekilleri aranır.

Toxoplasma görülmeden yapılan pasajlara kör pasaj adı verilir ve genellikle 2-3 kör pasajdan sonra Toxoplazmalar deney hayvanında görülebilmektedir (Özcel ve Sermet 1983).

### **1.5.2. Serolojik testler**

Toxoplasmosis tanısında uygulanan serolojik yöntemleri, kullanılan antijene göre sınıflandırıp incelemek daha doğrudur. Çünkü Toxoplasma antijeninin özelliğine göre hasta veya şüpheli organizmada oluşan antikolar aranacaktır. Eğer antikolar aynı olursa o zaman kullanılan yöntemlerin sonuçlarının da birbirine çok yakın olması gerekecektir.

Serolojik tanı yöntemlerinden en fazla kullanılan ve sonuçlarına güvenilen metodlar: 1) Sabin-Feldman boyama yöntemi veya Dye test (SFDT), 2) İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), 3) Kompleman birleşmesi testi (KB), 4) Direkt ve indirekt hemaglutinasyon testi (IHA), 5) Enzim işaretli antikolarla yapılan ELISA testi (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), 6) Modifiye aglutinasyon testi (MAT), 7) Lateks aglutinasyon testi (LAT), 8) Direkt aglutinasyon testi (DAT).

Bu yöntemlerden SFDT ve IFAT yöntemlerini uygularken Toxoplasma trofozoitlerinin kendileri antijen olarak kullanılırlar. Her iki yöntem için, laboratuvarında Toxoplasma infeksiyonunun farelerde devam ettirilmesi gereklidir. Her iki yöntemde de antijenin taze hazırlanması ve kullanılması tercih edilir.

### 1.5.2.1. Sabin-Feldman boyama yöntemi (dye-test)

Bu test ilk olarak 1948 yılında Sabin ve Feldman tarafından tarif edilmiştir. Hasta veya şüpheli kişi serumunda Toxoplasma trofozoit şekillerine karşı oluşan antikorların araştırılmasında kullanılır. Bu test canlı Toxoplasma trofozoit şekillerinin antikorla karşılaştıkları zaman Aktivatör faktör yardımıyla ve alkali ortamda metilen mavisi ile boyanmamaları, antikor olmadığı zaman ise boyanmaları esasına üzerine kurulmuştur (Özcel ve Sermet 1983).

SFDT bugüne kadar Toxoplasmosis tanısında en güvenilir ve duyarlı bir yöntem olarak yerini korumuştur. Akut ve kronik Toxoplasmosis olgularında sonuçlara güvenilmesi ve başka hastalıklarla çapraz reaksiyon vermeyecek kadar özel olması dolayısıyla olanakları yeterli olan laboratuvarlar halen birinci derecede bu testi uygulamaktadırlar. Testin uygulanmasında canlı Toxoplasma trofozoit şekillerinin antijen olarak kullanılması, birçok araştırmacı tarafından tehlikeli ve kullananlar için riskli bulunduğundan laboratuvarlarda devamlı uygulamadan kaçınılmaktadır. Ayrıca komplemana benzeyen ve ancak bazı normal serumlarda yeterli düzeyde bulunan Aktivatörün bulunması kolay olmadığından bu testin uygulanması sınırlı kalmaktadır (Özcel ve Sermet 1983).

Sabin-Feldman boya testinde antijen hazırlamak için, canlı Toxoplasma trofozoitleri 3 gün önce intraperitoneal yolla enfekte edilen beyaz laboratuvar farelerinin periton sıvısından elde edilir. Fare periton sıvısında çok miktarda canlı Toxoplasma bulunması gereklidir. Bu şekildeki fare periton sıvısı doğrudan antijen olarak kullanılmaktadır. Bu testte boya olarak metilen mavisinin %96 lık alkol içindeki %2'lik eriyiği, antikorla karşılaşmayan Toxoplasma takizoitlerinin mavi renge boyanmasında kullanılır. Aktivatör serum, komplemana yakın özelliği olan ve her normal insan kanında yeterli düzeyde bulunmayan bir faktördür. Unat'a göre (39) properdin, magnezyum ve komplemanın bazı fraksiyonlarından oluşmuştur. Remington ve Strannegard'ın çalışmalarına göre, antikor bulunan ortamda aktivatör faktör antikorların parazit zarına tutunmasına ve parazit zarının yer yer eritilmesine sebep olmaktadır (26. 29). Aynı çalışmalarda properdin'e benzeyen bu faktörün ısıya dayanıklı olmadığı, ısıtılan serumların aktivatör özelliğini kaybettiği, ısıtılmamış serum ilavesiyle bu özelliğin geri geldiği invitro ve invivo sistemlerde gösterilmiştir.

Test sonunda, boyanmış takizoitler koyu mavi olarak görünürler, sitoplazmanın kısmi lizisinden dolayı daha yuvarlaklaşmışlardır. Boyanmamış takizoitler ise ilk şekillerini korurlar.

Antikorla birleşen takizoitler alkalen metilen mavisi ile boyanmazlar ise sonuç olumludur (pozitifdir). Serumda antikor yoksa takizoitler koyu mavi renge boyanırlar ve yuvarlaklaşırlarsa sonuç negatifdir. Test sonuçlarının mikroskopik incelemeyle okunmasında takizoitlerin hem boyanmasına hem de şekillerindeki değişikliğe dikkat edilir. Negatif olgularda mikroskop sahasında görülen takizoitlerin hangi oranda boyanmış görülebilecekleri testi uygulayan laboratuvar veya araştırmacının deneyimine göre değişebildiği gibi bu durum bilinen pozitif serum ve negatif serum ve dilüsyonları ile kontrol edilir. Genelde, mikroskop sahasında görülen takizoitlerin %60 veya daha fazla oranda boyanması sonucun negatif olması için yeterlidir. Sonuçta 1/64 ve daha yukarı dilüsyonlardaki pozitif görünüm toxoplasmosis tanısı için yeterli sayılmaktadır.

SF testi uygulamalarında Remington ve arkadaşları (26) bazı ufak değişiklikler yapmışlardır. Testin uygulanışına iyice alışkın olan ve deneyimi bulunan kişiler tarafından metilen mavisi kullanılmadan da test uygulanabilmekte, antikorla Aktivatör serum ortamında karşılaşan takizoitlerin hücre zarındaki değişikliğe ve sitoplasmadaki vakualizasyona bakılarak sonuç okunmaktadır. Çok deneyim gerektiren bu uygulama yanlış yorumlara sebep olabileceği gerekçesi ile pek kullanılmamaktadır.

#### **1.5.2.2. ELISA yöntemi (Enzim İşaretli Anti-globulinlerle Antikor Araştırılması)**

Bu yöntem ilk olarak Engvall ve Perlmann tarafından açıklandıktan sonra (1971), eriyik antijenlerle yapılan diğer testlerin bir karışımı ve en iyisi olarak bildirilmiştir. Antijen olarak canlı takizoitlerden hazırlanan eriyik antijen veya laboratuvar ortamında rekombinant DNA teknolojisi uygulanarak hazırlanan rekombinant proteinler kullanılır. Antijen materyali karbonat-bikarbonat tampon solüsyonu (pH 9.6) ile sulandırılarak kullanılır. Sulandırma derecesi bir seri deneyimle bilinen pozitif serumun sulandırma dereceleri ile önceden saptanırsa test hem daha çabuk uygulanır, hem de sonuçlara daha çok güvenilir. Antijen 1cm<sup>3</sup> de 5 mikrogram protein bulunacak şekilde sulandırılır. Testin uygulanışında

polystrene hemaglutinasyon plakları kullanılır. Bu plaklardaki çukur diplerinin düz olmasına dikkat edilir. 1) polystrene plak çukurları içine önce belli oranda sulandırılmış antijenden 100 mikrolitre konur. Antijenin, polystrene tarafından yeterli düzeyde emilmesi, diğer bir deyişle polystrene çukurlarının antijenle yeterli şekilde kaplanabilmesi için, buzdolabında 24 saat veya 37°C de 2-3 saat bekletilir. Bu şekilde antijen bulunun plaklar buz dolabında kullanılıncaya kadar (1 hafta) bekletilebilmektedir. 2) Antijen bulunun çukurlar, kullanılmadan önce fosfat buffer tampon (PBS, içinde % 0.5 oranında Tween 20 olması gereklidir) ile mümkünse otomatik yıkama makinesi ile 3 kez, bu makina yoksa her çukur 3 kez, 3 dakika beklenecek tampon solüsyon pipetle konup emilmek suretiyle yıkanır. PBS içine Tween 20 yerine %0.02 sodium azide kullanılabilir. 3) Çukurlar içine şüpheli serum, pozitif serum, negatif serum çeşitli sulandırma derecelerinde ve en dış sıradaki çukurlara da sadece PBS konur. Bu şekildeki plaklar 37°C de 30 dakika-2 saat etüvde ve bazı araştırmacılara göre oda ısısında bekletilir. 4)Plaklar tekrar PBS- Tween 20 karışımı ile önceki gibi 3 kez otomatik olarak veya pipetle yıkanır. 5) Enzim işaretli, (Peroxidase veya Alkaline fosfatase) tavşandan elde edilmiş anti-insan/hayvan türü polivalan globulin veya anti-insan/hayvan türü IgG kullanılabilir. Günümüzde daha çok polivalan enzim işaretli anti-insan/hayvan türü globulinlerinin kullanılması tercih edilir. Peroxidase işaretli anti-globulin antikoları ile, alkaline fosfatase işaretli anti-insan/hayvan globulinlerin kullanılması testi uygulayan araştırmacının deneyimine bağlı olmaktadır. Çalışmalar, alkaline fosfatase ile işaretli antiglobulinlerle daha kuvvetli ve görülebilen renk değişikliği elde edildiğini göstermiştir. Bu şekilde enzim işaretli anti-globulinin genellikle 1/500 veya 1/1000 oranında sulandırılmış solüsyonu kullanılır. Bu solüsyondan her çukura yine 100 mikrolitre konur. Enzim işaretli anti-globulinlerin sulandırılmasında PBS ve %1 lik sığır serum albumini veya %3 yağsız süt tozu kullanılmaktadır. Enzim işaretli anti-globulinlerin çukurlara konmasından sonra, plaklar 37°C lik etüvde 2 saat veya oda sıcaklığında 3 saat bekletilirler. 6) Plak çukurları tekrar aynı şekilde 3 kez yıkanır. 7) Bu kez plak çukurları içine enzimle renk reaksiyonu verebilecek substrat hazırlanır. Peroxidase için 80 mgr 5- amino salisitik asit 80 °C de ml saf su içinde eritilir ve 1 N NaOH ile pH 6.0'ya ayarlanır. Bu solüsyondan 9 kısım içinde 1 kısım %0,5 H2O2 ilave edilerek substrat hazırlanmış olur. Alkaline fosfatase enzim için: 1 mgr P-Nitrofenilfosfat, 1 ml diethanolamine buffer pH 9.8 içine konarak



hazırlanır. Bu hazırlanan substat solüsyonundan enzime göre hangisi uygun ise ondan 100 µl miktarında çukurlar içine konur ve peroxidase için oda ısısında 1 saat, alkaline fosfatase içinse 30 dakika beklenir. Ortama her iki enzim için de geçerli olan, 1N NAOH veya 2 mol NaOH solüsyonundan 25- 50 µl, her çukur içine konarak bu enzimatik olay durdurulur. 8) Plak çukurları içinde pozitif olgu peroxidase kullanıldığında açık kahverengi, alkaline fosfataz kullanıldığında sarı yeşil renk görülmektedir. Bu rengin değerlendirilmesi 1979 yılına kadar gözle yapılırken, daha sonra piyasaya sürülen otomatik spektrofotometre olarak takdim edilen multiskan ile değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu makine içine konan hemaglutinasyon plakları çukurları içindeki renk ayırımları, sayısal değerler halinde, pozitif, negatif serumlar ve PBS çukurları değerleri ile karşılaştırmak suretiyle, şüpheli serumların pozitif değerleri saptanmaktadır. Multiskan adı verilen bu spektrofotometre 5 dakikadan daha az zamanda 96 çukurdaki renk değerlendirmelerini kolonlar halinde yazılı olarak vermektedir (Özcel ve Sermet 1983).

ELISA testi daha ileri çalışmalar için de uygun bir yöntem olarak uygulanmaya başlamıştır. Bu çalışmalardan ilki, bilinen Toxoplasma antikorlarının, polystyrene plaklara emdirilerek, Toxoplasmosis tanısında antikor oluşmasından önce tanıya olanak verebilecek, kan serumunda Toxoplasma antijeni araması çalışmalardan başarı ile kullanılmıştır. Bu gün parazit antijen fraksiyonlarından hangilerinin koruyucu tipte antikor oluşturabildiği konusu, immüno- parazitoloji çalışmalarının esasını oluşturmaktadır. Bu maksat için tek koloni antikorlarından faydalanılmaktadır. Toxoplasma antijenleri ile immunize edilen fare dalak hücreleri ile füzyona başlayan myeloma hücrelerinden elde edilen tek koloni antikorlarından hangisinin invitro ve invivo ortamda Toxoplasma trofozoitlerini öldürdükleri bir seri deneyle araştırıldıktan sonra, bu tek koloni antikoru, polystyrene hemaglutinasyon plak çukuruna emdirilir. Bir seri Toxoplasma antikoru fraksiyonları sulandırılarak, bu antikorla antikor hangisinin reaksiyon verdiği saptanabilmektedir. Bu çalışmalar henüz başlangıç safhasında olup çok özel antikor ve antijen araması çalışmaları gerçekleştirilecek kanısındayız.

Paraziter hastalıklarda aşı hazırlanması için koruyucu antikor oluşturan antijen fraksiyonlarının bulunup ortaya çıkarılmasında IFAT ve ELISA tekniği invitro

deneyimlerle birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Bir kez bu şekildeki antijen fraksiyonu bulduktan sonra, bu gün DNA teknolojisi ve rekombinant DNA yöntemleri ile bu özel antijenlerin üretilmesi ve sonuçta aşı hazırlanabilmesi mümkün olabilmektedir.

### **1.5.3. Moleküler yöntemler**

1980'li yıllardan itibaren moleküler metotların bilim dünyasına girişine paralel olarak birçok viral, bakteriyel ve paraziter hastalıkların teşhisi ve kontrolü noktasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Günümüzde paraziter hastalıklardan sorumlu parazitlerin belirlenmesinde moleküler teşhis metotları çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler teknolojiye, parazitlerin nükleik asit molekülleri (DNA, RNA) ve antijenik bileşenleri belirlenerek enfeksiyonlar teşhis edilmektedir. Moleküler teşhis metotları genellikle çevre koşullarından etkilenmez ve bu metotlarla daha güvenilir sonuçlar elde edilir. Moleküler parazitolojide özellikle nükleik asit tabanlı tekniklerin gelişmesi daha özgül ve duyarlı tanı araçlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu teknikler veteriner parazitolojide tanı, tedavi, genetik tiplendirme, sistematik, populasyon genetiği, ekoloji, epidemiyoloji, antiparazitik ilaç ve aşı geliştirilmesi, ilaç direncinin anlaşılması ve parazit genom çalışmaları gibi birçok konuda kullanım alanı bulmuştur.

Nükleik asit tabanlı tekniklerin temeli mikroorganizmaların DNA ve RNA moleküllerinin tespitine dayanmaktadır.

DNA tespitine dayalı teknikler Polimeraz zincir reaksiyonunun değişik modifikasyonlarından oluşmaktadır. Bunlar; Multiplex PCR, Nested PCR, Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR (qPCR), Reverse Line Blotting (RLB), Arbitrary-primed PCR (AP-PCR), Touchdown PCR, Polimeraz Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), İn Situ PCR, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Luminex, Southern Blotting, Microsatellite, DNA Mikroarray.

RNA tespitine dayalı teknikler, Reverse Transkriptaz PCR ve Northern Blotting metotlarını içine almaktadır.

### **1.5.4. Protein analizi**

Son yıllarda moleküler biyoloji ve gen teknolojisi alanlarında kaydedilen ilerlemelere paralel olarak DNA, RNA, protein ve antikor gibi mikromoleküller üzerinde çeşitli değişiklikler yapılarak sağlık alanında geleneksel metotlara ek teşhis, tedavi ve korunma metotları geliştirilebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, patojen bir mikroorganizmaya ait moleküller, laboratuvar ortamında istenilen zaman ve miktarlarda sentezlenebilmekte ve bunlar hem teşhis metodu hem de aşı geliştirmek amacıyla kullanılabilir. Hastalıkların teşhisinde rekombinant antijenlerin kullanımı, tanı testlerinin hızını, özgüllüğünü ve duyarlılığını arttırmıştır. Bu teknolojiyi kullanarak elde edilen rekombinant proteinlerin konağa ait faktörleri taşımaması nedeniyle bu proteinleri kullanarak yapılan testlerde, yanlış pozitif reaksiyonların görülme ihtimali daha düşüktür. Veteriner hekimliğinde hastalıkların teşhisi amacıyla kullanılan birçok rekombinant protein bulunmaktadır. Malarya, toxoplasmosis, trypanosomiasis, babesiosis ve leishmaniosis gibi protozoonların sebep olduğu hastalıkların teşhisinde kullanılan yöntemlerin çoğunda rekombinant antijenler kullanılmaktadır. Parazite ait proteinler canlı etkenden elde edilen ham protein olarak da kullanılabilir, ancak ham protein eldesinde standardizasyon sorunları ile karşılaşmaktadır. Bu nedenle son yıllarda parazite ait protein yapısındaki antijenik moleküller rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak laboratuvar ortamında üretilip immünolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Tenter ve ark 2000, Dubey 2010).

Protein tespitine dayalı teknikler, Western Blotting ve Protein Mikroarray metotlarını içine almaktadır.

#### **1.5.5. Son konaklarda teşhis**

Kedilerde subklinik veya klinik enfeksiyonlar oluşabilmektedir. Mikroskopik olarak, kedilerin dışkılarındaki oocystlerin teşhisi amacıyla flotasyon metodu kullanılmaktadır. Son konaklarda *T. gondii*'nin teşhisi dışkı muayenesi ve serolojik metotlarla yapılır. Ancak, dışkı muayenesinde saptanan *T. gondii* oocystleri morfolojik olarak *Hammondia* ve *Besnoitia* cinslerindeki türlere benzedikleri için teşhis etmek çok zordur. Fakat *H. hammondi*'yi *T. gondii*'den ayıran en önemli özellik, oocystlerinin kediler için enfektif olmayışı (doku kistleri kediler için enfektiftir), fareler için enfektif oluşudur (Veronesi ve ark 2017).

ELISA ve direkt aglütinasyon testleri, hayvanların dokularında enfeksiyonun tespiti için kullanılan basit ve hızlı muayene yöntemleridir. Teşhiste esas olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı testlerden yararlanılmaktadır (Dubey 2010).

Kedilerde etkene spesifik IgG antikorlarının tespiti için ELISA'da kullanılan antijenler; takizoit lizat antijeni (TLA), yüzey antijen-2 (SAG2), yoğun granül proteinleri (GRA2, GRA6, GRA7, GRA15) ve mikroneme proteini-10 (MIC10) olmak üzere çeşitli rekombinant antijenlerden ibarettir (Abdelbaset ve ark 2017).

Toxoplasmosis karşı oluşan antikorların belirlenmesi için rekombinant SAG2 proteininin kullanıldığı bir imünokromatografik test (TgICT) de geliştirilmiştir. Bu test hızlı, basit, spesifik, hassas, ve düşük maliyetli olup kullanımı kolaydır (Huang ve ark 2004).

#### **1.5.6. Ara konaklarda teşhis**

Toxoplasmosisin teşhisinde sadece klinik belirtiler yetersiz kalmaktadır. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun tespitinde immünolojik ve moleküler teknikler olmak üzere birçok tanı yöntemi kullanılmaktadır. Boya testi, indirekt hemagglutinasyon testi, lateks aglütinasyon testi, IFA testi ve ELISA testi gibi serolojik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Toxoplasmosisin teşhisinde genellikle serum örneklerinde *Toxoplasma* antijenlerine karşı spesifik IgM ve IgG antikorlarının saptanması esas alınmaktadır. Ticari testlerin birçoğunda doğal antijenler bulunur ve test doğruluğu geniş varyasyonlar göstermektedir (Dubey 2010).

İnsanlarda tokzoplazmozun teşhisi, biyolojik, serolojik, histolojik veya moleküler yöntemlerden birisi veya bu testlerin birkaçı ile yapılabilmektedir. Hümorale antikorların belirlenmesinde kullanılacak pek çok serolojik metot vardır. Bunlar; Sabin-Feldman boya testi (SFDT), direkt ve indirekt hemagglütinasyon testi (HA, IHA), indirekt floresan antikor testi (IFAT), direkt agglutinasyon testi (DA), lateks aglütinasyon testi (LAT), enzime bağlı immunosorbent assay (ELISA), immunosorbent aglütinasyon testi (IAAT) ve *Toxoplasma* deri testidir (Hill ve Dubey 2002).

Doğum sonrası konjenital toxoplasmosisin tanısında, plasenta veya kordon kanı serumu ile bebekler *T. gondii* spesifik antikorların tespiti yönünden serolojik olarak incelenebilmektedir. Yeni doğanlarda konjenital enfeksiyonu teşhis etmek için plasental dokularda parazit tespiti kullanılan en yaygın testlerden birisidir. Plasenta kası, beyin, kan veya diğer vücut sıvılarından parazitlerin izole edilmesi, hücre kültürü ve farelere inokulasyon, PCR ile etkene spesifik DNA tespiti, immünohistokimyasal boyama ve elektron mikroskopi metotlarıyla teşhis yapılabilmektedir (Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Giemsa ile boyanmış doku kesitleri ya da frotiler hızlı bir şekilde incelenebilmesi ve nispeten ucuz olmasına rağmen, bu yöntemin hassasiyeti azdır. Organ nakli yapılan hastalarda, *T. gondii*, bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı, kan, kemik iliği aspiratı, beyin omurilik sıvısı (CSF) veya biyopsi ve retinokoroiditte saptanabilir (Robert-Gangneux ve Dardé 2012).

Rekombinant proteinler, *T. gondii* enfeksiyonlarını teşhis etmede teşhis bileşenleri olarak yüksek bir potansiyele sahiptirler. Serumda parazite spesifik antikorları teşhis için spesifik immunoglobulinler (IgM ve IgG) kullanılmaktadır (Kotresha ve Noordin 2010).

### **1.6. Toxoplasmosisin Tedavisi**

İnsanlarda özellikle gebe kadınlarda, bağışıklığı baskılanmış hastalarda, doğuştan enfekte bebeklerde ve oküler enfeksiyonu olan kişilerde antibiyotikler kullanılabilir. Antibiyotikler doku kistlerine etki ederek parazitleri ortadan kaldıramamaktadırlar. Hamile kadınlarda akut toxoplasmosisin fetusa bulaşmasını önlemek için spiramisin tedavisi uygulanmaktadır. İlacın kemik iliğini baskılayıcı etkilerini önlemek için folinik asit gibi destekleyici bir tedavi, pirimetamin ve sülfadiazin ile birlikte verilmelidir. Kronik enfeksiyon durumlarında trimetoprim-sulfametoksazol (100 mg/ kg/ gün) verilebilmektedir. Konjenital toxoplasmosisda pirimetamin, sülfadiazin ve lökovorinin kombinasyonu tedavi amacıyla kullanılabilir (Dubey 1988, Tenter ve ark 2000, Dubey 2010).

Hayvanların tedavisinde, klinik hastalığı tedavi etmek için antibiyotikler ve destek tedaviler kullanılmaktadır. Pirimetamin ile birlikte sülfametazin, sülfadiazin ve sulfametoksazoldan birisinin kullanıldığı tedavi protokolleri ile iyi sonuçlar

alınmıştır. Pimetamin (1 mg/ kg) ve sülfadiazine (120 mg/kg) kombinasyonu ile 2-sülfamoil-1-4, 4-diaminodifenilsülfonun (SDDS) (160-1000 mg/ kg) oocyst atılımını azalttığı bildirilmiştir (Sonar ve Brahmbhatt 2010).

Toxoplasmosisda kullanılan bazı ilaçlar şöyledir:

1-Kedilerde oocyst atılmasını engellenmek için; Klindamisin, 50 mg/ kg, ağızdan veya kasiçi (IM), 24 saatte bir, 1-12 gün kullanılır. Ayrıca Toltrazuril, 5-10 mg/ kg, ağızdan, 24 saatte bir, 2 gün kullanılır.

2-Sistemik enfeksiyonlar için; Klindamisin, 3-13 mg/kg, ağızdan, her 8 saatte bir, köpeklerde en az 4 hafta uygulanabilir. Kedilerde Klindamisin, 8-17 mg/kg, ağızdan veya IM, her 8 saatte bir, en az 4 hafta kullanılır. Köpek ve kedilerde Trimetoprim-sülfonamid, 15mg/kg, ağızdan, her 12 saatte bir, en az 4 hafta kullanılmalıdır. Yine kedilerde Azithromycin, 10mg/kg, ağızdan, 24 saatte bir, en az 4 hafta uygulanır (Dubey ve ark 2009).

Trombositopeni ve lökopeniyi önlemek ve prymethaminiin yan etkilerini azaltmak için folinik asit ve fırıncı mayası veya antagonist olarak bira mayası destekleyici tedavi olarak uygulanabilmektedir (Fayer 1981).

Sülfadiazin ve prymethamine yaygın olarak kullanılan iki ilaç olmasına rağmen komplike durumlarda diaminodifenilsülfon, atovakuon, spiramisin ve klindamisin gibi ilaçlar da kullanılmaktadır (Hill ve Dubey 2002).

## **1.7. Toxoplasmosisa Karşı Korunma**

### **1.7.1. Hijyen tedbirleri**

Günümüzde insan ve hayvanlarda toxoplasmosisa karşı korunmada etkili bir aşı olmadığından dolayı hijyen tedbirleri ön plana çıkmaktadır. Köpek ve kedilerde toxoplasmosisu önlemek için özellikle kedi enfeksiyonlarının azaltılması ve kediler tarafından oocyst yayılımının önlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla kediler sadece kuru veya konserve olarak üretilen ticari olarak işlenmiş mamalar ile beslenmeli ve av yapmalarına engel olunmalıdır. Evde beslenen kedi ve köpeklerin, potansiyel ara konaklar kemirgen hayvanlar ve hamamböceği gibi mekanik vektörleri yemeleri engellenmelidir. Kedilerin, besin depolarının bulunduğu binalara veya evlere girmesi

engellenmelidir (Dubey ve ark 2009). Etlerin insan veya hayvan tüketiminden önce dondurulması veya röntgen (X-ray) ışınlarına maruz bırakılması doku kistlerini öldürmektedir. Bu yöntem et kalitesini etkilemez ve ayrıca çok kullanılan, kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir (Dubey 2008).

İnsanlara toxoplasmosisin gıda kaynaklı bulaşmasının önüne geçmek için et ve hayvanların diğer kısımları çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmemelidir. Yemek pişirilen bölüm, lavabo üstleri, bıçaklar ve pişmemiş etle temas eden malzemeler sabun ve sıcak su ile yıkanmalıdır (Dubey 2004).

Kedi sahipleri kedi dışkılarını günlük olarak uzaklaştırmalıdır. Kedi kumu kutularının temizliği sıcak su (>70°) ile yapılmalıdır. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar ve hamile kadınlar özel deterjanlı eldivenler giyerek temizlik yapmalıdırlar. Kedi dışkısıyla bulaşık sebze ve meyveler, tüketmeden önce yıkanmalı ve iyice pişirilmelidir. Gebelik döneminde uygulanacak eğitim programları ile konjenital enfeksiyon riski azaltılabilmektedir. Fötüs ve annelerde *T. gondii*'ye karşı IgM ve IgG antikorlarının varlığı araştırılmalı, pozitif durumlarda gerekli değerlendirmeler yapılmalıdır (Tenter ve ark 2000). Tüm hayvanların etleri tüketmeden önce 67°C'ye kadar pişirilmelidir. Özellikle hamile kadınlar, köpek veya kedilere temas ettikten sonra ellerini iyice yıkamalıdırlar. Su ile bulaşmanın önüne geçmek için ise göllerden, göletlerden ve nehirlerden gelen klorlanmamış suları içmekten kaçınılmalıdır (Dubey 2004).

### **1.7.2. Aşı ile Korunma**

Aşılama, meydana gelebilecek enfeksiyonların önlenmesi veya kısmen azaltılması için konaklara koruyucu bağışıklık kazandıran süreçtir. Aşılama da *T. gondii*'ye ait 3 ana protein üzerine odaklanılmıştır. Bunlar yüzey antijenleri (SAG'ler), yoğun granül antijenleri (GRA'lar) ve roptri antijenleridir (ROP'lar). Konjenital toxoplasmosisda, hastalığı ve parazitin çoğaltmasını kontrol etmek için, özellikle veteriner alanındaki aşılar, stratejik öneme sahiptir. Aşıların diğer faydaları da, doku kisti taşıyan hayvanların sayısını ve enfekte kedilerden oocyst atılımını azaltmalarıdır (Innes ve ark 2009, Hisczynska-Sawicka ve ark 2014).

Günümüzde sadece koyunlar için Toxovax <sup>TM</sup> adında bir aşı bulunmakta, insan ve diğer hayvanlarda *T. gondii* enfeksiyonunu önlemek için herhangi bir aşı

bulunmamaktadır. S48 suşu, Yeni Zelanda'daki atık bir kuzudan izole edilmiş tamamlanmamış (incomplete) bir *T. gondii* suşudur. Bu suşun doku kisti veya oocyst oluşturma yeteneği yoktur ve kuzularda neonatal ölümleri azaltmak için kullanılmıştır (Buxton 1993, Schaap ve ark 2007).

Ara konaklar için birçok aşı türü vardır.

1- Ölü parazitler veya ekstraktları kullanılarak aşılama

2- Canlı, zayıflatılmış parazitleri kullanarak aşılama

A- Koyun ve keçilerde toxoplasmosis karşı ticari aşılar

3- Gen delesyonu ile zayıflatılmış parazitleri kullanarak aşılama

4- Viral vektörleri kullanarak aşılama

5- Bakteriyel vektörleri kullanarak aşılama

6- DNA aşıları

7- Subunit aşılar

Kedilerde oocyst atılmasını azaltmak için *T. gondii*'nin bradizoit mutanı olan T-263 adındaki aşı bulunmaktadır. Bu aşının in vivo etkinliği yüksektir. T-263 aşısı, enfekte farelerin beyinlerinde bulunan canlı etkenlerden oluşmaktadır (Araujo 1994, Innes ve ark 2009). Tüm aşılar koruyucu bağışıklığı uyarma kabiliyetine sahip değildirler. İmmünizasyon için kullanılan attenüe canlı *T. gondii* suşları, doku kisti oluşumunu azaltan koruyucu bağışıklığı uyarmaktadırlar (Jongert ve ark 2009).

İmmünojenik *T. gondii* ekstraktları, çözülebilir takiozit antijeni (STAg) olarak tanınan ilk protein karışımı olarak belirlenmiştir. STAg ile yapılan aşılama yalnızca takiozitlerin *T. gondii* sonikasyonunun (TSO) kısmi bir şeklidir. Yeni jenerasyon antijen/adjuvan kombinasyonları yüksek yeterlilikte ve daha güçlü bağışıklık tepkilerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (Bruna-Romero ve ark 2012).

Genetik aşılar, hedef hücrenin antijenlerini kodlayan genlere ait DNA moleküllerinin doğrudan verilmesi anlamına gelmektedir. Genetik aşılamada bakteriyel ve viral vektörler kullanılmaktadır. Bu vektörler doğal adjuvanlar gibi



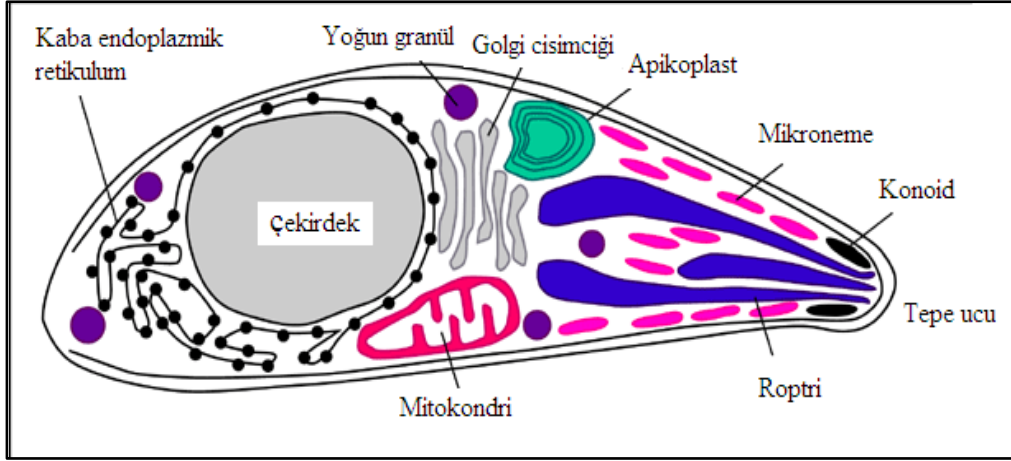
davranırlar ve primer intraselüler bağışıklık cevabı uyarmaktadırlar. Rekombinant subunit aşılarda, DNA aşılarda ve rekombinant canlı vektörler *T. gondii* enfeksiyonuna karşı aşı geliştirmede güncel olarak üzerinde çalışılan aşı tipleridir (Bruna-Romero ve ark 2012).

### **1.8. *Toxoplasma gondii* 'nin Antijenik Proteinleri**

Apikal organeller Apikopleksan parazitlerin spesifik salgı vezikülleridirler. Bunlar etkenin sitoplazmasında bulunan roptriler, mikronemler ve yoğun taneciklerden oluşmaktadır (Şekil 2). Bu yapılar, familya ve türler arasında moleküler ağırlığa göre değişen geniş homolojilere sahip karmaşık bir protein bileşimine sahiptir. Proteinlerin bir kısmı hücre invazyonu yoluyla membran modifikasyonuna sebep olmalarının yanı sıra konak hücre membranı ile etkileşir ve konak hücrelere adhezyonda rol oynarlar (Blackman ve ark 2001).

Çok sayıda antijenik yapıda protein *T. gondii*'nin yaşam döngüsü boyunca konak vücuduna salınmaktadır. Bu proteinler oocystler, takizoitler ve bradizoitler için spesifiktir. Parazitin bu gelişme formları roptriler, mikronemler, mikroporlar ve yoğun granüller gibi birçok belirgin yapıya sahiptirler. *Toxoplasma gondii* ve konak hücre arasındaki etkileşimde anahtar rol oynayan çoklu proteinler, konak hücre proteinleriyle etkileşimde olan mikronemler, yoğun granüller ve roptrilerden salgılanırlar (Nam 2009, English ve ark 2015).

Parazitlerin konak hücrelere girmesiyle parazit proteinleri ve konak hücre proteinleri arasında bir etkileşim başlar. Bu proteinler parazitofor vakuol (PV) içerisindeki ortamı değiştirmektedirler. Parazitlerin intraselüler çoğalmalarında ve hayatta kalmalarında rol oynamaktadırlar (Lecordier ve ark 1999, Nam 2009).



**Şekil 2.** *Toxoplasma gondii* takizoitinin yapısı (Ajioka ve ark 2001).

Mikronem, rhoptri ve yoğun taneciklerin salgı yapan organelleri sırasıyla mikronem (MIC), rhoptri (ROP) ve yoğun granül proteinleri (GRA) gibi karakteristik proteinleri içermektedirler. MIC'ler konak hücrelere tutunmada merkezi bir rol oynamaktadır. Rhoptriler, mikronemlerin bağlanmasından hemen sonra rhoptri proteinlerini salgılamaktadırlar ve bu proteinler rhoptri boyun ve rhoptri bulb olmak üzere iki farklı alt birimden oluşmaktadır. Mikronem ve rhoptri boyun proteinleri (RON), hücre invazyonu sırasında görülen parazit ve konak plazma zarlarının sıkı bir şekilde bir araya geldiği hareketli bir kavşak (MJ) oluşturmak için parazit yüzeyi üzerinde toplanmışlardır. Parazit proteinlerinin konakta salınması, konak vasıtasıyla gerçekleşen fagositik süreçte değil, hücreye giriş sırasında gerçekleşir. Hareketli kavşağın mevcut yapısı ve sentezi, *Plasmodium* ve *Toxoplasma*'da 10-30 saniye gibi kısa bir sürede ifade edilerek tamamlandığı için yeterince anlaşılabilmiştir. Konak hücreye penetre olan parazitler konak tarafından gelecek istilalara karşı korunurlar. Parazitin apikal kompleks ucu ve konak hücreleri birleştiren bölgede küçük vakuoller oluşmaktadır. Vakuol membranının büyük kısmı konak hücre membranından köken alır. Bu membran "parazitofor vakuol membran (PVM)" olarak adlandırılmaktadır. PVM parazitin konak hücre içinde, hücrenin toksik etkilerine maruz kalmadan çoğalmasına imkân sağlar (Black ve Boothroyd 2000).

### 1.8.1. Mikroneme proteinleri (MIC)

Mikronemler apikompleksan parazitlerde bulunan salgı organelleridir. Parazitin apikal kompleks ucundaki rhoptrilere yakın olan, çok sayıda bulunan, ince, çok küçük ve balon şeklinde veziküler organellerdir. Apikompleksan parazitler, mikronem

proteinlerinin boşaltılmasıyla hücreleri istila eder. Mikronem proteinleri transmembran ve çözümlü yapıda proteinler içermektedir. Mikronem tarafından salgılanan MIC'ler, invazyon sürecinde parazitlerin konak hücreleri tanınmasında, tutunmasında ve hücreleri istila etmesinde temel rol oynamaktadırlar. Parazit ve konak hücre arasındaki temasın erken evresinde, MIC'ler ilk olarak takizoitlerin apeksinden salgılanır ve konak hücre zarları üzerindeki reseptörleri tanıyarak adhezyonu kolaylaştırırlar. Bu nedenle, konak hücrelerin parazitler tarafından istila edilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Günümüzde MIC1-MIC12, AMA1, M2AP, SUB1, ROM1, SPATR, PLP1 ve TLN4 olmak üzere 19 tip MIC bilinmektedir. Bunlardan 10 tip (TgMIC1-4, TgMIC6-9, TgMIC12 ve SPATR) ökaryotik hücrelerdeki adezyon moleküllerine benzer farklı adhezyon bölgeleri içermektedir (Beghetto ve ark 2005, Wang ve Yin 2015).

Mikroneme protein 2 (MIC2) yalnızca konak hücre zarına bağlandığında, *T. gondii*'nin apikal yüzeyinden salgılanmaktadır. *Toxoplasma gondii*'de Plasmodium'lardakine benzer transmembran bağlanma proteinleri tespit edilmiştir. MIC2 proteini, *Toxoplasma gondii*'nin mikroneminin lümeninde, yüzeyinde veya parazitofor vakuollerde bulunmamaktadır. Mikronem 2 proteini, kayma hareketlerinde de görülebilir ve penetrasyon esnasında posterior ucun kapatılacağını ifade eder. Konak hücresinin iç ve dış molekülleri ile parazitin AMA1 ve MIC2 proteinleri arasındaki etkileşimler tam olarak keşfedilmemiştir (Wan ve ark 1997).

Mikroneme protein 3 (MIC3) dimerik yapıda sistein açısından zengin ve çözümlü bir proteindir. MIC3, *T. gondii*'nin üç enfektif aşamasında da (takizoitler, bradizoitler ve sporozoitler) bulunur ve insanlarda ve farelerde birincil ve kuvvetli bağışıklık reaksiyonları oluşturmaktadır. *T. gondii*'nin konak hücreleri tanınması, yapışması ve istilasında önemli rol oynamaktadır. MIC3, ligand yapısal alanı vasıtasıyla çeşitli konak hücrelerin reseptörlerine bağlanabilmektedir. Bu nedenle, konak hücrelerin parazitler tarafından invazyonu ve enfeksiyonun virulansı ile yakından ilişkilidirler (Ismael ve ark 2003).

Konak hücre yüzeyine bağlandıktan sonra parazit kayma hareketine başlar. Kayma hareketi için mikronemlerin apikal ucundan yapışkan transmembran proteinlerin boşaltılması gerekmektedir. TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) ailesinin mikronemal proteinleri, konak hücre reseptörlerine bağlanarak ve

onları parazitin sitoplazmik aktin-miyozin motoruna bağlayarak kayma hareketi ve invazyon için esas teşkil ederler. İnvazyondaki bir sonraki adım, roptri sekresyonu ve konak hücreye sıkı bir şekilde bağlanmayı takiben konak hücrenin tanınmasıdır. Bir başka mikronemal protein olan apikal membran antijen-1 (AMA1) de invazyon esnasında farklı bir role sahiptir. Hareket kavşağının (MJ) oluşumu, roptri boyun proteinlerinin salgılanmasına ve bunların AMA1 ile olan etkileşimine bağlıdır. AMA1 yokluğunda, RON'lar hâlâ salgılanırlar, ancak hareket kavşağı oluşturamazlar (Kessler ve ark 2008).

Parazitin virulansı ile ilgili birçok *T. gondii* mikronem proteini (TgMICs) (TgMIC1, TgMIC2, TgM2AP, TgMIC3, TgMIC8, TgAMA1, TgSUB1, TgROM1, TgSPATR) bulunmaktadır. Mikronem proteinlerinin etkileşim ve ana nüfuz bölgeleri ise TgMIC1, TgMIC2, TgMIC3, TgMIC4, TgMIC5, TgMIC6, TgMIC7, TgMIC8, TgMIC9, TgMIC10, TgMIC11, TgMIC12, TgMIC13, TgMIC14, TgMIC15, TgMIC16, TgAMA1, TgM2AP, TgSUB1, TgROM1, TgSPATR, TgPLP1 ve TgTLN4' dir (Liu ve ark 2017).

MIC4 makrogamet içerisinde bulunan ve oocyst duvar gelişimi ile ilişkili bir proteindir. Takizoitlerdeki mikronem protein salgısının, hücreler içindeki kalsiyum iyonunun mobilizasyonu ile indüklendiği belirtilmektedir (Ferguson ve ark 2000).

### **1.8.2. Rhoptri Proteinleri (ROP, RON)**

Rhoptriler, apikomplexan parazitlerin konak hücrelerini istilada rol oynayan proteinleri içeren en önemli salgı organelleridir (Dubey ve ark 1998). Rhoptri proteinleri *T. gondii*'nin en önemli virülans faktörlerindedir. Bu proteinler konak hücrelerin farklı bölümlerinde lokalize olurlar ve konak hücrelerin zarı, hücre iskelet yapısını ve aktif faktörleri etkileyebilmektedirler. Böylece konak hücrede savunma mekanizmaları engellenerek *T. gondii* konak hücreye başarıyla girer, yerleşir ve çoğalır. Her hücrede 8-12 veya 6-12 rhoptri bulunmakta ve toplam hücre hacminin %10-30'unu kaplamaktadırlar (Dlugonska 2008, Camejo ve ark 2014, English ve ark 2015).

*Toxoplasma gondii*'de birçok salgı ve rhoptri proteinleri bulunmaktadır. Bunlar rhoptri gövde proteinleri olan ROP1, ROP2, ROP4, ROP5, ROP7, ROP8, ROP9, ROP10, ROP11, ROP12, ROP13, ROP14, ROP15, ROP16, ROP17, ROP18, SUB2,

toksopain-1 (cathepsin proteaz B), insülinaz, toksofilin, Rab11, NHE2 ve BRP1'i de içermektedir (Lebrun ve ark 2007). Ek olarak, iki yeni rhoptri kesesi proteini (ROP47 ve ROP48) ve bir yeni rhoptri boyun proteini (RON12) de bulunmuştur (Camejo ve ark 2014).

Spesifik antikorlar kullanarak 30'dan fazla rhoptri proteini tespit edilmiştir. Rhoptri proteinlerinin bazıları varsayımsal transmembran bölgelerine sahip olmalarına rağmen, tüm immünolokalizasyon verileri, rhoptri proteinlerinin organel içeriğinde lokalize olduklarını ve hiçbir rhoptri membran proteininin bilinmediğini göstermektedir (Dlugonska 2008). Bununla birlikte, bazı rhoptri proteinleri enzim işaretleri içerir ve bu aktiviteleri ile organel biyogenezi ve fonksiyonunda rol oynayabilirler. Bunlar aslında kinazların, fosfatazların ve proteazların homologlarıdır. Rhoptri proteinleri içinde, ROP2 ailesi olarak tanımlanan protein kinaz homologları geniş yer tutar (El Hajj ve ark 2006). ROP1 başlangıçta penetrasyon arttırıcı faktör gibi davranmaktadır. ROP1, *T. gondii* tarafından konak hücre invazyonunun etkinliğini arttırmak için kullanılan zayıf bir hücrel fraksiyondur. Çalışmalar, ROP1'in invazyon veya hücre içi yaşam için gerekli olmadığını, ancak rhoptri protein trafiğinin ve işlemlerinin incelenmesi için yararlı olduğunu ortaya koymaktadır (Lebrun ve ark 2007).

ROP2, parazitofor vakuol ile konak hücre mitokondrisi arasındaki ilişkiye aracılık ederek parazitofor vakuolün membranına yerleşir. ROP2, yalnızca PVM ve konak hücre organelleri arasındaki etkileşim için değil, aynı zamanda rhoptri biyogenezi, parazit istilası ve hücre içi değişim (replikasyon) için de önemlidir. ROP2, *T. gondii*'nin tüm invaziv dönemlerinde bulunmaktadır (Lebrun ve ark 2007).

### **1.8.3. Yoğun Granül Proteinler (GRA)**

Yoğun granüller (GRAs), *T. gondii*'nin yapısında yer alan ve parazit çekirdeği etrafında yerleşen, 200 nm çapa sahip organellerdir. Bunlar sayısına, boyuta, şekle, aşamaya ve türe göre değişen, yoğun paketlenmiş granüler maddeler içeren membrana bağlı veziküllerdir. Bunların miktarı ağırlıklı olarak istiladan sonra konak hücrenin modifikasyonuna bağlıdır (Blackman ve ark 2001). Özellikle sporozoit ve takizoit evrelerinde bradizoit evresine göre daha fazla sayıda bulunmaktadır. Yoğun granül proteinler PV içerisine invazyon sırasında ve sonrasında

salınmaktadır. Salınan yoğun granül proteinler ya PV'ün lümeninde çözünebilir bir şekilde kalırlar ya da PV zarıyla ilişki halinde kalırlar. Yoğun granül proteinler PV içindeki ortamı değiştirmektedir. Bu nedenle hücre içi yaşam ve parazit replikasyonu için önemli bir işleve sahiptirler (Dubey ve ark 1998).

Yoğun granüller, salgısal veziküler organeller olup, çekirdekli hücrelerde intraselüler enfeksiyonların sürekliliği için parazitofor vakuol membranına katılırlar. Yoğun granüller, parazit hücresi boyunca dağılarak içeriklerini parazitofor vakuole salgılamaktadır. *Toxoplasma gondii*'nin yoğun granül organelleri, parazitin geliştiği parazitofor vakuoldeki yapısal değişikliklerde önemli bir rol oynamaktadır. Bu granüller bir membran ile çevrilidirler ve içlerinde transmembran proteinlerini (GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA10, GRA12 ve GRA14) içermektedirler. GRA proteinleri membranöz parazitofor vakuol sistemi ile yakın bir ilişki içerisindeydirler. Bu proteinlerin, protein depolama bölümüne karşılık gelen yerleri elektron mikroskobu altında karanlık bir görünüme sahiptir. Onlar takizoitler ve bradizoitlerde bulunurlar, ancak takizoitlerde yoğunlukları daha fazladır. Parazitofor vakuolden türetilen kist duvarında ayrıca GRA proteinleri de bulunmaktadır. GRA proteinlerini (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9, GRA12, GRA14, GRA19, GRA20, GRA21, GRA23, ve GRA25) kodlayan 16 gen vardır. GRA proteinlerinin, homolojileri yoktur ve monomerik protein formları ile işlev görürler. Nispeten düşük moleküler ağırlığa (20-50 kDa) sahiptirler. GRA proteinlerinin bazıları kısmen çözünürken bazıları ise parazitofor vakuol membranı ile ilişkilidir. Geleneksel GRA proteinleri ve GRA benzeri proteinler, parazitin yaşam döngüsü boyunca mRNA ifadeleri ile farklı özellikler göstermektedirler. GRA benzeri proteinler, takizoit içerisinde parazitofor vakuol membranına salgılanır ve konak hücre çekirdeğini hedefleyerek konak hücrenin yeniden düzenlenmesini sağlarlar. Yoğun granüllerde lokalize olan diğer birkaç protein ise parazitofor vakuolde enzimatik fonksiyonlara sahiptir. Yoğun granüllerin sekresyonları, parazitofor vakuolün özel bir yerinde çözünür formda salınan proteinlerin bir karışımına sahiptir (Lecordier ve ark 1999, Nam 2009, Bougdour ve ark 2014).

*Toxoplasma gondii*'nin yoğun granül antijenleri, parazitlerin hayatta kalması ve virulensleri ile ilişkilidir. Özellikle rGRA2, rGRA6, rGRA7 ve rGRA8 gibi

rekombinant olarak elde edilen GRA proteinleri akut enfeksiyon belirteçleri olarak rapor edilmiş ve bu proteinlerin diagnostik amaçla kullanılabileceği bildirilmiştir. Ancak rGRA1 antikoru, kronik enfeksiyon belirteci olduğu bildirilen bir istisnadır (Kotresha veNoordin 2010).

GRA3 ve GRA6 haricinde, boşaltım/salgı antijenleri olarak GRA proteinleri, 25-30 amino asitlik sinyal dizileri içermektedirler. Yoğun granüllerden salgılama işlemi, klasik egzositoza benzer şekilde gerçekleşmektedir (Lecordier ve ark1999, Nam 2009).

GRA1, boşaltım/salgılama antijeni olan 24 kDa'lık bir polipeptiddir. Takizoit ve bradizoit formların yoğun granülleri içerisinde bulunmakta ve parazitofor vakuol içerisinde salgılanmaktadır. Protein, konak hücre invazyonunda fizyolojik olarak önem taşıyan  $Ca^{+2}$ 'ye bağlanma özelliklerine veya  $Ca^{+2}$ 'ye yüksek bir afiniteye sahiptir. Konak hücre invazyonunu takiben, GRA1 çözünebilir bir protein olarak parazitofor vakuol lümenine salgılanır ve ardından parazitofor vakuolün membranöz tubuler ağı ile periferik olarak ilişkili hale gelirler (Wang ve ark 2013).

GRA2, 23 amino asitlik sinyal dizisine sahip çözünebilir bir protein (MW: 19.8 kDa, 185aa) polipeptididir. İlk olarak yoğun granüllerde depolanan ve parazitofor vakuol içine salınan yoğun bir madde olarak bulunmuştur. Konak hücre invazyonunu takiben, GRA2, parazitin posterior ucunda özelleşmiş bir invaginasyon yapısından salınan multi-lameller veziküller içerisinde salgılanırlar. Multi-lameller veziküller, GRA2'nin entegre bir membran formunu ihtiva eden intravakuolar ağı oluşturmak üzere bir araya gelmektedirler (Mercier ve Cesbron-Delauw 2015).

*Toxoplasma gondii*'nin yoğun granülleri içerisinde bulunan GRA3, 30 kDa büyüklüğünde çözülebilir bir protein olup, 220 amino asitlik bir polipeptittir. Parazitofor vakuol membranı ile ilişkili hale gelmek için invazyondan sonra parazitofor vakuol içersisine salınırlar ve oligomerleşerek, sitoplazmada çıkıntı yapan parazitofor vakuol membranına eklenirler. Gözenek oluşturma kompleksi olarak işlev görebilmektedirler (Lecordier ve ark 1999, Nam 2009).

GRA4, parazitofor vakuol içinde lokalize olmuş 297-345 amino asitlik dizilerden oluşan, 40 kDa'lık çözüdür bir proteindir. GRA4, parazite karşı aşı adayları bulmak için birçok araştırmacıyı cezbetmektedir. DNA aşısı olarak

kullanılan GRA4'ün tüm kodlama dizisi, duyarlı farelerin % 62'sinin hayatta kalması ile sonuçlanmıştır (Mercier ve Cesbron-Delauw 2015).

*Toxoplasma gondii*'nin GRA5 (P21) proteini, konak hücre invazyonu sırasında parazitofor vakuolde salgılanan yoğun granül proteini olarak tanımlanmıştır. Bu protein 120 amino asitten oluşan 12.83 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. GRA5, parazitofor vakuol membranında hem çözüner hem de hidrofobik form agregatlarında bulunmaktadır. GRA5, parazitofor vakuole çözüner formda salınmaktadır ve daha sonra bir transmembran proteini olarak parazitofor vakuol membranıyla kararlı bir şekilde ilişkili hale gelmektedir (Lecordier ve ark 1999, Nam 2009).

GRA6, takizoitlerin yoğun granüllerin ve parazitofor vakuolde lokalize olan, 32 kDa büyüklüğünde bir protein olarak karakterize edilmiştir. Parazitofor vakuole salındıktan sonra GRA6, parazitin arka ucuna doğru hızla yer değiştirmektedir (Wang ve ark 2016).

*Toxoplasma gondii*'nin GRA7 (P29) proteini, *T. gondii* takizoit mRNA'sından oluşturulmuş bir ekspresyon bileşimidir. Bu protein konak sitoplazmasında ROP proteini ile ROP2 ve ROPe ile ilişkili iplik benzeri yapılarda bulunmaktadır. GRA7 parazitin tüm bulaşıcı aşamalarında bulunmaktadır. Humoral ve hücre sel bağışıklık immün cevapları uyarma yeteneğine sahiptir. Konak hücresi istilasından sonra protein, parazitofor vakuol membranındaki vaküoler ağa ve sitoplazma içinde çıkıntı yapan uzantılara salgılanmaktadır. Parazitofor vakuol ve sitoplazmada bulunan, 236 amino asitten oluşan 25.91 kDa moleküler ağırlığına sahip çözüner bir proteindir (Dunn ve ark 2008).

Konak hücrelerinin invazyonu sırasında yoğun granüller tarafından salgılanan GRA8, GRA9, NTPase I, NTPase II, PI-1, PI-2, Cyp18, GRA10, GRA12, GRA14, GRA15, GRA16, GRA20, GRA21, GRA22, GRA23, GRA24 ve GRA25 proteinleri parazitofor vakuol içerisinde bulunurlar. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 36 ila 48 kDa arasında değişmektedir (Lebrun ve ark 2007, Mercier and Cesbron-Delauw 2015).

#### **1.8.4. Rekombinant Antijenik Proteinler**



Rekombinant proteinler, toxoplasmosisin serolojik tanısında kullanılan antijenler için alternatif kaynaklardır. Tanı amacıyla serolojik kitlerde kullanılmakta olan antijenlerin çoğu farelerde veya doku kültüründe üretilen takizoitlerden hazırlanmaktadır. Bununla birlikte, takizoitlerden ekstrakte edilen antijenler parazite ait olmayan yapılar içerebileceğinden standartlaştırması zordur. Bu sebeple bu tür antijenik yapılar yerine rekombinant proteinler kullanılmaya başlanmıştır (Bruna-Romero ve ark 2012).

Teşhiste kullanmak amacıyla birkaç hedef gen klonlanmış ve ekspresyon sistemlerinde rekombinant proteinler ifade edilmiştir. Bu rekombinant proteinler arasında, *T. gondii* takiozit ve bradizoit safhalarında bulunan immünodominant yüzey antijenleri (SAG'ler), matris antijeni (MAG), MIC'ler, ROP'ler ve GRA'lar yer almaktadır. Bu rekombinant antijenlerin serodiagnostik testlerdeki potansiyel avantajlarına rağmen, rekombinant antijenlere dayalı çok az sayıda ticari tanı kiti geliştirilmiştir. *Escherichia coli*'de çok sayıda rekombinant protein üretilmiş ve *T. gondii* enfeksiyonlarının teşhisinde diagnostik antijenler olarak potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu antijenler GRA'lar (rGRA1, rGRA2, rGRA4, rGRA6, rGRA7 ve rGRA8), roptri proteinleri (rROP1 ve rROP2), matris proteini rMAG1, mikroneme proteinleri (rMIC2, rMIC3, rMIC4 ve rMIC5) ve yüzey antijenlerini kapsamaktadır (rSAG1 ve rSAG2). Bu rekombinant proteinler genel olarak spesifik IgG ve IgM'yi tespit etmek amacıyla ELISA testlerinde antijen olarak kullanılmaktadırlar (Kotresha ve Noordin 2010).

Normal durumlarda, ELISA pleytlerine bir rekombinant protein kaplanmaktadır. Rekombinant antijenler, doğal antijenlere benzer bir duyarlılıkla, enfekte kişilerin serumlarındaki spesifik IgG'yi tespit edebilmektedir. Çeşitli kombinasyonlarda birden fazla protein karışımı da antijen olarak kullanılabilir. Antijen karışımlarının, kaba antijen kullanımıyla karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyete sahip oldukları görülmektedir. GRA7, GRA8, SAG2 ve H4 proteinlerinin karışımları mevcut ve geçirilmiş enfeksiyonları ayırt etmek için kullanılmaktadır (Holec-Gasior 2013).

IgG avidite testi, rekombinant antijenlerin uygulanması için büyük bir potansiyele sahiptir. Avidite testi, tüm parazitten hazırlanan *Toxoplasma* lizat

antijenlerinden daha stabil olan rekombinant antijenlere bağlıdır (Holec-Gaşior 2013).

*Toxoplasma gondii*'nin SAG2 geni bütünüyle bakteriyel, viral ve fungal sistemlerde klonlanmış ve hücre içi olarak ifade edilmiştir. Klonlamadan sonra elde edilen ve molekül ağırlığı 36 kDa olan rekombinant SAG2, 22 kDa ağırlığındaki doğal SAG2 proteininden daha büyük bir molekül ağırlığına sahiptir. Genellikle rekombinant SAG2, Western blot ve in-house ELISA da değerlendirilmektedir. Rekombinant SAG2 proteininin ELISA testindeki duyarlılığı ve özgüllüğü; perakut, akut ve kronik vakalarda %100'e kadar ulaşabilmektedir (Lau ve Fong 2008).

### **1.8.5. Antijenik Epitoplar, Kimerik Antijenler ve Multi-Epitoplu Peptidler**

Antijenler fonksiyonlarını protein molekülünün tamamı vasıtasıyla yerine getirmezler, bunun yerine immün yanıtta spesifik epitoplar sorumludurlar. Protein antijenleri, immünolojik yanıtlara aracılık etmek için B lenfosit, T lenfosit, sitotoksik T lenfosit ve bağışıklık sisteminin NK hücreleri tarafından tanınan epitop yapıları içermektedir. Aynı zamanda koruyucu bağışıklık açısından istenmeyen yapılar da içermektedirler. Epitoplar genellikle 5-7 ila 30 amino asit içermektedirler. Parazitin yaşam döngüsü aşamalarında birçok antijen bulunur ve her antijen diğer antijenlerden farklı olarak spesifik bir immün cevap oluşumuna neden olmaktadır. Bağışıklık sistemi yabancı mikroorganizmaları yok etmek için yabancı ve kendine ait epitoplar arasındaki farkı tanımaktadır (Lebrun ve ark 2007).

*Toxoplasma gondii*, birçok antijenik bileşime sahip karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Her antijen konak vücudunda farklı bağışıklık cevaplarını uyandırmaktadır (Dubey ve ark 1995). Çalışmalar, *T.gondii*'nin SAG1, SAG2, MIC3, ROP2, GRA1, GRA6 ve GRA7 gibi yapısal proteinlerinin farklı yerlerinde bulunan ve konağın hücrel ve humoral bağışıklık tepkisini uyaran birçok antijenik epitop bulunduğunu ortaya koymuştur (Ismael ve ark 2003, Kotresha ve Noordin 2010, Wang ve Yin 2014, Wang ve Yin 2015).

Küçük moleküllerden oluşan aşılarda bağışıklığı yeterince uyaramazlar. Bu nedenle, çoklu epitop tabanlı aşılarda ve tanı reaktiflerinin geliştirilmesi gereklidir. Çoklu antijenik epitoplar çoklu korumaya izin verebilmektedir. Belirli bir aşamaya özgü antijenler kullanılarak hazırlanan aşılarda, yalnızca o aşamaya özel koruma

sağlayabilmektedir. Bu nedenle aşılar farklı gelişim aşamalarına ait çoklu antijenlerden veya yoğun granüller, mikroneme proteinleri, zar proteinleri gibi yapılardan hazırlanabilirler (Cong ve ark 2013).

Kimerik proteinler, başlangıçta ayrı proteinler için kodlanmış iki veya daha fazla genin katılımıyla şekillendirilmektedir. Füzyon genlerinin translasyonu, başlangıç proteinlerinin her birinden köken alan fonksiyonel özelliklere sahip tek veya çoklu polipeptidlerle sonuçlanır. Rekombinant füzyon proteinleri rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur. Kimerik antijenler ve çoklu epitop peptidleri, bütün olarak parçalanmış parazitlerden elde edilen numunelerde anti-*T. gondii* antikollarının tespiti için teşhis aracı olarak kullanılan yeni nesil rekombinant ürünlerdir. *Toxoplasma gondii* geninin farklı antijenik bölgeleri genetik mühendislik yöntemleri kullanılarak kimerik antijenlerle birleştirilebilmektedir. Sonuç olarak elde edilen ürün, çeşitli *T. gondii* antijenlerinden farklı immüno-reaktif epitoplar içermektedir. Bu immünoreaktif epitoplar, antijenin hidrofobik bölümleri olup yüzey proteinlerinde daha iyi bir şekilde ortaya çıkmaktadırlar. Kimerik protein doğal antijenlerden daha fazla immünodominant olabilmektedir. SAG1, SAG2, SAG3, GRA5, GRA6 ve P35 proteinlerindeki immünodominant B hücre epitopları, enfeksiyonun farklı aşamalarındaki pozitif serumlarla kuvvetli bir şekilde reaksiyona girmektedirler. Bu nedenle rekombinant bir multi-epitop füzyon peptidi geçmişteki ve mevcut hastalığın ayırımında etkilidir ve IgG ve IgM'nin tespitinde oldukça hassastır. Rekombinant multi-epitop peptid antijenleri hamile kadınlarda toxoplasmosisin teşhisinde yararlı olabilmektedir (Holec-Gasior 2013).

Kimerik ve multi-epitop peptitler, *T. gondii*'nin iki veya daha fazla antijeninin multi-immünodominant epitoplarını kodlayan sentetik bir gen kullanılarak heterolog ifade sistemlerinde sentezlenebilmektedirler. Toplu olarak ele alındığında, *T. gondii* antijenlerinin farklı antijenik bileşenlerini içeren rekombinant proteinler, genetik mühendislik yöntemleri kullanılarak üretilebilirler ve üretilen bu multi-immünodominant epitopların etkinliği, serodiagnoz için doğru tanı kitlerinin geliştirilmesinde büyük potansiyele sahiptirler. Ayrıca, multiepitop antijen, *T. gondii* enfeksiyonlarının serodiagnozunda en umut verici antijenlerden biridir (Wang ve ark 2013).

#### **1.8.6. Toxoplasmosisin Teşhisinde Yüzey Protein Antijenleri (SAG)**

*Toxoplasma gondii* takizoit ve bradizoitlerinin plazma membranının yüzeyi, ağırlıklı olarak bir çoğunun SAG1 ve SAG2 ailesinin üyesi oldukları glycosylphosphatidylinositol bağlı (GPI) antijenlerle kaplanarak membrana bağlanan farklı protein moleküllerinden oluşur. SAG1 ve SAG2 proteinlerinin her ikisi de, enfeksiyon sırasında konak hücre adezyon ve invazyonunda rol almaktadırlar. Bu moleküllerin karakteristik özelliklerinden birisi bradizoit ve sporozoitlerin yüzeyinde bulunmamalarıdır. Bu moleküller, konak hücre invazyonu, immün modülasyon ve virulansta rol oynamaktadırlar. Ayrıca parazitin çevre şartlarında hayatta kalması için koruyucu ödev de görmektedirler. *Toxoplasma gondii*'nin yüzeyi, konak hücrelere bağlanan ilk bileşendir. *Toxoplasma gondii* yüzey antijenlerinin üst ailesinde SAG1, SAG2, SAG3, SAG4 ve SAG5 olmak üzere 5 ana yüzey proteini bulunmaktadır (Black ve Boothroyd 2000, Liu ve ark 2006). SAG1, SAG2A, SAG2B, SAG3, SRS1, SRS2 ve SRS3 esas olarak *T. gondii*'nin takizoitlerinin yüzeyinde ifade edilmektedirler. SAG1 ve SAG2A proteinleri oldukça immünojeniktir ve 20 homolog protein bileşiminde benzerdirler (Lekutis ve ark 2001).

SAG1 (P30), 30 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip olan, takizoit evresine spesifik ve çoğu izole edilmiş *T. gondii* suşunda oldukça korunmuş yapıda bir antijendir. SAG1, konak hücre zarı ile bağlantısı olan birkaç glycosylphosphatidylinositol içermektedir. Yüzey proteinleri içerisinde SAG1 daha fazla miktarda bulunur ve konak hücre zarına birincil bağlanma sürecinde rol oynamaktadır (Kasper ve ark 1983, Mineo 1993, 1994). Th1 ve Th2 benzeri T hücre yanıtı, B hücresi yanıtı, anti-SAG1 spesifik CD4+, CD8+ T hücrelerinin üretimi, makrofajlar ve NK hücrelerinde IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 gibi sitokinlerin üretimi de dahil olmak üzere, humoral ve hücrel bağışıklık tepkisini indüklemeye yeteneğine sahiptir (Liu ve ark 2006). Toxoplasmosisin klinik bulgularından takizoitler sorumludurlar. Takizoitler enfeksiyonun konağın neredeyse tüm organ ve dokularına yayılmasını sağlarlar. Takizoit formunun yüzeyi, konak hücrelerle etkileşime girmesi nedeniyle immün süreç için ana hedef durumundadır. SAG1, *T.gondii* proteinlerinin toplamda %3-5'ini oluşturur. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonlarında immün-profilaksi ve teşhis amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Kasper ve ark 1983).

Bir bağlanma ligandı olarak bilinen ve SAG ailesinin üyelerinden biri olan SAG2 (P22), takizoit yüzeyinde bulunan ana yüzey proteini olup iyi bir

immünojenite ve antijeniteye sahiptir (Huang ve ark 2002, Junior ve ark 2013, Wang ve Yin 2014). Takizoitlerde ifade edilen SAG2A ve SAG2B'nin aksine, SAG2C, -2D, -2X ve -2Y bradizoitlerin yüzeyinden ifade edilmektedir. SAG2C, -2D, -2X ve -2Y, kronik hastalıklar boyunca bradizoitleri bağışıklık yanıtlarına karşı korumaktadırlar. SAG2C, -2D, -2X ve -2Y, oldukça homolog proteinlerdir. Yapısal analizler, SAG2C, -2D, -2X ve -2Y'nin diğer iki bradizoit SAG2 üyesi BSR4 ve SPOROSAG ile SAG1'den biraz daha fazla benzer yapıda olduğunu ortaya çıkarmıştır (Lekutis ve ark2000, Cong ve ark 2013).

Konak hücrelerin tespiti ve bağlanmaya aracılık eden ligandlar olarak işlev gördüğü için SAG3 (P43) takizoitlerin konak hücrelere invazyonunda temel bir role sahiptir. *Toxoplasma gondii*'nin hücre içi invazyonunda, parazitle ilişkili ilk glikoaminoglikan bağlayıcı proteindir ve SAG3-heparan sülfat proteoglikanları (HSPG'ler) *T. gondii*'nin konak hücrelere bağlanması ile ilgilidir (Wang ve Yin 2014).

Yüzey protein grubundan biri olan SAG4, bradizoitlerde ifade edilmektedir. SAG4A (P18) ve SAG4B'den oluşan iki türü bulunmaktadır. SAG4 ve SAG4B benzerdir. SAG4A BAG1 ile benzerdir ve bradizoit bileşimi aracılığı ile transkripsiyonda ortaya çıkmaktadır (Lekutis ve ark 2001).

SAG5, SAG gen ailesinin önemli bir üyesi olup SAG5A, B, C, D ve E olmak üzere beş alt türe sahiptir. Bunlar, bir grup glycosylphosphatidylinositol bağlı yüzey antijenleri olan SAG1 ailesi ile yapı benzerliği bakımından yakınlık göstermektedirler. SAG5A, SAG5B ve SAG5C, intron içermeyen ve ardışık şekilde dizilmiş genler tarafından kodlanmaktadır. SAG5A (362 amino asit) bir C-terminal bölgesi içerir ve %98 oranında SAG5B ve SAG5C'ye benzerlik göstermektedir. SAG5B, 367 amino asit uzunluğundadır. SAG5B ve SAG5C, diğer yüzey proteinlerine %97,5 oranında benzerlik gösterirler (Spano ve ark 2002).

Bunlara ek olarak, SAG1 ile ilişkili diğer iki gen olan SAG5D ve SAG5E'nin 1.8 ve 4.0 kb olan DNA sekans uzunlukları yukarıdaki SAG5A'ya benzemektedir. SAG5D geni, takizoitlerde transkribe edilir ve transkribe bir pseudogen olan SAG5A-C ile %50 oranında benzerlik gösteren 362 amino asitten oluşmaktadır (Tinti ve ark 2003).

SAG1 ve konak hücre arasındaki etkileşim, yarışmacı bir inhibitör olarak neoglycoprotein, sığır serumu albumini ve glukozamidin kullanımıyla kısmen durdurulabilir (Mineo 1993). Parazitler konak hücrelere tutunmak için farklı yüzey antijenlerini kullanmaktadırlar. Parazit ligandlarının ve hücre yüzeyi reseptörlerinin tanımlanması, konak vücudunda parazitin nasıl hayatta kaldığını, konak hücrelere bağlanma, invazyon ve parazit-konak hücre etkileşimlerini anlamamız açısından önemlidir. Aktin/miyozin bazlı motor kompleksinin aktif penetrasyonu sürdürmede büyük rolü vardır. 20 saniyeden daha kısa sürede tamamlanan invazyon esnasında, konak yüzeyi üzerinde parazitin tutunmasını kademeli olarak artıran birçok adım bulunmaktadır (Mineo 1994, Black ve Boothroyd 2000, Carruthers ve Boothroyd 2007).

SAG1, hücre dışı parazitlere doğrudan öldürücü etki yapan sitotoksik T hücrelerini indüklemeye yeteneğine sahiptir. Koruyucu bağışıklığın indüklenmesi, *Toxoplasma* enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklıkta kesin bir rolü olan IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  gibi birçok sitokin tarafından düzenlenen farklı kategoride T lenfositleri (CD4+, CD8+) gerektirmektedir. Sitotoksik T hücreleri (CD8+ T hücresi) antijene spesifiktirler ve *T. gondii*'ye karşı bir hedef hücre olarak çalışan primer hücrelerdir. SAG1 proteini ile immünize edilmiş farelerde, yüksek düzeyde SAG1 spesifik CD8+ T hücresi şekillendiği görülmüş ve farelerin akut toxoplasmosis karşı tam bir direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Velge-Roussel ve ark 1994, Lektis ve ark 2001, Wang ve Yin 2014).

Enfekte konakta antijenik etkileri modüle etmek için *Toxoplasma* proteininin tam molekülü gerekmez. Molekül, spesifik etkilerini bireysel epitoplara vasıtasıyla üretmektedir. Bir *Toxoplasma gondii* proteini, sadece B hücreleri, T hücreleri ve NK hücreleri tarafından oluşturulan bağışıklık yanıtı ile yakından ilişkili epitop yapılarını içermekle kalmaz aynı zamanda koruyucu bir immün yanıtı için istenmeyen bazı elementleri de barındırmaktadır. Bir proteinin koruyucu etkilerini arttırmak için zararlı maddeleri elimine ederek ve avantajlı bileşenleri koruyarak uygun epitoplara seçmek gerekmektedir (Wang ve ark 2016). SAG1'in C-terminali, dominant antijenik ve immünojenik bölgedir. Hücresel immünitenin uyarılması SAG1 protein antijeninin proteolitik sindirimini gerektirmektedir (Velge-Roussel ve ark 1994). SAG1'in C-terminali, hasta serumu ile daha güçlü reaktivite göstermektedir. SAG1'in

antijenik epitoplarnn küçük haritalanması, *T. gondii* için teşhis reaktiflerinin ve epitop aşılarnn geliştirilmesine katkıda bulunabilir (Beghetto ve ark 2005, Wang ve ark 2013).

#### 1.8.6.1. Toxoplasmosis tanısında SAG2

*Toxoplasma gondii*, farklı aşamalarda farklı antijenlerle karakterize karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Yüzey antijenleri, en yüksek antijenite ve immünojeniteye sahiptir. *Toxoplasma gondii* takizoit ve bradzoitlerinin yüzey antijenleri SAG1 veya SAG2 ailelerinin üyesidirler. GPI bağlı antijenler *T. gondii*'nin tüm yüzeyine dağıtılır (Weiss ve Kim 2007). Bu moleküllerin ana sorumluluğu, invazyon süreci boyunca *T. gondii*'nin konak hücrelerin zarına yapışmasını teşvik etmektir. SAG2 üyeleri, parazitin konak hücrelerine tutunma ve invazyonu sırasında antikorların konak hücrelerine bağlanmasını inhibe ederler. Son zamanlarda, SAG2A, SAG2B, SAG2C, SAG2D, SAG2X ve SAG2Y gibi birçok SAG2 proteini tanımlanmıştır. SAG2A ve SAG2B takizoitlerde ifade edilirken, SAG2C, -2D, -2X ve -2Y'nin sadece bradzoitlerin yüzeyinde ifade edildiği görülmüştür (Lekutis ve ark 2000, Lekutis ve ark 2001, Cong 2013).

*Toxoplasma gondii* genel olarak konak serumunda *Toxoplasma* antijenlerine karşı şekillenmiş olan spesifik immüoglobülin M (IgM) ve IgG antikorları belirlenerek teşhis edilmektedir. Toxoplasmosisin teşhisi temel olarak anti-*T. gondii* spesifik antikorların serolojik testlerle ortaya konmasına dayanmaktadır. Serolojik testlerin özgüllükleri ve duyarlılıkları, çoğunlukla kullanılan diagnostik antijenlere bağlıdır. Günümüzde mevcut olan ticari serolojik kitlerin çoğunun temelinde *Toxoplasma* lizat antijenleri (TLAs) vardır. *Toxoplasma gondii*'nin rekombinant antijenik proteinleri toxoplasmosisin serolojik teşhisinde kullanışlı olan alternatif antijen kaynakları olabilirler (Holec-Gasior 2013).

Rekombinant antijenler, serumdaki antikorları tespit etmek için kullanılan yöntemlerde diagnostik reaktifler olarak büyük potansiyele sahiplerdir. Bu rekombinant proteinler spesifik IgG ve IgM'leri tespit etmek amacıyla ELISA testinde antijen olarak kullanılmaktadırlar. Rekombinant antijenler genellikle tek başlarına veya karışımlar halinde ELISA plakaları üzerine kaplanırlar (Kotresha ve Noordin 2010).

Rekombinant SAG2 proteini, akut ve kronik toxoplasmosislu gebe kadınların serumlarında antikor tespit etmek amacıyla antijen olarak test edilmiştir. IgG antikorlarının bu antijene karşı reaktivitesinde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Bazı raporlarda, *E.coli*'de ifade edilen rSAG2'nin, akut toxoplasmosislu insanlarda spesifik olarak *T. gondii*'ye karşı şekillenmiş olan IgG antikorunun tespitinde etkili olduğu gösterilmiştir (Li ve ark 2000).

İnsan *T. gondii* enfeksiyonunun teşhisi için IgG ELISA ve IgG avidite testlerinde rekombinant antijen (rROP1 + rSAG2) karışımı olarak SAG2 ve ROP1 kullanılmıştır. IgG ELISA'nın rROP1 ve rSAG2 antijen karışımı için duyarlılığı %91.1 olarak bildirilmiştir. Akut toxoplasmosis şüphesi bulunan hastalardan alınan serumlar için reaktivite %100 olarak bildirilmişken, kronik enfeksiyonlar için %88.2 olarak bulunmuştur (Drapala ve ark 2014).

*Toxoplasma gondii*'nin teşhisi için serolojik testlerin yaygın bir şekilde kullanımı konusunda uzlaşma sağlanmış olsa da kullanılan antijenlerinin saflaştırılma ve standardizasyonu henüz tam olarak geliştirilememiştir. Son zamanlarda, takizoit ve bradizoit yüzey antijenlerinin serodiagnostik amaçla daha fazla fayda sağladığı görülmektedir. Rekombinant antijenler (SAG1, SAG2 ve SAG3) değerlendirilmiş ve ticari ELISA kitleri ile karşılaştırılmıştır. Ticari ELISA testine kıyasla anti-*Toxoplasma* IgG antikorlarının saptanması için üç antijenin duyarlılığı ve özgüllüğü incelenmiş olup, rekombinant antijenler arasında SAG2 proteininin tanıdaki performansı çok yüksek bulunmuştur. Anti-*Toxoplasma* IgM antikorlarının tespitinde SAG1 ve SAG3 ile karşılaştırıldığında SAG2'nin en iyi sonuçları verdiği bildirilmiştir (Khanaliha ve ark 2014).

*Toxoplasma gondii* rekombinant kimerik antijenleri, insan toxoplasmosisinin serodiagnozu için SAG2, GRA1 ve ROP1 (büyük L ve küçük S fragmanları) olmak üzere üç immünodominant bölge ihtiva etmektedir. Çok kuyucuklu pleytler kimerik antijenler (SAG2-GRA1-ROP1S, SAG2-GRA1-ROP1L), protein karışımları (rSAG2, rGRA1 ve rROP1) ve *Toxoplasma* lizat antijenleri ile kaplanmaktadır. IgG ELISA kimerik antijenleri, rekombinant antijenler ve *Toxoplasma* lizat antijenleri karışımı ile karşılaştırılmışlardır. IgG ELISA'nın duyarlılığı, SAG2-GRA1-ROP1L kimerik antijeni için %100, üç protein karışımı için %99.4 ve TLA için %97.1 bulunmuştur (Ferra ve ark 2015).



Micronem proteinleri evcil hayvanlarda toksoplazmosa karşı tek dozluk bir aşı geliştirme çalışmalarında umut verici özellikte bulunmuştur. BALB/c farelerinin tek doz PLG-rSAG1/2 ile peritoneal immunizasyonu ile *T. gondii*'ye karşı bağışıklık ve koruma sağlandığı gözlemlenmiştir. İmmünizasyon, trifazik bir modelde serum IgG titreleri ve lenfosit proliferasyonu ile IFN- $\gamma$ 'da artış ile sonuçlanmıştır.  $1 \times 10^4$  canlı *T. gondii* RH suşu takizoiti ile yapılan letal subkutanöz bir epruvasyona karşı, farelerin %70'inde immünite geliştiği kaydedilmiştir (Chuang ve ark 2017).

## **1.9. Köpeklerde Toxoplasmosis**

### **1.9.1. Klinik Belirtiler**

Köpeklerde toxoplasmosisin klinik semptomları enfeksiyondan etkilenen organlara göre değişmekle birlikte; nöromusküler, solunum ve gastrointestinal sistem ile ilişkili bozukluklar olarak gözlenmektedir. Enfekte köpeklerin çoğu semptom göstermez. Vakaların çoğu beraber seyreden diğer bazı enfeksiyonlar (distemper, ehrlichiosis veya diğer enfeksiyonlar) sırasında görülmektedir (Pimenta ve ark 1993).

Hastalığın nörolojik formunda; beyin ve omurilikteki lezyonlar, ilerleyen parezis ile tanımlanmakta ve birkaç hafta sürebilmektedir. Nöromusküler muayene, ekstansör kasların az çalıştığını ve atrofik olduğunu göstermektedir (Silva ve ark 2002). Hastalığın solunum formu köpekleri bir hafta içinde öldürebilirken, gastrointestinal form ishale seyretmektedir. Hastalığın klinik tablosu gebelik döneminde farklılık göstermektedir. Deneysel olarak toxoplasmosis oluşturulan köpeklerde hiçbir klinik belirtiyeye rastlanmamıştır (Dubey ve Beattie 1988).

Köpek toxoplasmosisi genç köpeklerde, çoğunlukla 7 haftadan veya 1 yaşından küçük yavru köpekler ile immünoşüpresif yaşlı köpeklerde öldürücü seyretmektedir. Enfeksiyon yüksek ateş, bademcik iltihabı, nefes darlığı, kusma, diyare, sarılık ve miyokard hasarları ile tanımlanmaktadır. Nörolojik belirtiler; nöbetler, kranial sinir defisitleri, titreme, ataksi (beden-kas işlevlerinde bozukluk), parezis (hafif felç), miyozit, posterior ekstremitelerde paralizisinde öncelikle paraparezi ve tetraparezi (spastik tetra parezi) ortaya çıkabilmektedir. Retinitis, anterior üveit, iridosiklit, siliyer epitelyum hiperplazisi, keratokonjunktivitis ve optik sinir nevriti gibi oküler lezyonlar da bildirilmiştir (Dubey ve ark 2009).

Yaşlı köpeklerde toxoplasmosisin klinik belirtileri neosporozun nörolojik bulguları ile ilişkilendirilmektedir. Bu iki hastalığın klinik belirtilerinde benzerlikler bulunmaktadır (Babür ve ark 1997, Aktaş ve ark 1998).

### 1.9.2. Köpeklerde Toxoplasmosisin Teşhisi

Köpek toxoplasmosisinin teşhisi, köpeğin yaşı, klinik bulgular, aşı öyküsü ve serolojik tanı gibi birkaç faktöre bağlanmaktadır. Birçok klinik olgu, pnömoni, eş zamanlı distemper virüsü enfeksiyonu ile hepatit bulunan köpeklerde ortaya çıkmakta ve posterior ekstremitte felci köpek toxoplasmosisi ile paralellik göstermektedir. Toxoplasmosisda spesifik antikorlar için serum çeşitli metotlarla analiz edilmektedir. Tanı, biyolojik metotlar, serolojik testler (rekombinant antijenler ile ELISA, SFDT, IFA, IHA, CF DAT, MAT), histolojik tanı yöntemleri (doku kültürü), serum kimyası, sitoloji, dışkı muayenesi ve *T. gondii* DNA'sının saptanmasıyla yapılmaktadır (Dubey 2005).

Biyolojik tahlilde incelenecek materyal seçimi hastalığın klinik bulgularına bağlı olarak değişmektedir. Konjenital bozukluklarda fetusun salgısından, vücut sıvılarından, çeşitli dokularından, serebral omurga sıvısından ve lenf nodundan alınan biyopsi materyali incelenebilir. Sabin-Feldman Boya testi, toxoplasmosisin teşhisinde kaydedilen en büyük gelişmelerden biridir. Bu testin, insanlarda toksoplazma enfeksiyonlarının tanısında yanlış sonuç vermeyen, son derece hassas ve özel bir metot olduğu bildirilmiştir (Sabin ve Feldman 1948). Modifiye aglütinasyon testi (MAT), tüm hayvanlarda toxoplasmosisin serodiyagnozunda geniş ölçüde kullanılmıştır (Dubey 2005). ELISA testi, spesifik antikorların saptanması için en sık kullanılan analizler arasında sayılmaktadır (Jiang ve ark 2015).

Hastalığın akut safhasındaki biyokimyasal bozukluklar, hipoalbuminemi ve hipoproteinemi içerir. Köpeklerin serum alkalın fosfataz, serum amilaz ve hepatic nekrozlu lipaz, kreatin kinaz aktiviteleri genellikle yüksektir. Takizoitler akut hastalık sırasında tüm dokularda ve vücut sıvılarında belirlenebilmektedir. Nonrejeneratif anemi, nötrofilik lökositoz, lenfositoz, monositoz ve eozinofili sıklıkla sitoloji ile belirlenmektedir (Dubey ve ark 2009).

Organlardan yapılan yayma frotilerin Giemsa ile boyanarak mikroskopta incelenmesiyle hızlı bir tanı yapılabilmektedir. Mikroskop alanında takizoitler

genellikle yuvarlak veya oval olarak görünmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yönteminde B1 genini kullanarak tek bir takizoitten bile *T. gondii* DNA'sı, tespit edilmiştir (Dubey 2008).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Çalışma Bölgesi, Hayvan Sayısı, Örnek Toplama

Bu araştırma için Temmuz 2017'de, Konya Büyükşehir Belediyesi'ne bağlı hayvan barınağında yaşayan farklı cinsiyetteki 334 adet köpek klinik muayeneleri yapılarak incelenmiş ve ardından da her bir köpekten kan örnekleri toplanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Konya Büyükşehir Belediyesi Hayvan Bakımevi

Hayvanların *Vena cephalica* veya *V. saphanea parva*'nın ramus dorsalisinden antikoagülanlı tüplere tekniğine uygun olarak yaklaşık 5 ml kan alınmıştır. Kanlar 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip plazması çıkartılmış ve test edilinceye kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir. Plazmalar *T. gondii* antikoru yönünden, hem Ankara'da bulunan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Toxoplasma Laboratuvarında altın standart olarak kabul edilen Sabin-Feldman boya testi ile, hem de Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında ELISA testiyle incelenmiştir. Rekombinant SAG2 proteini Japonya'da Obihiro Üniversitesi Ziraat ve Veteriner Fakültesi Ulusal Protozoon hastalıkları Araştırma Merkezi (National Research Center for Protozoan Diseases)

laboratuvarında üretildikten sonra Türkiye'ye getirilerek ELISA testinde antijen olarak kullanılmıştır.

## **2.2. Laboratuvar incelemeleri**

### **2.2.1. İndirekt ELISA**

#### **2.2.1.1. *T.gondii*'nin rekombinant SAG2 antijeninin (rTgSAG2) laboratuvarında üretilmesi**

Bu çalışmada 334 sokak köpeğinden alınan plazmalarda *T.gondii*'ye spesifik IgG antikorlarının tespitinde *T. gondii* takizoitlerinden elde edilen rekombinant TgSAG2 proteini indirekt ELISA testinde antijen olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan TgSAG2-GST rekombinant proteini daha önceden tanımlanan metoda göre oluşturulmuştur (Zhou ve ark 2016). Bu yöntemde, kesilmiş TgSAG2 geninin PCR ürünü pGEX-4T vektörün DNA'sına (Amsterdam Pharmacia Biotech, San Francisco, CA. U.S.A) sokulduktan sonra *E. coli* BL-21 suşuna transforme edilmiştir. Optimum invitro kültür ortamı sağlanarak transforme olmuş *E. coli* BL21 hücrelerinin TgSAG2 proteinini eksprese etmesi sağlanmıştır. Kısaca, 10 ml taze transforme edilmiş *E. coli* hücreleri 50 µg/ml ampisilin içeren 1L LB medyumunda 37°C sıcaklıkta, 250 rpm'de 600 nanometredeki optik dansitesi (OD) 0.5'e ulaşıncaya kadar çoğaltılmıştır. Bu proteinin ekspresyonu 5mM isopropil β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) kullanılarak indüklenmiş ve 27 °C'de bir gece inkübe edilerek hücreler çoğaltılmaya devam edilmiştir. *E. coli* kültürü 8.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra hücre pelleti TNE tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA ve %1 Triton X-100), 50 mg/ml lizozim, %1 (w/v) N-Laurosilsarkosin sodyum ve proteaz inhibitörleri içeren tamponda sulandırılmıştır. Bu rekombinant protein Glutathion-Sefaroz 4B boncukları (Amersham Pharmacia Biotech) kullanarak saflaştırılmıştır. Protein ekspresyonları Coomassie mavisi ile boyanmış ve SDS-PAGE jelde görüntülenmiştir. Eksprese edilen proteinlerin konsantrasyonu % 40 BCA protein kiti ile ölçülmüştür.

İndirekt ELISA testinde TgSAG2-GST ve GST proteinleri kaplama tamponu (0.05 M karbonat-bikarbonat tamponu, pH 9.6) içinde 2-4 µg/ml konsantrasyonda seyreltilmiştir. ELISA pleytinin kuyucukları 100 µl antijen ile kaplanmış ve bir gece

boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Kaplama çözeltisi döküldükten sonra, pleytler %3 yağsız süt tozu içeren PBS ile 37°C'de 1 saat boyunca bloklanmıştır. Pleytler PBST ile yıkandıktan sonra, serum numuneleri (seyreltilmiş 1:100) eklenerek tekrar 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bağlanan antikolar horseradish peroksidaz (HRP) ile bağlı (Bethyl, Montgomery, AL, USA) anti-dog IgG (1:4.000) ve ardından ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolinsülfonik asit)] (Sigma, ABD, Louis, MO, ABD) ile görünür hale getirilmiştir. Oda sıcaklığında renk oluşumu izlenmiş ve horseradish peroksidaz enziminin aktivasyonunu durdurmak için 50 µl durdurma solüsyonu ilave edilmiştir (2 M Sülfürik asit). Optik dansite (OD) 415 nm dalga boyunda mikropleyt okuyucu ile ölçülmüştür (ELISA reader/Rayto Microplate Reader, Model: RT-2100C). ELISA sonuçları her bir numune için GST proteininin OD<sub>415</sub> değerinin rekombinant TgSAG2'nin OD<sub>415</sub> değerinden çıkarılarak değerlendirilmiştir. Cutt-off değerleri köpek serumu örnekleri kullanılarak belirlenmiş ve negatif serumların OD<sub>415</sub>'de ölçülen ortalama değerine standart sapmanın 3 katı eklenerek hesaplanmıştır. Test edilen örneğin değeri cut-off değerinden yüksek olduğunda örnek pozitif olarak kabul edilmiştir.

#### **2.2.1.2. İndirekt ELISA testinin aşamaları**

1. Antijen kaplama: Antijen 2 µg/ml oranında karbonat bikarbonat tamponu ile sulandırılmıştır.
2. Mikropleytin her kuyucuğuna 100 µl antijen solüsyonu damlatılmış ve 4°C'de bir gece bekletilmiştir.
3. Pleytler yıkama tamponu (PBST) ile bir defa yıkanmıştır.
4. Her kuyucuğa 100 µl bloklama solüsyonu (%3 yağsız süt tozu: 3 gr yağsız süt tozu +100 ml PBS) damlatılmıştır.
5. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
6. Pleytler yıkama tamponu PBST ile bir defa yıkanmıştır.
7. Primer antikor reaksiyonu: Pleytlere pozitif kontrol, negatif kontrol ve serum örneklerinden 50'şer µl damlatılmıştır (Bütün örnekler %3'lük yağsız süt tozu ile 1:100 oranında sulandırılmıştır)

8. Pleytler 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.

9. Pleytler Yıkama tamponu ile 6 defa yıkanarak, kağıt havluya hafifçe vurularak kurutulmuştur.

10. Sekonder antikör reaksiyonu: 50 µl konjugat (horseradish peroksidaz enzimi ile işaretli anti-dog IgG, 1:4000 oranında %3 yağsız süt tozu ile sulandırılmış) damlatılmıştır.

11. Pleytler 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.

12. Pleytler yıkama tamponu ile 6 defa yıkanmış, kağıt havluya hafifçe vurularak kurutulmuştur.

13. Pleytlerin her bir çukuruna 100 µl substrat (ABTS) solüsyonu hızlı bir şekilde damlatılmış ve karanlık kutuda oda ısısında 1 saat bekletilmiştir.

14. Pleytler ELISA okuyucusunda 415 nm filtre kullanılarak reaksiyonun optik dansitesi ölçülmüştür.

### **2.2.1.3. ELISA Testinde Kullanılan Solüsyonlar**

**1. Antijen Sulandırma Solüsyonu:** Karbonat-bikarbonat tamponu: 50 mM karbonat-bikarbonat tamponu (ph 9.6)

NaHCO<sub>3</sub> 2.93 gr

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 gr

900 ml distile suda iyice çözdürülmüş, HCl veya NaOH ile pH 9.6’ya ayarlanmıştır. Daha sonra solüsyona distile su eklenerek 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

**2. Yıkama Tamponu:** (PBST 10×) (pH: 7.4)

NaCl 160 gr

KCl 4 gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4gr

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  58 gr

Karışım 1800 ml distile suda iyice çözdürüldükten sonra, pH 7.4'e ayarlanmıştır. Toplam solüsyon distile su ile 2000 ml'ye tamamlanmıştır. Üzerine 10 ml Tween 20 polyoxyethylene (20) sorbitan eklenerek yıkama tamponu (PBST 10×) oluşturulmuştur. Bu yıkama tamponu konsantredir. Kullanılacağı sırada 1:10 oranında distile su ile sulandırılmıştır.

### 3. Bloklama Solüsyonu: Yağsız süt tozu (%3)

Yağsız süt tozu 3gr

PBS 100 ml

### 4. Substrat Solüsyonu: ABTS

ABTS (solid) 3 mg

ABTS tamponu\* 10 ml

Karışım iyice çözdürüldükten sonra kullanılacağı sırada üzerine 1 µl %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  ilave edilmiş ve hemen damlatılmıştır.

ABTS, tablet olarak kullanıldığında 1 adet tablet 20 ml ABTS tamponu içinde eritilip, üzerine 10 µl  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklendikten sonra hemen damlatılmaktadır.

\* **ABTS tamponu:** pH, 4.0

A: 0.1 M citric acid, monohydrate 10.507 gr, 500 ml distile suda çözdürülmüş,

B: 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  35.814 gr, 500 ml distile suda çözdürülmüş,

A tamponunun üzerine pH 4.0 olana kadar B tamponundan ilave edilip 4°C buzdolabında muhafaza edilmiştir.



## 2.2.2. Sabin-Feldman Boya Testi (SFDT)

Testin esası canlı takizoitlerin şüpheli plazma örneği ve kompleman varlığında inkübasyon sonrası lizise uğrayan takizoitlerin metilen mavisi ilave edilerek görünür hale getirilmesine dayanır. Şüpheli plazma örneğinin spesifik *T. gondii* IgG antikorları varlığında klasik yoldan aktive olan komplemanın parazit membranı ile reaksiyona girdiği ve membranı tahrip ederek paraziti lizise uğrattığı bulunmuştur. Şüpheli örnekte *T. gondii* IgG antikorlarının bulunmaması durumunda bir kompleks oluşmadığı için kompleman membrana bağlanamamakta, sağlam kalan takizoitler metilen mavisi ile boyanarak negatif sonuç vermektedir. Boyanmamış veya parçalanmış takizoitlerin görülmesi özgün antikor varlığının göstergesi olup, %50 boyanmamış takizoitlerin görüldüğü son dilüsyon miktarı testin değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmaktadır (Caner ve Gürüz 2011).



Şekil 4. *Toxoplasma gondii* takizoitlerinin in vivo kültürasyonunda kullanılan laboratuvar fareleri

### 2.2.2.1. Antijenin hazırlanması

Sabin Feldman boya testinde, *T. gondii*'nin fare peritonunda çoğaltılan canlı takizoitleri kullanılmıştır. Bunun için test günü, uygulamadan iki saatten daha az bir

süre önce elde edilmiş canlı takizoitler tercih edilmiştir. SFDT için *T. gondii* antijeni aşağıdaki protokole göre hazırlanmıştır (Caner and Gürüz 2011).

*Toxoplasma gondii* pasajı: İntraperitoneal yolla enfekte edilen farelerden alınan periton sıvısı Balb/c farelere (Şekil 4, 5), fare başına 0.5 ml intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Yaklaşık 68 saat sonra fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir (Şekil 6). Kontaminasyonu önlemek için işlem sırasında stok solüsyon antibiyotikli serum fizyolojik içeren steril bir tüp içine alınmıştır. Farelerin periton boşluğundan elde edilen takizoitlerin (Şekil 7) hemositometrede tripan mavisi ile sayılarak canlılıkları değerlendirilmiştir. Antijen kaynağı olarak kullanılan peritoneal eksudat 400.000 takizoit/ml olacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırılmıştır.



**Şekil 5.** *Toxoplasma gondii* takizoitlerinin laboratuvar faresinde periton içine enjeksiyonu

Kullanılan maddeler:

1. 6-8 haftalık ve 25-30 g ağırlığında *toxoplasma* antikoru yönünden negatif fareler
2. Antibiyotikli serum fizyolojik solüsyonu
3. Hemositometre



**Şekil 6.** Laboratuvar faresinin kabin içinde sedasyonu



**Şekil 7.** Laboratuvar faresinden periton sıvısının aspirasyonu

#### **2.2.2.2. Kompleman faktörün hazırlanması**

Kompleman faktörü olarak anti-Toxoplasma antikorları yönünden negatif olan insan serumu kullanılmıştır (Şekil 8). 20 ml insan serumu üzerine 4 ml %5

TriSodyum sitrat solüsyonu ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine 120 µl heparin (5000 ünite/ml) ilave edilmiştir. İnsan serumu kullanım zamanına kadar -20 °C’de saklanmıştır.



**Şekil 8.** Kompleman faktör ihtiva eden insan serumu

#### **2.2.2.3. Pozitif kontrol serumu**

Sabin Feldman boya testinin uygulanması sırasında, en az 1/2048 dilüsyonda pozitif reaksiyon veren serum, Toxoplasma yönünden pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol serumu olarak, ayrıca liyofilize halde satılan pozitif kontrol serumu da kullanılmıştır. SF boya testinin uygulaması sırasında pozitif kontrol serumunun 1/256 (125 IU/ml) ve üzeri dilüsyonlarda pozitiflik vermesi durumunda testin çalıştığı kabul edilmiştir.

#### **2.2.2.4. Solüsyonların hazırlanması**

1- Sodyum karbonat solüsyonu (%0.53): 26.5 gr sodyum karbonat 500 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

2- Sodyum tetraborat solüsyonu (%1.91): 1.91 gr sodyum tetraborat 100 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3- Alkali metilen mavisi solüsyonu (%1.6): 1.6 gr metilen mavisi 100 ml distile su ve 100 ml metanol içinde karıştırılarak elde edilmiştir.

4- Boyama solüsyonu: 19.4 ml %0.53 Sodyum karbonat solüsyonu, 0.6 ml %1.91 sodyum tetraborat solüsyonu ve 0.3 ml %1.6 alkali metilen mavisi solüsyonu karıştırılarak hazırlanmıştır.

5- Trisodyum sitrat solüsyonu (%25): 25 gr trisodyum sitrat 100 ml distile su ile karıştırılarak elde edilmiştir, trisodyum sitrat solüsyonu (%5) hazırlamak için de ilk hazırlayacağımız solüsyondan (%25) 10 ml alınmış, 40 ml distile su ile karıştırılmıştır.

#### 2.2.2.5. Sabin Feldman boya testi

Bu test iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama deneme plağında kullanılmış, malzeme ve plazmalar kontrol edilmiştir. Deneme plağında *Toxoplasma* referans kontrol serum, *T. gondii* antijeni ve kompleman faktörün çalışıp çalışmadığına karar verilip, sonuçlar beklendiği gibi çıktığında plazma örnekleri ile SF boya testi uygulamasına geçilmiştir.



Şekil 9. *Toxoplasma* referans kontrol serum, *T. gondii* antijeni ve kompleman faktörün çalışıp çalışmadığının analizi yapılırken kullanılan test tüpleri

## **Yöntem:**

Deneme plağı için 96 çukurlu, düz tabanlı mikrotitrasyon plağı veya tüpler kullanılmıştır. Toxoplasma referans kontrol serumu, plağın ilk iki sütununda 1/4 dilüsyondan başlanarak 1/64.000'e kadar sulandırılmıştır (Şekil 9). Pozitif kontrol serumu üçüncü sütunun ilk çukurundaki 1/4 dilüsyondan başlanarak 1/512 dilüsyona kadar seri olarak sulandırılmıştır (Sulandırma sırasında ilk çukura 25 µl kontrol serumu, ikinci çukura ise 25 µl kontrol serumu + 25 µl serum fizyolojik konulmuştur. Sonra bu çukurdan alınan 25 µl örnek bir sonraki çukurda bulunan 25 µl serum fizyolojik üzerine aktarılmış pipetle karıştırıldıktan sonra işlem son çukura kadar aynı şekilde devam ettirilerek son çukurda 25 µl dışarı atılmıştır.). Daha sonra her bir çukura 50 µl kompleman faktör + 25 µl *T. gondii* antijeni ilave edilmiştir. *Toxoplasma gondii* antijeninin kontrol sulandırmasında iki çukurda paralel olarak 75 µl serum fizyolojik ile 25 µl *T. gondii* antijeni karıştırılmıştır. Kompleman faktörün kontrol sulandırmasında ise 25 µl serum fizyolojik + 50 µl kompleman faktör + 25 µl *T. gondii* antijeni bir çukurda karıştırılmıştır. Plak 1 dakika oda sıcaklığında otomatik karıştırıcıda bekletilmiş ve sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada 25 µl %1.6 alkali metilen mavisi solüsyonu ilave edilerek 1 dakika oda sıcaklığında otomatik karıştırıcıda çalkalanmış ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Plak 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra invert mikroskop ile 40x büyütmede değerlendirilmiştir.

### **2.2.2.5.1. Sabin Feldman boya testi uygulaması**

Düz tabanlı 96 çukurlu bir mikrotitrasyon plağında köpek plazmalarının dilüsyonu yapılmıştır. Plağın ilk sütununda plazma 1/4 dilüsyondan başlanarak 1/512 dilüsyona kadar sulandırılmıştır. Sulandırma sırasında ilk çukura sadece 25 µl köpek plazması konulmuş, ikinci çukura ise 25 µl köpek plazması + 25 µl serum fizyolojik eklenmiştir. Sonra bu çukurdan alınan 25 µl örnek bir sonraki çukurda bulunan 25 µl serum fizyolojik üzerine aktarılmıştır, pipetle karıştırıldıktan sonra işlem son çukura kadar aynı şekilde devam etmiş ve son çukurda 25 µl dışarı atılmıştır. Daha sonra her bir çukura 50 µl kompleman faktör + 25 µl *T. gondii* antijeni ilave edilmiştir. Bu aşamada plak 1 dakika oda sıcaklığında plak çalkalayıcı üzerinde karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her çukura 25 µl %1.6 alkali metilen mavisi solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika daha çalkalanmış

ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Plak 10 dakika oda ısısında düz bir zeminde bekletildikten sonra mikroskop ile 40x büyütmede incelenmiştir. 1/16 ve üzeri antikor titresi pozitif kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Araştırma, Konya Büyükşehir Belediyesi Veterinerlik Şube Müdürlüğü (Barınak Merkezi)'nde yaşayan her iki cinsiyetten 334 köpek üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm köpekler için genel klinik bulgular yaş ve cinsiyetlere göre kaydedilmiştir. Kan örnekleri (3-5 ml) antikoagülanlı tüplere tekniğine göre alınmış ve serolojik tanı için plazması ayrılmıştır. *Toxoplasma gondii* antikorlarının tespiti, Sabin-Feldman boya testi (altın standart olarak) ile yapılmıştır. Boya testinde, serumların 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024 dilüsyonları incelenmiştir.

İndirekt-ELISA testinde rekombinant SAG2 proteininin üretimi ve değerlendirilmesi laboratuarda gerçekleştirilmiş ve serumların 1/100 oranındaki dilüsyonları antikor varlığı yönünden analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi, Sabin-Feldman Boya testi ile köpeklerin %98.5'i, ELISA testi ile %33.8'i anti-*T.gondii* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Sabin-Feldman Boya testinde, erkeklerin %99.2'si, dişilerin ise %98.1'i pozitiflik olarak tespit edilmiştir. ELISA testi ile erkeklerin %40.3'ü, dişilerin %30'u pozitif olarak belirlenmiştir.

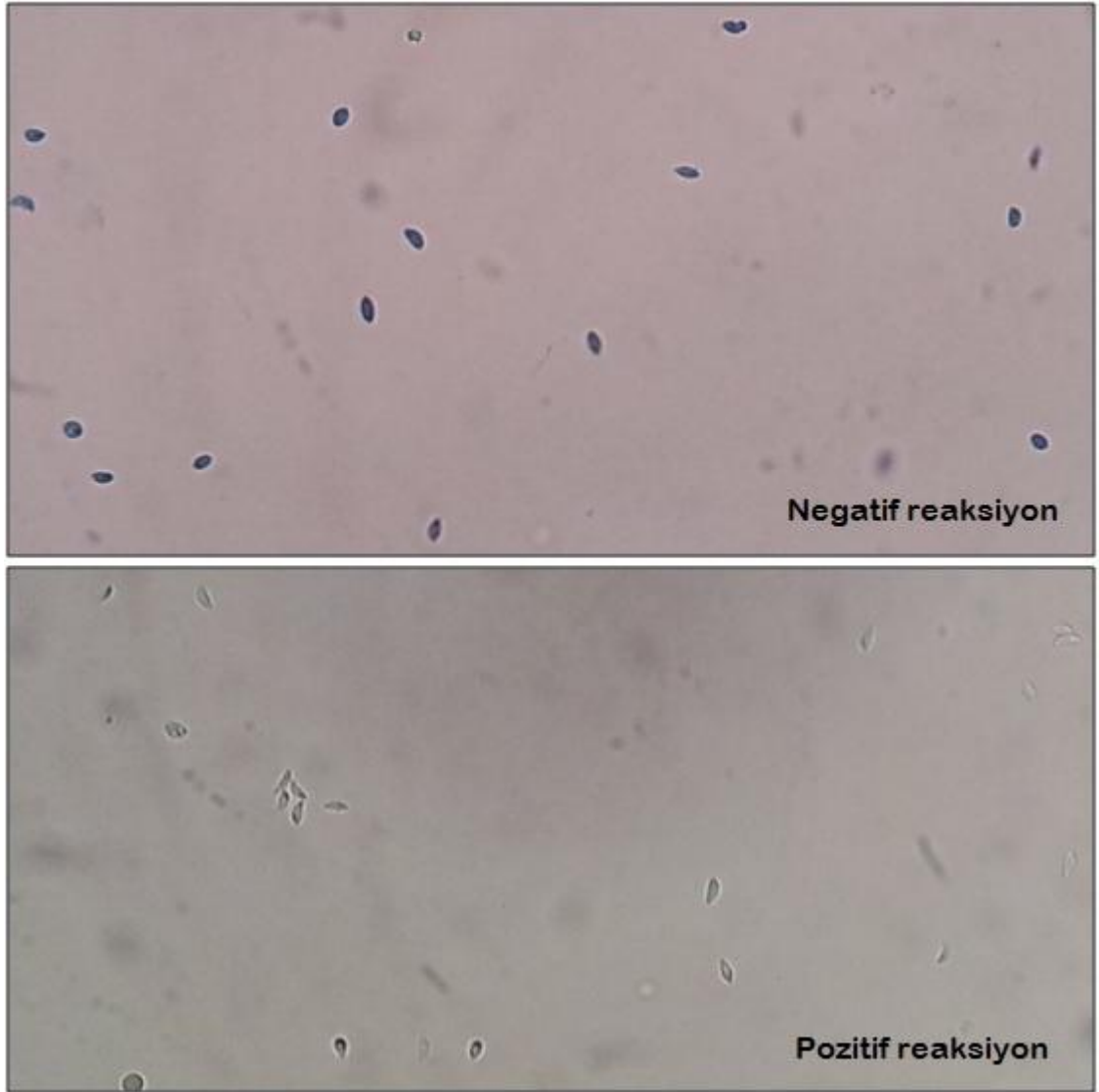
**Çizelge 3.1.** Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve indirekt-ELISA ile tespit edilen anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının köpeklerdeki dağılımı.

Cinsiyet	Hayvan Sayısı	Sabin-Feldman boya testi (SFDT)							ELISA		
		Negatif	Pozitif	%	1/16	1/64	1/256	1/1024	Negatif	Pozitif	%
Erkek	124	1	123	99.2	61	43	16	3	74	50	40.3
Dişi	210	4	206	98.1	107	72	19	8	147	63	30
Toplam	334	5	329	98.5	168	115	35	11	221	113	33.8

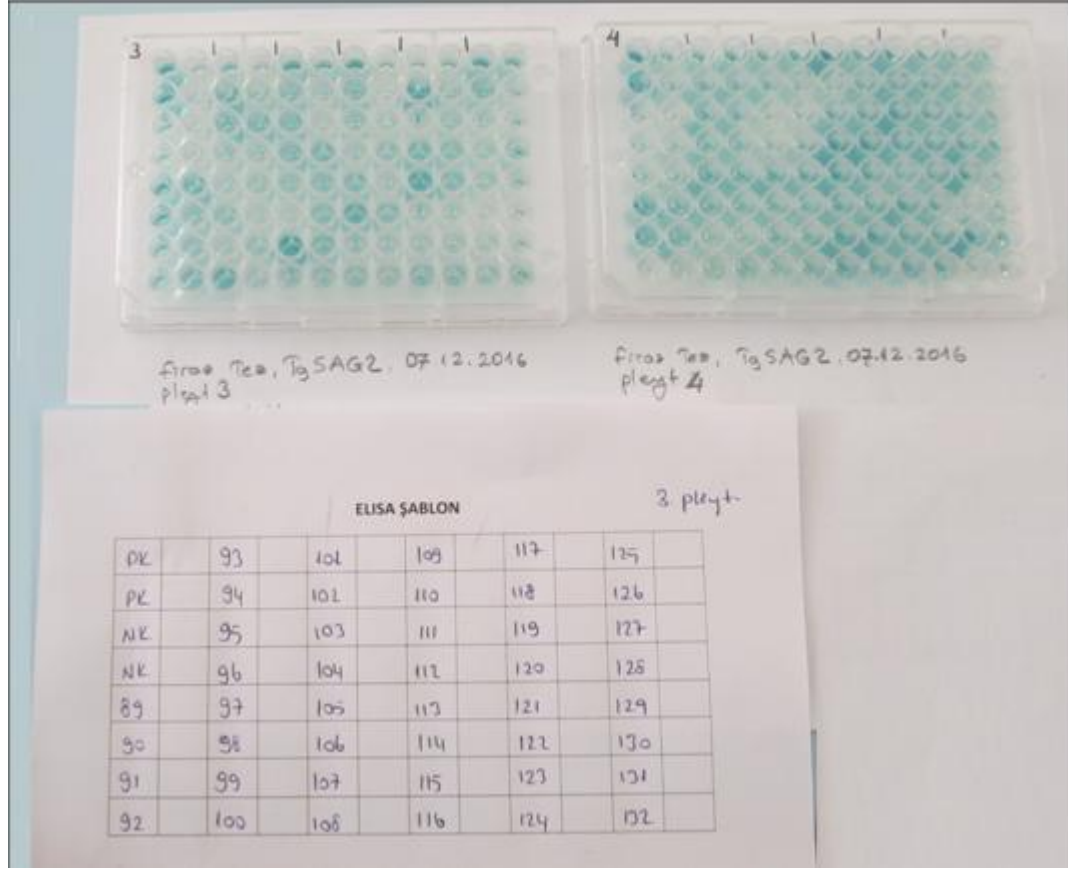
Boya testi, 1/16, 1/64, 1/256 ve 1/1024 dilüsyonlarda uygulanmıştır. Hayvanlardaki seropozitiflik 1/16 dilüsyonda 168 (61 erkek, 107 dişi), 1/64 dilüsyonda 115 (43 erkek, 72 dişi), 1/256 dilüsyonda 35 (16 erkek, 19 dişi) ve 1 / 1024 dilüsyonda 11 (3 erkek, 8 dişi) olarak tespit edilmiştir.



Sabin-Feldman boya testi ve indirekt-ELISA ile tespit edilen pozitif ve negatif reaksiyonlar Şekil 10 ve Şekil 11'de gösterilmektedir.



**Şekil 10.** Sabin-Feldman boya testinde kaydedilen pozitif ve negatif reaksiyonlar



**Şekil 11.** ELISA ile kaydedilen pozitif ve negatif reaksiyonlar

Yaşlara göre enfeksiyon durumları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Sabin-Feldman Dye testi ile 0-1 yaş grubundaki 14 köpeğin tamamında seropozitiflik tespit edilmiştir. 1/16 dilüsyonda 7, 1/64 dilüsyonda 6 ve 1/1024 dilüsyonda 1 köpekte pozitiflik tespit edilmiştir. 1/256'da negatif sonuç alınmıştır. ELISA'nın bu yaş grubunda seropozitif sonucu %21.4 (3/14) olarak bulunmuştur.

**Çizelge 3.2.** Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve indirekt ELISA ile spesifik anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının yaşlara göre dağılımı.

Sabin-Feldman Boya testi (SFDT)									ELISA		
Yaş	Hayvan sayısı	Negatif	Pozitif	%	1/16	1/64	1/256	1/1024	Negatif	Pozitif	%
0-1	14	0	14	100	7	6	0	1	11	3	21.4
1-3	320	5	315	98.4	161	109	35	10	210	110	34.3
Toplam	334	5	329	98.5	168	115	35	11	221	113	33.8

1-3 yaş grubunda, Sabin-Feldman boya testinde 320 köpekten 315 (%98.4)'i seropozitif bulunmuştur. 1/16 dilüsyonda 161, 1/64 dilüsyonda 109, 1/256 dilüsyonda 35 ve 1/1024 dilüsyonda 10 köpekte pozitiflik tespit edilmiştir. ELISA'nın seropozitiflik sonucu %34.3 (110/320) bulunmuştur.

Muayene edilen hayvanlarda çeşitli klinik bulgular tespit edilmiştir. Klinik bulgular arasında arka bacaklarda felç ve atrofi, burun akıntısı, deri lezyonları, kene enfestasyonları, kusma, diyare, sinir sistemi bozuklukları ve zayıflama gözlenmiştir.

Çizelge 3.3'de Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve ELISA'nın klinik bulgularla ilişkisi gösterilmiştir. Sabin-Feldman Boya testinde, klinik bulguları olan toplam 61 hayvandan 60'ı (%98.3) seropozitif bulunmuştur. Seropozitiflik oranı arka ekstremitte felci ve atrofi görülen hayvanlarda, deri lezyonları olan hayvanlarda, kene enfestasyonu, arka ekstremitte felci, atrofi ve deri lezyonları olan hayvanlarda %100, burun akıntısı olan hayvanlarda %96.8 olarak tespit edilmiştir. 1/16 sulandırmada pozitif bulunan 31 hayvanın, 15'inde burun akıntısı, 10'unda deri lezyonları, 4'ünde kene istilaları, 1'inde arka ekstremitte felci ve atrofi ile 1'inde arka ekstremitte felci, atrofi ve deri lezyonları tespit edilmiştir. 1/64 sulandırmada 22 hayvanda pozitiflik tespit edilmiş ve 13 köpekte burun akıntısı, 5 köpekte deri lezyonları, 4 köpekte kene enfestasyonları bulunmuştur. 1/256 sulandırmada 3 köpek pozitif bulunmuş, bunların ikisinde burun akıntısı, birinde deri lezyonları tespit edilmiştir. 1/1024 sulandırmada 4 köpek pozitif bulunmuş, bunların birinde burun akıntısı, ikisinde deri lezyonları, birinde kene enfestasyonları gözlenmiştir.

**Çizelge 3.3.** Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve indirekt ELISA'nın klinik belirtilerle ilişkisi.

Klinik belirtiler	Sabin-Feldman Boya testi (SFDT)								ELISA		
	Hayvan sayısı	Negatif	Pozitif	%	1/16	1/64	1/256	1/1024	Negatif	Pozitif	%
Arka Ekstremitte Felci ve Atrofi	1	0	1	100	1	0	0	0	0	1	100
Burun Akıntısı	32	1	31	96.8	15	13	2	1	22	10	31.2
Deri Lezyonları	18	0	18	100	10	5	1	2	11	7	38.8
Kene Enfestasyonları	9	0	9	100	4	4	0	1	6	3	33.3
Arka ekstremitte felci, atrofi ve deri lezyonları	1	0	1	100	1	0	0	0	0	1	100
Toplam	61	1	60	98.3	31	22	3	4	39	22	36

Klinik bulgular gösteren köpeklerin %36'sı (22/61), ELISA'da seropozitif bulunmuştur. Arka bacaklarda felç ve atrofi görülen iki hayvanın ikisi (%100), deri lezyonları görülen hayvanların % 38,8'i (7/18), kene enfestasyonu olan hayvanların %33,3'ü (3/9), burun akıntısı olan hayvanların % 31,2'si (10/32) pozitif bulunmuştur.

Çizelge 3.4'te Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve ELISA testlerine göre cinsiyet ile klinik belirtiler arasındaki ilişki verilmiştir. Klinik belirti gözlenen 61 köpeğin (17 erkek, 44 dişi) 60'ında (%98.3) Sabin-Feldman boya testi ile pozitiflik belirlenmiş, dişilerin %100'ü ve erkeklerin %94.1'i pozitif bulunmuştur.

**Çizelge 3.4.** Sabin-Feldman Boya testi (SFDT) ve ELISA testlerine göre cinsiyet ile klinik belirtiler arasındaki ilişki.

Cinsiyet	Klinik belirtileri olan hayvan sayısı	Sabin-Feldman Dye test (SFDT)							ELISA		
		Negatif	Pozitif	%	1/16	1/64	1/256	1/1024	Negatif	Pozitif	%
Erkek	17	1	16	94.1	10	5	1	0	10	7	41.1
Dişi	44	0	44	100	21	17	2	4	29	15	34
Toplam	61	1	60	98.3	31	22	3	4	39	22	36

Sulandırmalara göre köpeklerde en yüksek seropozitiflik 10 erkek, 21 dişi olmak üzere toplam 31 köpekte 1/16 sulandırmada tespit edilmiştir. Bunu 5 erkek, 17 dişi toplam 22 pozitiflik ile 1/64 sulandırma takip etmiştir, 1/256 sulandırmada 1 erkek, 2 dişi toplam 3 köpekte, 1/1024 sulandırmada 4 dişi köpekte pozitiflik tespit edilmiştir. ELISA'da klinik belirti gösteren köpeklerin %36'sında (22/61) pozitiflik tespit edilmiştir. Seropozitiflik erkeklerde %41.1 (7/17), dişilerde %34 (15/44) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5'te Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve ELISA testi ile incelenen yeni ve eski girişli köpeklerdeki seropozitiflik durumları verilmiştir. Sabin-Feldman boya testinde barınağa yeni gelen köpeklerin %95.4'ü seropozitif bulunurken, eski girişli köpeklerin %99'u seropozitif bulunmuştur. Sulandırmalara göre toplam 44 yeni gelen hayvanın 27'sinde 1/16, 12'sinde 1/64, 3'ünde 1/256 sulandırmada pozitiflik tespit edilmiştir. Daha önceden barınağa gelmiş olan toplam 290 köpeğin 141'inde 1/16, 103'ünde 1/64, 32'sinde 1/256, 11'inde 1/1024 sulandırmada pozitiflik bulunmuştur.

**Çizelge 3.5.** Sabin-Feldman boya testi (SFDT) ve indirekt-ELISA sonuçlarının yeni ve eski girişli köpeklerde dağılımı.

Durum	Hayvan sayısı	Sabin-Feldman Dye test (SFDT)							ELISA		
		Negatif	Pozitif	%	1/16	1/64	1/256	1/1024	Negatif	Pozitif	%
Yeni girişler	44	2	42	95.4	27	12	3	0	30	14	31.8
Eski girişler	290	3	287	99	141	103	32	11	191	99	34.1
Toplam	334	5	329	98.5	168	115	35	11	221	113	33.8

ELISA testi ile barınağa yeni gelen 44 köpeğin 14'ünde (%31.8), eski girişli 290 köpeğin 99'unda (%34.1) seropozitiflik belirlenmiştir.

#### 4. TARTIŞMA

*Toxoplasma gondii*, dünya çapında yüksek bir dağılım gösteren insanlar ve köpekler dahil olmak üzere tüm sıcak kanlı memelilere bulaşabilen zorunlu hücre içi protozoon parazittir (Dubey 2010). İnsan ve hayvanlar canlı doku kistleri içeren az pişmiş ya da çiğ etlerden, iyi yıkanmamış yiyeceklerden veya kirli suyla beraber oositleri ağız yoluyla alarak *T. gondii* ile enfekte olmaktadır. Primer enfeksiyon genellikle asemptomatiktir, ancak bazı hastalarda lenfadenopati veya oküler toxoplasmosis görülebilmektedir (Tenter 2000). Yaşlı köpeklerde toxoplasmosisin klinik belirtileri neosporozun nörolojik bulguları ile benzerlik gösterir (Dubey 2005).

Köpeklerde toxoplasmosis, klinik belirtileri spesifik olmayan bir hastalıktır (Dubey ve Beattie 1988, Dubey 2005). Köpekler, enfekte kedi dışkısına temas eden kürkleri vasıtasıyla *T. gondii*'nin insanlara bulaşmasında mekanik rol oynamaktadırlar (Frenkel ve ark.2003, Yang ve ark 2013). *Toxoplasma gondii* ile enfekte olan köpekler bazı ülkelerde (Kore ve Çin gibi) tüketicilere potansiyel bir tehdit ve sağlık riski oluşturmaktadır. Bu nedenle, *T. gondii* enfeksiyonunun bulaşmasında köpeklerin rolünün değerlendirilmesi önemlidir (Zhuo ve ark 2017). Köpekler insanlar ve diğer ara konak hayvanlarla aynı enfeksiyon riskine maruz kaldıklarından dolayı, risk faktörlerinin bir göstergesi olarak çevre kontaminasyonunu değerlendirmek için kullanılabilirler (Ali ve ark 2003, Yan ve ark 2012, Jiang ve ark 2015, Jiang ve ark 2016).

Toxoplasmosis çoğu konakta genellikle spesifik olmayan klinik belirtiler göstermekte veya hiçbir belirti göstermemektedir. Teşhisi büyük ölçüde serolojik tekniklerle yapılmaktadır. Parazite spesifik antikorları veya antijenleri belirlemek amacıyla Sabin-Feldman boya testi (SFDT), ELISA ve diğer birçok serolojik test geliştirilmiştir (Liu ve ark 2015). Sabin-Feldman boya testi (SFDT) en eski teşhis metodu olup, halen toxoplasmosisin serolojik teşhisinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Boya testi son derece hassas ve spesifiktir. Oküler hastalıkların 1:2 gibi düşük titreleri bile teşhis için anlamlı sayılmaktadır (Sabin ve Feldman 1948, Reiter-Owona ve ark 1999, Udonsom ve ark 2008, Liu ve ark 2015).

Bu araştırma Konya Büyükşehir Belediyesi Veterinerlik Şube Müdürlüğüne bağlı Barınak merkezinde 334 köpek üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı,

Sabin-Feldman boya testi ve indirekt ELISA yöntemini kullanarak spesifik anti-*T.gondii* antikorlarının varlığını analiz etmek suretiyle köpeklerde toxoplasmosisin ne oranda görüldüğünü tespit etmektir. Enfeksiyonun dağılımı hayvanların cinsiyeti, yaşı, klinik bulguların varlığı, barınağa yeni gelmiş ve eskiden beri barınakta bulunuyor olmaları gibi durumlar kaydedilmiştir.

Toxoplasmosisin serolojik teşhisinde en yaygın kullanılan testlerden bir diğeri de ELISA olarak kabul edilmektedir (Robert-Gangneux ve Dardé 2012, Yan ve ark 2012). Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *T. gondii*'den elde edilen birçok rekombinant protein, ELISA'da duyarlılık ve özgüllük açısından test edilmiştir. ELISA testinde; çözümlü yapıdaki antijen solüsyonu mikrotiter plakaların plastik yüzeyine bağlanır, ardından serumla muamele edilerek antijen-antikor reaksiyonu gerçekleştirilir, daha sonra ikincil bir enzim işaretli antikor eklenerek, reaksiyonun varlığı substrat ilavesiyle renk değişimi olarak görünür getirilir. Antikorum titresi semptomların şiddeti ile korelasyon göstermemektedir. Dolaşımdaki *T. gondii* antijenlerinin saptanması da toxoplasmosisin teşhisinde kullanılmaktadır (Dubey ve Beattie 1988, Hill ve Dubey 2002). Serolojik teşhiste iki farklı test aynı laboratuarda gerçekleştirilse bile, tüm vakalarda aynı sonucu vermeyebilir. Mevcut serolojik metotlar arasında ELISA, *T. gondii* enfeksiyonunun teşhisinde yüksek duyarlılığı ve özgünlüğü, düşük maliyeti, basit ve hızlı oluşu nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Jiang ve ark 2015, Zhuo ve ark 2017).

Asai ve ark (1992) Japonya'da *T. gondii*'nin özgül bir antijeni olan nükleosid trifosfat hidrolazı (NTPaz) kullanarak ELISA testi geliştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar SFDT ile uyumlu bulunmuştur. Tayland'da yapılan bir çalışmada, 210 insan serum numunesi, canlı takizoitler kullanılarak boya testiyle incelenmiş; daha sonra bu sonuçlar IFA test sonuçlarıyla kıyaslandığında, SFDT ile daha yüksek oranda pozitiflik tespit edilmiştir (Udonsom ve ark 2010).

Toxoplasmosisin serodiagnozunda boya testinin rolü sekiz ülkede (Almanya, Danimarka, Avusturya, Fransa, İsrail, İtalya, İngiltere ve Norveç) on dokuz laboratuvarında değerlendirilmiştir. Boya testi ile elde edilen reaksiyonda antikor titresi seviyesinin ne oranda olacağı konusunda tam bir mutabakat yoktur. Ancak 4 IU değerinin veya 1:16'lık bir titrenin üzerinde bir reaksiyonun pozitiflik tanımına uyduğu belirtilmektedir. Yine de standardizasyon çalışmaları yapılarak ortak bir

protokolün kullanılması gereklidir (Reiter-Owona ve ark 1999). Ankara'da hastalarda toxoplasmosis tespitinde kullanılan ELISA IgM ve Sabin-Feldman testinin duyarlılığının karşılaştırılmasında, Sabin-Feldman testi ve ELISA'da IgM'nin seropozitifliği sırasıyla %16.9 ve %1.5 olarak bulunmuştur. Her iki ELISA IgM ve Sabin-Feldman testi, tekrarlayan düşüklere olan bir hastada pozitif sonuç vermiştir. ELISA yönteminin, Sabin-Feldman yöntemleri uygulanamayan laboratuvarlarda, spesifik antikörlerin saptanmasında ve konjenital toxoplasmosis olgularının klinik olarak izlenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Aslan ve Altıntaş 2000). İran'ın Shiraz kentinde Sabin-Feldman boya testi ile köpeklerde *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansı ölçülmüş ve incelenen 100 köpekten 31'i (%31) *T. gondii* enfeksiyonu yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. Sokak köpeklerinde oran %41.8 iken, evde beslenen köpeklerin %9.1'i pozitif olarak tespit edilmiştir. Üç yaşın üstündeki köpekler en yüksek (%57.14) enfeksiyon oranına sahipken köpeklerin cinsiyetlerinin enfeksiyon oranını etkilemediği bildirilmiştir. Sokak köpeklerindeki yüksek enfeksiyon oranının, ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturabileceği belirtilmiştir (Shad-Del ve ark 1993).

Türkiye'de pek çok ilde SFDT kullanılarak yapılan çalışmalarda sokak köpeklerinde *T.gondii* enfeksiyonu olduğu bildirilmiştir. Aktaş ve ark (1998)'nin sokak köpekleri üzerinde yaptığı bir çalışmada, 1/16 titrede enfeksiyon oranı %75.4 olarak ölçülmüştür. Sevinç ve ark (2000)'nin sokak köpekleri üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada, 1/16 titrede enfeksiyon oranı %64.02 olarak belirlenmiştir. Türkiye'nin farklı şehirlerinde köpeklerde toxoplasmosisin seroprevalansı %40 ile %97.5 oranları arasında değişmektedir (Aslantaş ve ark 2005, Şimşek ve ark 2006, Babür ve ark 2007a, Babür ve ark 2007b, Kılıç ve ark 2008, Şahal ve ark 2009, Yıldız ve ark 2009, Gıcık ve ark 2010, İçen ve ark 2010, Balkaya ve ark 2010, Altay ve ark 2013, Doğan ve ark 2014).

Bu çalışmada Sabin-Feldman boya testi ile elde edilen %98.5'lik pozitif sonuç, diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Babür ve ark 2007a, Kılıç ve ark 2008, Gıcık ve ark 2010, İçen ve ark 2010, Altay ve ark 2013). Seropozitif örnekler çoğunlukla 1/16 titrede ölçülmüştür ve diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Yüksek seropozitiflik, çevredeki yüksek kontaminasyona işaret etmektedir.



Cinsiyet bakımından enfeksiyon oranı erkeklerde %99.2, dişilerde %98.1 olarak tespit edilmiştir. Erkekler ve dişilerin enfeksiyon oranları arasında bir fark olmaması da diğer sonuçlarla uyumlu bulunmuştur (Shad-Del ve ark1993, Aktaş ve ark 1998, Babür ve ark 2007a, Babür ve ark 2007b, Kiliç ve ark 2008, Yıldız ve ark 2009, Balkaya ve ark 2010, , Gıcık ve ark 2010, İçen ve ark 2010, Altay ve ark 2013, Doğan ve ark 2014). Yaş itibariyle 0-1 yaş grubundaki köpeklerde enfeksiyon oranı %100, 1-3 yaş grubundakilerde ise %98.4 olarak tespit edilmiştir. Yaş grupları arasında enfeksiyon oranı yönüyle fark olmaması, yine diğer araştırmaların sonuçları ile uyumludur (Aktaş ve ark 1998, Şimşek ve ark 2006, Babür ve ark 2007a, Kılıç ve ark 2008, Yıldız ve ark 2009, İçen ve ark 2010, Altay ve ark 2013, Doğan ve ark 2014).

Parmley ve ark (1992), insan serumlarında *T. gondii*'ye spesifik antikorların tespiti için rekombinant *T. gondii* yüzey antijeni P22'yi değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirmede P22 geni ekspresyon vektörü pGEX-2T'ye eklenmiş ve *E. coli*'de GST füzyon proteini olarak eksprese edilmiştir. Füzyon proteini, hastalardan alınan serumlarda ELISA ile antikorları tespit etmek için saflaştırılmıştır. Akut olarak enfekte olmuş hasta serumlarında İmmünglobulin G antikorları genel olarak füzyon proteinine kronik enfeksiyonlu hastaların serumlarından daha fazla tepki vermiştir.

Béla ve ark (2008) Brezilya'da rekombinant antijen SAG2A antijenini kullanarak toxoplasmosisin akut ve kronik fazlarındaki IgG ve IgGI antikorlarını reaktivitesini ELISA ile analiz etmişlerdir. Bu antijen ELISA testinde yüksek duyarlılık (%95) ve özgüllük (%100) göstermiştir. ELISA testinin duyarlılığı akut ve kronik faz için ayrı ayrı ölçüldüğünde; akut faz (%90) kronik (%67) faza göre anlamlı olarak daha yüksek oranda bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda SAG2A'nın, toxoplasmosisin akut fazının karakterize edilmesinde, teşhis aracı olarak kullanılabilir bir antijen olduğu belirtilmiştir.

*Toxoplasma gondii*'nin yüzey antijeni-2 (SAG2) proteinini kodlayan gen, ekspresyon vektörü plazmid pGEX-4T-1 içine klonlandı ve *E. coli*'de GST füzyon proteini olarak eksprese edildi. Saflaştırılmış GST etiketli SAG2 proteininin performansı, ticari ELISA ile kıyaslandı. Yapılan çalışmada gebe kadınlardan alınan toplam 1096 serum ve tükürük numunesi GST-SAG2 ile test edildi. Örneklerin 20'si *T. gondii* IgM yönünden pozitif (%1.82), 81'i IgG yönünden pozitif (%7.4) ve 23

(%2.1) tükürük numunesi de IgA yönünden pozitif bulundu (Yan ve ark 2012). Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise, *T. gondii*'ye spesifik antikorlar evcil köpeklerde rekombinant TgSAG2 antijeni kullanılarak indirekt ELISA test edilmiş ve % 19.8’lik seropozitivite elde edilmiştir (Zhou ve ark 2016).

Bu çalışmada kullanılan GST etiketli rekombinant TgSAG2 proteini daha önceden tanımlanan metoda göre oluşturulmuştur (Zhou ve ark 2016).

İndirekt ELISA testinde TgSAG2-GST ve GST proteinleri kaplama tamponu (0.05 M karbonat-bikarbonat tamponu, pH 9.6) içinde 2-4 µg/ml konsantrasyonda seyreltilmiştir. ELISA pleytinin kuyucukları 100 µl antijen ile kaplanmış ve bir gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. Kaplama çözeltisi döküldükten sonra, pleytler %3 yağsız süt tozu içeren PBS ile 37°C’de 1 saat boyunca bloklanmıştır. Pleytler tween 20 içeren fosfat tampon (PBST) ile yıkandıktan sonra, 1:100 oranda seyreltilmiş serum numuneleri eklenerek tekrar 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Bağlanan antikorlar horseradish peroksidaz (HRP) ile bağlı (Bethyl, Montgomery, AL, U.S.A) anti-dog IgG sekonder antikor (1:4.000 oranda sulandırılmış) ile inkübe edilmiştir. Yıkamadan sonra ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenziazolinsülfonik asit)] (Sigma, ABD, Louis, MO, ABD) ile reaksiyon görünür hale getirilmiştir. Oda sıcaklığında renk oluşumu izlenmiş ve horseradish peroksidaz enziminin aktivasyonunu durdurmak için 50 µl durdurma solüsyonu ilave edilmiştir (2 M Sülfürik asit). Optik dansite (OD) 415 nm dalga boyunda mikropleyt okuyucu (ELISA reader/Rayto Microplate Reader, Model: RT-2100C) ile ölçülmüştür. ELISA sonuçları her bir numune için GST proteininin 415 nanometredeki optik dansitesi (OD<sub>415</sub>) değerinin rekombinant TgSAG2'nin OD<sub>415</sub> değerinden çıkarılarak değerlendirilmiştir. Cutt-off değerleri negatif köpek serumu örnekleri kullanılarak belirlenmiş ve negatif serumların OD<sub>415</sub>'de ölçülen ortalama değerine standart sapmanın 3 katı eklenerek hesaplanmıştır. Test edilen örneğin değeri cut-off değerinden yüksek olduğunda örnek pozitif olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada, rekombinant TgSAG2 proteini kullanılarak yapılan ELISA testinde, sokak köpeklerinin % 33.8'i seropozitif bulunmuştur. Bu sonuç, diğer araştırmacılar ile uyumlu olarak belirlenmiştir (Yan ve ark 2012, Liu ve ark 2014, Zarra-Nezhad ve ark 2017). ELISA sonuçları, uygulanan ELISA tipine (doğrudan,

dolaylı, ticari ve indirekt-ELISA) ve kullanılan substrata bağı olarak laboratuvarlarda farklı sonuçlar verebilir.

Dubey ve Beattie (1988), köpeklerde toxoplasmosisin neden olduğu klinik bulguları, nöromusküler, solunum ve gastrointestinal bulgular olarak sınıflandırmışlardır. Genel bulgular aralıklı ateş, bademcik iltihabı, dispne, diyare ve kusma ile karakterizedir. Merkezi sinir sistemi formunda, ilerleyici parezi, her iki kolda da paraliz ve atrofi gözlenmektedir. Bazı durumlarda enfekte köpekler arka bacaklarını hareket ettiremezler. Morales ve ark (1995), Kosta Rika'da iki yetişkin köpekte klinik toxoplasmosis olduğunu bildirmişler, klinik bulgular olarak da arka bacak zayıflığı, koordinasyon bozukluğu ve lumber bölgede ağrı olduğunu kaydetmişlerdir.

Amerika Birleşik Devletlerinde, deri altında nodül ile vücudunda kaşıntılı ve irinli deri kabarcıkları bulunan iki köpeğin deri biyopsilerinde, tek veya gruplar halinde takizoitler gözlenmiştir. Her iki olguda da immünohistokimya ve PZR ile toxoplasmosisin varlığı doğrulanmıştır. Köpeklerin biri pulmoner ve nörolojik bulguları ilerlediği için ötenazi yapılmıştır (Hoffmann ve ark 2012). Brezilya'da yedi yaşında bir dişi köpekte kutanöz ülserli nodüler lezyonlar gözlenmiştir. Biyopsi yapıldığında nötrofilik, histiyositik dermatit ve çok sayıda bradizoit kisti ile takizoitli pannikülit tespit edilmiştir. PZR analizi *T. gondii* için pozitif, *Neospora caninum* için negatif sonuç vermiştir (Oliveira ve ark 2014).

Langoni ve ark (2012), Brezilya'da nörolojik bulguları olan 50 köpekte *T. gondii* enfeksiyonlarının görülme sıklığını IFAT ile araştırmışlardır. Pozitif olan hayvanların dokuları *T. gondii* yönünden farelerde biyoanaliz ve PZR yöntemleri ile incelenmiştir. IFAT ile köpeklerin %22'sinde spesifik antikorlar tespit edilmiş, farelerdeki biyoanalizlerde ve PZR'de %63.6 pozitiflik bulunmuştur.

Brezilya'da sinir sistemi bozukluğu belirtileri gösteren seksen köpekten alınan serumlar IFAT kullanılarak anti-*T. gondii* IgG antikorlarının varlığı yönünden incelenmiştir. Seropozitiflik oranları 1/16 titrede %13.7, 1/64 titrede %13.7 ve 1/256 titrede %5 olarak bildirilmiştir. Yaşlı hayvanlarda, erkeklerde, kırsal çevrede yaşayanlarda, küçük hayvanlarla özellikle kuşlar ve kemiricilerle sürekli temasta olanlarda pozitif reaksiyonlar daha sık gözlenmiştir. Mutfak gıdalarıyla beslenen

köpeklerde, özellikle ham içerikli beslenenlerde, daha yüksek bir pozitif reaksiyon sıklığı bildirilmiştir (De Brito ve ark 2002).

Trinidad ve Tobago'daki köpeklerde toxoplasmosisin yaygınlığı ve toxoplasmosisin ortaya çıkışında rol oynayan risk faktörlerini belirlenmeye yönelik olarak yapılan araştırmada; ev köpekleri, avcı ve sokak köpeklerini içeren toplam 250 köpeğin 80'i (%32), lateks aglutinasyon testi ile  $\geq 1: 32$  titrede *T. gondii* enfeksiyonu yönünden pozitif bulunmuştur. Enfeksiyon oranları sokak köpeklerinde %60.5, avcı köpeklerde %30.5 ve ev köpeklerinde %25.5 olarak tespit edilmiştir. Yaş gruplarına göre en yüksek seropozitiflik >2-3 yaş grubundaki köpeklerde gözlenmiştir. Evde pişirilen gıdaları tüketen köpeklerde %32,9, ticari köpek gıdalarıyla beslenenlerde %17,2, evde pişmiş ve ticari gıdalarla beslenen köpeklerde %21 seroprevalans tespit edildiği bildirilmiştir (Ali ve ark 2003).

Bu çalışmada muayene edilen köpeklerde klinik olarak tespit edilen bulgular; arka bacaklarda felç ve atrofi, deride lezyonlar, kene enfestasyonu, burun akıntısı, kusma, diyare, sinir sistemi bozuklukları ve zayıflama olarak kaydedilmiştir. Sabin-Feldman Boya testinde, çeşitli klinik bulguları olan toplam 61 köpeğin 60'ı (%98,3) *T. gondii* enfeksiyonu yönünden seropozitif bulunmuştur. Seropozitiflik oranı arka ekstremitelerde felç ve atrofi görülen, deri lezyonları olan ve kene enfestasyonu (*Rh. sanguineus*, *Rh. turanicus*) tespit edilen köpeklerin %100'ü, burun akıntısı olan köpeklerin %96,8'i pozitif olarak tespit edilmiştir. ELISA testinde ise klinik bulgular gösteren köpeklerin %36'sı seropozitif bulunmuştur. Arka bacaklarda felç ve atrofi görülen iki hayvanın ikisi de toksoplazma yönünden pozitif bulundu. Deri lezyonları görülen hayvanların %38,8'i, kene enfestasyonu olan hayvanların %33,3'ü, burun akıntısı olan hayvanların % 31,2'si pozitif bulunmuştur. Pozitivite oranının oldukça yüksek olduğu ve sonuçların diğer araştırmalarda kaydedilen sonuçlar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Dubey ve Beattie 1988, Morales ve ark 1995, De Brito 2002, Ali ve ark 2003, Dantas-Torres 2010, Hoffmann ve ark 2012, Langoni ve ark 2012, Oliveira ve ark 2014). Bu çalışmada, su kaynağının tüm hayvanlar için aynı olması, sokak köpeklerinin yakınında sokak kedilerinin, kuşların ve kemirgenlerin (sıçanlar) bulunması enfeksiyon olasılığını artıran ana faktörler olarak düşünülmüştür.

Raimundo ve ark (2015), Brezilya'da köpeklerde toxoplasmosis ile yaş ve cinsiyet arasındaki ilişkiyi ELISA ile araştırmışlardır. Kentsel ve kırsal bölgelerden

gelen 204 köpek anti-*T. gondii* IgG antikorları açısından ELISA ile değerlendirilmiş ve 130 örnek (%63.7) pozitif olarak bildirilmiştir. Kentsel alandan gelen köpeklerin % 57.1'i ve kırsal alandan gelen köpeklerin %70.7'si pozitif bulunmuştur.

Yan ve ark (2012), Çin'de kentsel alanlarda ve kırsalda serbest yaşayan köpekleri *T. gondii* yönünden serolojik olarak incelemişlerdir. ELISA ile 231 sokak köpeğinin %40,3'ü pozitif bulunmuştur. Enfeksiyon oranı kent köpeklerinde %38,7, kırsal köpeklerde %41 olarak bulunmuş, enfeksiyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Çin'de yapılan bir çalışmada, sağlıklı ev köpeklerinden 408 serum toplanmış ve ticari ELISA kitleri kullanılarak *T.gondii* enfeksiyonu açısından test edilmiştir. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun seropozitifliği %9.1 olarak belirlenmiştir. Seropozitiflik, bir yaşında ve daha küçük köpeklerde %1.3, 6 yaş üzeri köpeklerde %18.7 olarak bulunmuştur. *Toxoplasma gondii*'ye maruz kalma oranlarının erkeklerde dişilere göre daha yüksek olduğu, ancak enfeksiyon için cinsiyet ve ırkın muhtemelen belirleyici bir faktör olmadığı kaydedilmiştir (Jiang ve ark 2016).

Liu ve ark (2014), Çin'de köpeklerde *T. gondii* enfeksiyonuna ilişkin risk faktörlerini belirlemek için 160 köpekten serum örneği toplayarak ELISA testi ile kullanarak anti-*T. gondii* antikorları yönünden incelemişlerdir. Alan aktivasyonu, cinsiyet ve yaşlara göre seropozitiflik analiz edilmiştir. Genel olarak, 21 köpek (%13,1) seropozitif bulunmuştur. Enfeksiyon oranı sokak köpeklerinde %38,7, ev köpeklerinde %6,9, erkeklerde %14,8 ve dişilerde %11,4 olarak tespit edilmiştir. 3-6 yaş grubunda (% 20) diğer yaş gruplarına göre (0-1 yaş arası %11,1 ve 1-3 yaş arası %11,4) daha yüksek seropozitiflik belirlenmiştir.

İran'ın Ahvaz kentinde ev köpeklerine ait 180 serum örneğinde *T. gondii* enfeksiyonunun seroprevalansı ve olası risk faktörleri araştırılmıştır. Indirekt ELISA ile incelenen örneklerin %46,67'si pozitif bulunmuştur. Dişilerin %56'sı ve erkeklerin %39'u pozitif olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyonun yaşa göre dağılımına bakıldığında, 2 yaş altındaki grupta %18, 4 yaş üzerindeki grupta %96 pozitiflik tespit edilmiştir. Dışarıda yaşayan köpeklerin %47'si, ev köpeklerinin %38'i enfekte bulunmuştur. Köpeklerin ırkı, beslenmesi veya kedilerle temas yönüyle ele

alındığında enfeksiyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Zarra-Nezhad ve ark 2017).

Bu araştırmada ELISA testi ile köpeklerde *T. gondii*'nin genel seroprevalansı %33,8 olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyon oranı erkeklerde %40,3, dişilerde %30 olarak tespit edilmiştir. Yaş durumuna göre, 0-1 yaş grubunda %21,4, 1-3 yaş grubunda %34,3 pozitiflik bulunmuştur.

Klinik belirti gözlenen 61 köpeğin (17 erkek, 44 dişi) 60'ında (%98,3) Sabin-Feldman Boya testi ile pozitiflik belirlenmiş, dişilerin %100'ü ve erkeklerin %94,1 pozitif bulunmuştur. ELISA testiyle klinik belirti gösteren köpeklerin %36'sında pozitiflik tespit edilmiştir. Seropozitiflik erkeklerde %41,1, dişilerde %34 olarak tespit edilmiştir.

Sabin-Feldman Boya testinde barınağa yeni gelen köpeklerin %95,4'ü seropozitif bulunurken, eski girişli köpeklerin % 99'u seropozitif bulunmuştur. ELISA testi ile barınağa yeni gelen 44 köpeğin 14'ünde (%31,8), eski girişli 290 köpeğin 99'unda (%34,1) seropozitiflik belirlenmiştir. Bu sonuç diğer araştırmalardan elde edilen sonuçlar ile uyumaktadır (Francis ve ark 1988, Asai ve ark 1992, Shad-Del ve ark 1993, Aslan ve Altıntaş 2000, Béla ve ark 2008, Yan ve ark 2012, Liu ve ark 2014, Jiang ve ark 2016, Zhou ve ark 2016, Zarra-Nezhad ve ark 2017). Önceki çalışmalarında elde edilen sonuçlar *T.gondii* enfeksiyonunun %1,5'den %100'e kadar değişen oranlarda görüldüğünü ortaya koymaktadır. Enfeksiyon oranları arasındaki farklılıklar; köpeklerin farklı yaşam alanlarında olmaları, yaş ırk ve beslenme biçimlerinde görülen farklılıklar, enfeksiyonun naklinde rol oynayan son konak veya rezervuar konaklarla yakın ilişkinin olup olmaması, inceleme sırasında diğer enfeksiyonların varlığı, hayvanların immün sistemlerindeki olası bozukluklar, tanı için kullanılan testlerdeki farklılıklar gibi birçok faktörden kaynaklanmaktadır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Topluca ele alındığında, toxoplasmosisin klinik semptomları nonspesifiktir ve kesin teşhis için yeterli değildir. Antemortem teşhis çeşitli serolojik metotlarla (SFDT, IHA, IFAT, LA, ELISA gibi) yapılabilir. IgM antikorları IgG antikorlarına göre enfeksiyondan sonra daha erken ortaya çıkar ve enfeksiyonun 3. ayından sonra da kaybolur. Yüksek IgM titresi yeni enfeksiyonun işaretidir. IgG antikorları ise enfeksiyonun 4. haftasında ortaya çıkıp subklinik enfeksiyon boyunca yıllarca varlığını devam ettirir. IgG ölçümünün faydalı olması için, akut dönem ve iyileşme dönemlerinde (3-4 hafta arayla) alınan serumlarda IgG titreleri ölçülmelidir ve titrede en az 4 kat artış olmalıdır. Ayrıca serebrospinal sıvı ve gözde kornea ve iris arasında bulunan "aqueous humor" sıvıda takizoitlerin veya anti-*T. gondii* antikorlarının varlığı için analiz edilebilir. Post mortem olarak dokulardan hazırlanan smearlarda takizoitler görülebilir. Ayrıca doku kesitlerinin mikroskopik muayenesi ile takizoit veya bradizoitler tespit edilebilir. *T. gondii* diğer bazı protozoonlarla morfolojik olarak benzerdir ve sığırlarda *Sarcocystis* türlerinden, atlarda *S. neurona*'dan ve köpeklerde *Neospora caninum*'dan ayırt edilmelidir.

Toxoplasmosisin teşhisinde altın standart yöntem olarak bilinen SFDT metodunda, daima SPF (spesifik patojenlerden arı) farelerin gerekliliği ve canlı takizoit elde etmek için gün aşırı intraperitoneal takizoit pasajlarının yapılması zorunluluğu nedeniyle, bu metodu kullanan laboratuvar sayısı dünyada çok sınırlı sayıdadır. Bu nedenle SFDT metoduna alternatif olarak kullanılacak metotların geliştirilmesi gereklidir. Günümüzde ELISA testi toxoplasmosis tanısında birçok araştırmacı tarafından sonuçlarına güvenilir, duyarlı bir tanı metodu olarak önerilmektedir. ELISA ile elde edilen sonuçların IFA veya SFDT sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu testin daha duyarlı olduğu ve yüksek serum dilüsyonlarında dahi pozitif sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Bir defada birçok örneğin birlikte işlenebilmesi, antijen solüsyonu, şüpheli serum, pozitif serum, negatif serum ve enzim işaretli sekonder antikorların çok az miktarda kullanılması dolayısıyla oldukça ekonomik bir test olması, ELISA testini diğer serolojik testlere kıyasla daha avantajlı kılan özelliklerdir. Yine de, enfeksiyonun teşhisinde güvenilir sonuçlar elde etmek için birden fazla serolojik metodun birlikte kullanılması uygun olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

Abdelbaset AE, Alhasan H, Salman D, Karram MH, Rushdi MA, Xuenan X, Igarashi M, 2017. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. *Exp Parasitol*, 172, 1-4.

Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert reviews in molecular medicine*, 3(1):1-9.

Ajioka JW, Sibley LD. 2007. Development and application of classical genetics in *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii: the model a picomplexan-perspectives and methods*. Eds: Weiss LM, Kim K, 2 ed. United Kingdom: Academic Press, (pp. 551-576).

Akca A, Babur C, Arslan MO, Gicik Y, Kara M, Kilic S, 2004. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. *Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic)*, 49(1), 9-13.

Akçay S, Pamukçu M, Baran S, 1950. Bir köpekte ilk toxoplasmose observasyonu. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 20 (47-48), 245-54.

Aktaş M, Babur C, Karaer Z, Dumanlı N, Köroğlu E, 1998. Seroprevalance of toxoplasmosis on Stray dogs in Elazığ. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 14(1), 47-50.

Ali CN, Harris JA, Watkins JD, Adesiyun AA, 2003. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Vet Parasitol*, 113(3-4), 179-87.

Altay K, Babur C, Atas AD, Beyhan YE, Ozkan E, 2013. Investigation of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in the province of Sivas. *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 24, 13-16.

Altinöz F, Babür C, Kiliç S, 2007. Investigation of the seropositivity of *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) in layer hens by the Sabin-Feldman Dye test in the region of Konya. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(1), 4-6.

Alvarado-Esquivel C, Romero-Salas D, Cruz-Romero A, García-Vázquez Z, Peniche-Cardena Á, Ibarra-Priego N, Ahuja-Aguirre C, Pérez-de-León AA, Dubey



JP, 2014. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in Veracruz, Mexico. Biomedcentral Vet Res, 10(1), 191.

Araujo FG, 1994. Immunization against *Toxoplasma gondii*. Parasitology Today, 10(9), 358-60.

Asai T, Mizuno F, Kojima S, Takeuchi T, Kobayashi A, Suzuki Y, 1992. High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol, 30(5), 1291- 93.

Aslan G, Altıntaş K, 2000. Toksoplazmosis teşhisinde Sabin-Feldman testi ve ELISA IgM antikorlarının karşılaştırılması. Genel Tıp Dergisi, 10(4), 161-64.

Aslantaş O, Ozdemir V, Kilic S, Babür C, 2005. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Vet Parasitol, 129, 187-91.

Babur C, Erdal N, Biyikoglu G, Piskin FC, 1997. Seroprevalence of toxoplasmosis on stray dogs in İstanbul. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 21, 413-16.

Babür C, Altas MG, Celebi B, Sevgili M, Ozkan AT, Gokcen A, 2007a. Seroprevalance of toxoplasmosis, leishmaniosis and listeriosis in stray dogs in the province of Sanliurfa, Turkey. Türk Hijiyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 64(3), 11-16.

Babür C, Goz Y, Altug N, Ozkan AT, Kilic S, 2007b. Seroprevalance of *Toxoplasma gondii* in dogs in Van Province by Sabin- Feldman Dye test. Yüzüncü Yil Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18(2), 1-4.

Balkaya I, Aktas MS, Ozkanlar Y, Babur C, Celebi B, 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in Eastern Turkey. Israel Journal of Veterinary Medicine, 65(2), 58-61.

Beghetto E, Nielsen HV, Porto PD, Buffolano W, Guglietta S, Felici F, Petersen E, Gargano N, 2005. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma*

*gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. J Infect Dis, 191, 637-45.

Béla SR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Pirovani CP, Chaves-Borges FA, de Carvalho FR, de Oliveira TC, Mineo JR, 2008. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. Diagn Microbiol Infect Dis, 62(3), 245-54.

Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, Frey CF, 2011. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. Vet Parasitol.177 (3-4), 290-97.

Beyhan YE, Babür C, Yilmaz O, 2014. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Samsun and Afyon provinces. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 38 (4), 220-22.

Black MW, Boothroyd JC, 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev, 64(3), 607-23.

Blackman MJ, Bannister LH, 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol Biochem Parasitol, 117(1), 11-25.

Bougdour A, Tardieux I, Hakimi MA, 2014. *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. Cellular Microbiology, 16(3), 334-43.

Bresciani KD, Costa AJ, Toniollo GH, Sabatini GA, Moraes FR, Paulillo AC, Ferraudo AS, 1999. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. Vet Parasitol, 86(2), 143-45.

Bresciani KD, Gennari SM, Serrano AC, Rodrigues AA, Ueno T, Franco LG, Perri SH, Amarante AF, 2007. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. Parasitol Res, 100(2), 281-5.

Bruna-Romero O, De Oliveira DM, De Andrade-Neto VF, 2012. Toxoplasmosis: advances and vaccine perspectives. In: Current Topics in Tropical Medicine. Ed: Rodriguez-Morales A, 3rd ed. Croatia: In Tech, p.169-84.

Buxton D, 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. Parasitology Today, 9(9), 335-7.

Camejo A, Gold DA, L D, Mcfetridge K, Julien L, Yang N, Jensen KDC, Saeij JPJ, 2014. Identification of three novel *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins. Int J Parasitol, 44, 147-60.

Can H, Döşkaya M, Ajzenberg D, Özdemir HG, Caner A, İz SG, Döşkaya AD, Atalay E, Çetinkaya Ç, Ürgen S, Karaçalı S, 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of Izmir, Turkey. PloS One, 9(8), e104930.

Caner A, Gürüz AY, 2011. Toxoplasmosis. In: Parazitolojide laboratuvar. Eds: Korkmaz M, Ok ÜZ, 23 ed. Turkey: META Basım, p. 261-5.

Cano-Terriza D, Puig-Ribas M, Jiménez-Ruiz S, Cabezón Ó, Almería S, Galán-Relaño Á, Dubey JP, García-Bocanegra I, 2016. Risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in hunting, pet and watchdogs from southern Spain and northern Africa. Parasitology International, 65(5), 363-6.

Carruthers V, Boothroyd JC, 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Current Opinion in Microbiology, 10, 83-9.

Chai JY, Lin A, Shin EH, Oh MD, Han ET, Nam HW, Lee SH, 2003. Laboratory passage and characterization of an isolate of *Toxoplasma gondii* from an ocular patient in Korea. Korean J Parasitol, 41(3), 147.

Chuang SC, Chung YC, Yang CD, 2017. Protective immunity against toxoplasmosis in mice induced by single-dose immunization with rSAG1/2 protein released from poly (lactide-co-glycolide) microparticles. Parasite, 24(5).

Cong H, Zhang M, Zhang Q, Gong J, Cong H, Xin Q, He S, 2013. Analysis of structures and epitopes of surface antigen glycoproteins expressed in bradizoites of *Toxoplasma gondii*. *BioMed Research International*, 2013.

Cong H, Zhang M, Xin Q, Wang Z, Li Y, Zhao Q, Zhou H, He S, 2013. Compound DNA vaccine encoding SAG1/SAG3 with A 2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasites and Vectors*, 6(1), 63.

Dantas-Torres F, 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites and Vectors*, 3(1), 26.

De Brito AF, Souza LC, Silva AV, Langoni H, 2002. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(1), 31-5.

De Craeye S, Francart A, Chabauty J, De Vriendt V, Van Gucht S, Leroux I, Jongert E, 2008. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Belgian house cats. *Vet Parasitol*, 157 (1-2), 128-32.

Dlugonska H, 2008. *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. *BioMed Research International*, 2008, 1-7.

Doğan N, Özkan AT, Babür C, Köse C, 2014. Seroprevalance of leishmaniosis and toxoplasmosis in healthy appearanced street dogs in Eskisehir. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 71(1), 27-34.

Drapała D, Holec-Gąsior L, Kur J, Ferra B, Hiszczyńska-Sawicka E, Lautenbach D, 2014. A new human IgG avidity test, using mixtures of recombinant antigens (rROP1, rSAG2, rGRA6), for the diagnosis of difficult-to-identify phases of toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79(3), 342-6.

Dubey JP, Beatttie CP, 1988: *Toxoplasmosis of animals and man*. United states. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc.1-220.

Dubey JP, 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 28(7), 1019-24.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradizoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev, 11(2), 267-99.

Dubey JP, 2004. Toxoplasmosis—a water borne zoonosis. Vet Parasitol, 126(1-2), 57-72.

Dubey JP, 2005. Toxoplasmosis in cats and dogs. Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Mexico City, Mexico.

Dubey JP, Huong LT, Sundar N, Su C, 2007. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. Vet Parasitol, 146(3-4), 347-51.

Dubey JP, 2008. The history of *Toxoplasma gondii* the first 100 years. J Eukaryot Microbiol, 55(6), 467-75.

Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, Majumdar D, Su C, 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. Int J Parasitol, 38(8-9), 999-1006.

Dubey JP, Lindsay DS, Lappin MR, 2009. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 39(6), 1009-34.

Dubey JP, 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. Zoonoses and Public Health. 57(1), 60-73.

Dubey JP, Velmurugan GV, Rajendran C, Yabsley MJ, Thomas NJ, Beckmen KB, Sinnott D, Ruid D, Hart J, Fair PA, McFee WE, 2011. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. Int J Parasitol, 41(11):1139-47.

Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Hill DE, Villena I, Zhou H, Su C, Jones JL, 2011. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol*, 41(8), 827-33.

Dubey JP, Choudhary S, Tilahun G, Tiao N, Gebreyes WA, Zou X, Su C, 2013. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. *Vet Parasitol*, 196 (1-2), 206-8.

Dubey JP, Ness SL, Kwok OC, Choudhary S, Mittel LD, Divers TJ, 2014. Seropositivity of *Toxoplasma gondii* in domestic donkeys (*Equus asinus*) and isolation of *T. gondii* from farm cats. *Vet Parasitol*, 199(1-2), 18-23.

Dunn JD, Ravindran S, Kim SK, Boothroyd JC, 2008. The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhoptry proteins ROP2 and ROP4. *Infect Immun*, 76 (12), 5853-61.

El Hajj H, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galéotti N, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF, 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics*, 6(21), 5773-84.

English ED, Adomako-Ankomah Y, Boyle JP, 2015. Secreted effectors in *Toxoplasma gondii* and related species: determinants of host range and pathogenesis. *Parasite Immunol*, 37, 127-40.

Etheredge GD, Michael G, Muehlenbein MP, Frenkel JK, 2004. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. *Rev Panam Salud Publica*, 16(3), 176-86.

Fayer R, 1981. Toxoplasmosis update and public health implications. *Can Vet J*, 22 (11), 344-52.

Francis JM, Payne RA, Joynson DH, 1988. Rapid indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antitoxoplasma IgG: comparison with dye test. *J Clin Pathol*, 41(7), 802-5.

Ferguson DJ, Brecht S, Soldati D, 2000. The microneme protein MIC4, or an MIC4-like protein, is expressed within the macrogamete and associated with oocyst wall formation in *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 30(11), 1203-9.

Ferra B, Holec-Gaşior L, Kur J, 2015. A new *Toxoplasma gondii* chimeric antigen containing fragments of SAG2, GRA1, and ROP1 proteins impact of immunodominant sequences size on its diagnostic usefulness. Parasitol Res, 114, 3291-99.

Frenkel JK, Lindsay DS, Parker BB, Dobesh M, 2003. Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection of young children. International Journal of Infectious Diseases, 7(4), 292-3.

Gebremedhin EZ, Agonafir A, Tessema TS, Tilahun G, Medhin G, Vitale M, Di Marco V, Cox E, Verduyck J, Dorny P, 2013. Seroepidemiological study of ovine toxoplasmosis in East and West Shewa Zones of Oromia regional state, Central Ethiopia. Biomedcentral Veterinary Research, 9(1), 117.

Gebremedhin EZ, Yunus HA, Tesfamaryam G, Tessema TS, Dawo F, Terefe G, Di Marco V, Vitale M, 2014. First report of *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedarius*) in Ethiopia: bioassay and seroepidemiological investigation. Biomedcentral Veterinary Research, 10(1), 222.

Gıcık Y, Sari B, Babur C, Celebi B, 2010. The Seropositivity of *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in the dogs of Kars and Vicinity. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 34 (2), 86-90.

Güçlü Z, Karaer Z, Babür C, Kiliç S, 2007. Investigation of *Toxoplasma gondii* antibodies in sport horses bred in Ankara province. Positivity, 31(4):264-67.

Györke A, Opsteegh M, Mircean V, Iovu A, Cozma V, 2011. *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors. Prev Vet Med, 102(4), 321-28.

Halonen SK, Weiss LM. 2013. Toxoplasmosis. Handb Clin Neurol.114, 125–45.

Hamilton CM, Kelly PJ, Bartley PM, Burrells A, Porco A, Metzler D, Crouch K, Ketzis JK, Innes EA, Katzer F, 2015. *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites and Vectors*, 8(1), 166.

Hill D, Dubey JP, 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 634-40.

Hiszczynska-Sawicka E, Gatkowska JM, Grzybowski MM, Dlugonska H, 2014. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. *Parasitology*, 141, 1365-78.

Hoffmann AR, Cadieu J, Kiupel M, Lim A, Bolin SR, Mansell J, 2012. Cutaneous toxoplasmosis in two dogs. *J Vet Diagn Invest*, 24(3), 636-40.

Holec-Gąsior L, 2013. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(9), 1343-51.

Hosseininejad M, Azizi HR, Hosseini F, Schares G, 2009. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for serodiagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Vet Parasitol*, 164(2-4), 315-19.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 35(6), 1411-4.

Huang X, Xuan X, Kimbita EN, Battur B, Miyazawa T, Fukumoto S, Mishima M, Makala LH, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T, Igarashi I, 2002. Development and evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with recombinant SAG2 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *J Parasitol*, 88(4), 804-7.

Huang X, Xuan X, Hirata H, Yokoyama N, Xu L, Suzuki N, Igarashi I, 2004. Rapid immunochromatographic test using recombinant SAG2 for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats. *J Clin Microbiol*, 42(1), 351-3.



Içen H, Babur C, Bademkiran S, Celebi B, Simsek A, Ozyurtlu N, Ozkan AT, 2010. Seroprevalance of toxoplasmosis, leishmaiosis and listeriosis in Shelter Dogs of Diyarbakir, Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34 (1), 6-10.

Innes EA, Bartley PM, Maley S, Katzer F, Buxton D, 2009. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(2), 246-51.

Institute For International Cooperation In Animal Biologics, 2005. Toxoplasmosis. Erişim tarihi 04 Mart 2018. Erişim adresi, [www.cfsph.iastate.edu/ILCAB/](http://www.cfsph.iastate.edu/ILCAB/).

Ismael AB, Sekkai D, Collin C, Bout D, Mevelec MN, 2003. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect Immun*, 71(11), 6222-28.

Jiang HH, Li MW, Xu MJ, Cong W, Zhu XQ, 2015. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in Zhanjiang, Southern China. *Korean J Parasitol*, 53(4), 493-96.

Jiang W, Wang Y, Liu Y, Li T, Chen Y, Wang S, Han X, Wang Q, 2016. Seroepidemiological study of canine *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* infections in Shanghai, China, and analysis of risk factors. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(3), 420-24.

Jittapalapong S, Nimsupan B, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kabeya H, Maruyama S, 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. *Vet Parasitol*, 145(1-2), 138-41.

Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Waldl E, Petersen E, 2009. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(2), 252-66.

Junior AGM, Junior JPC, Cardoso THS, Silva MV, Santiago FM, Silva JS, Pirovani CP, Silva DAO, Mineo JR, Mineo TWP, 2013. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. *Parasites and Vectors*, 6(163), 1-12.

Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Kiliç S, DüNDAR B, 2008. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and intestinal parasites in stray cats from Nigde, Turkey. Italian Journal of Animal Science, 7(1), 113-18.

Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Kılıç S, 2010. Seroprevalence of toxoplasmosis in horses in Niğde Province of Turkey. Trop Anim Health Prod, 42(3), 385-89.

Karatepe M, Kiliç S, Karatepe B, Babür C, 2011. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic (*Columba livia domestica*) and wild (*Columba livia livia*) pigeons in Nigde region, Turkey. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 35(1), 23-26.

Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER, 1983. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. J Immunol, 130, 2407-12.

Kaye A, 2011. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. Journal of Pediatric Health Care, 25(6), 355-64.

Kessler H, Herm-Götz A, Hegge S, Rauch M, Soldati-Favre D, Frischknecht F, Meissner M, 2008. Microneme protein 8– a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. Journal of Cell Science, 121(7), 947-56.

Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD, 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. Int J Parasitol, 41(6), 645-55.

Khanaliha K, Motazedian MH, Kazemi B, Shahriari B, Bandehpour M, Sharifniya Z, 2014. Evaluation of recombinant SAG1, SAG2, and SAG3 antigens for serodiagnosis of toxoplasmosis. Korean J Parasitol, 52(2), 137-42.

Kılıç S, Babur C, Ozkan AT, Mamak N, 2008. Investigation of Anti-*Toxoplasma gondii* and Anti-*Leishmania infantum* Antibodies among Sivas Kangal Dogs. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 32(4), 299-304.

Kimbita EN, Xuan X, Huang X, Miyazawa T, Fukumoto S, Mishima M, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, 2001. Serodiagnosis of

*Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. *Vet Parasitol*, 102(1-2), 35-44.

Kotresha D, Rahmah N, 2010. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*, 118, 529-42.

Langoni H, Matteucci G, Medici B, Camossi LG, Richini-Pereira VB, Silva RC, 2012. Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* from dogs with neurological disorders. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 365-8.

Lau YL, Fong MY, 2008. *Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Exp Parasitol*, 119(3), 373-8.

Lebrun M, Carruthers VB, Cesbron-Delauw MF, 2007. *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan-perspectives and methods*. Eds: Weiss LM, Kim K, 1st ed. United Kingdom: Academic Press, p. 265-316.

Lecordier L, Mercier C, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF, 1999. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1277-87.

Lekutis C, Ferguson DJ, Boothroyd JC, 2000. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*, 96(2), 89-96.

Lekutis C, Ferguson DJP, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC, 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol*, 31, 1285-92.

Li S, Maine G, Suzuki Y, Araujo FG, Galvan G, Remington JS, Parmley S. 2000. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 179-84.

Li YN, Nie X, Peng QY, Mu XQ, Zhang M, Tian MY, Min SJ, 2015. Seroprevalence and genotype of *Toxoplasma gondii* in pigs, dogs and cats from Guizhou province, Southwest China. *Parasites and Vectors*, 8(1), 214.

Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL, 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol*, 73 (1-2), 27-33.

Lindsay DS, Dubey JP, 2007. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan-perspectives and methods*. Eds: Weiss LM, Kim K, 1st ed. United Kingdom: Academic Press, p. 133-52.

Liu KY, Zhang DB, Wei QK, Li J, Li GP, Yu JZ, 2006. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. *World Journal of Gastroenterology*, 12(15), 2363-68.

Liu QX, Wang S, Wang LQ, Xing J, Gao WJ, Liu GF, Zhao B, Zhang HB, Gao LH, 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dogs and cats in Zhenjiang City, Eastern China. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 725-8.

Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ, 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites and Vectors*, 8(1), 292.

Liu Q, Li FC, Zhou CX, Zhu XQ, 2017. Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. *Exp Parasitol*, 176, 89-98.

Lopes AP, Cardoso L, Rodrigues M, 2008. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Vet Parasitol*, 155(3-4), 184-9.

Luptakova L, Benova K, Rencko A, Petrovova E, 2015. DNA detection of *Toxoplasma gondii* in sheep milk and blood samples in relation to phase of infection. *Vet Parasitol*, 208(3-4), 250-3.

Mercier C, Cesbron-Delauw MF, 2015. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more. *Trends in Parasitology*, 31(2), 60-71.

Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH. 1993. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *The Journal of Immunology*, 150(9), 3951-64.

Mineo JR, Kasper LH, 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P-30). *Exp Parasitol*, 79 (1), 11-20.

Morales JA, Dubey JP, Rodriguez F, Esquivel RL, Fritz D, 1995. Neosporosis and toxoplasmosis-associated paralysis in dogs in Costa Rica. *Applied Parasitology*, 36(3), 179-84.

Nam HW, 2009. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol*, 47, 29-37.

Oi M, Yoshikawa S, Maruyama S, Nogami S, 2015. Comparison of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in shelter cats and dogs during 1999–2001 and 2009–2011 in Tokyo, Japan. *PloS one*, 10(8), e0135956.

Oliveira TS, Turchetti AP, Barbosa FB, Bicalho AL, Alencar CA, Paixão TA, Santos RL, 2014. Cutaneous toxoplasmosis in an immunosuppressed dog. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(3), 797-800.

Opsteegh M, Haveman R, Swart AN, Mensink-Beerepoot ME, Hofhuis A, Langelaar MF, Van der Giessen JW, 2012. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. *Prev Vet Med*, 104(3-4), 317-26.

Öncel T, Vural G, Babür C, Kılıç S, 2005. Detection of *Toxoplasma gondii* seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman dye test and latex agglutination test. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(1), 10-12.

Öncel T, Handemir E, Kamburgil K, Yurtalan S, 2007. Determination of seropositivity for *Toxoplasma gondii* in Stray dogs in Istanbul, Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire*, 158(5), 223-8.

Özcel MA, Sermet İ, 1983. Toxoplasmosis'in laboratuvar tanısı. "Toksopazmozis", Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 3. III. Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, Sayfa: 95-121.

Özkan AT, Çelebi B, Babür C, Lucio-Forster A, Bowman DD, Lindsay DS, 2008. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats of the Ankara region of Turkey using the Sabin-Feldman dye test and an indirect fluorescent antibody test. J Parasitol, 94(4), 817-20.

Parmley SF, Sgarlato GD, Mark JA, Prince JB, Remington JS, 1992. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol, 30(5), 1127-33.

Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM, 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res Vet Sci. 81(1), 58-67.

Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C, 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol, 38(5), 561-9.

Pimenta AL, Piza ET, Cardoso Jr RB, Dubey JP, 1993. Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. Vet Parasitol, 45(3-4), 323-6.

Raimundo JM, Guimarães A, Moraes LM, Santos LA, Nepomuceno LL, Barbosa SM, Pires MS, Santos HA, Massard CL, Machado RZ, Baldani CD, 2015. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Tocantins: serology and associated factors. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 24(4), 475-81.

Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Darde ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-Yen DO, Janitschke K, Jennum PA, Naser K, Olszewski M, Thulliez P, Seitz HM, 1999. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. Bull World Health Organ, 77(11), 929-35.

Rengifo-Herrera C, Pile E, García A, Pérez A, Pérez D, Nguyen FK, de la Guardia V, Mcleod R, Caballero Z, 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets from metropolitan regions of Panama. *Parasite*, 24, 9.

Robert-Gangneux F, Dardé ML, 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*, 25(2), 264-96.

Sabin AB, Feldman HA, 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-3.

Schaap D, Vermeulen AN, Roberts CW, Alexander J, 2007. Vaccination against toxoplasmosis: current status and future prospects. In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan-perspectives and methods*. Eds: Weiss LM, Kim K, 1st ed. United Kingdom: Academic Press, p. 721-60.

Sevinç F, Dik B, Babur C, Kamburgil K, Uslu U, 2000. Konya sokak köpeklerinde *Toxoplasma gondii*'nin Sabin Feldman Boya testi, Indirekt Floresan Antikor testi ve Modifiye Aglutinasyon testi ile seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 24(1), 61-4.

Shad-Del F, Sarvestani RG, Milani MS, 1993. Sero-prevalence of *Toxoplasma* infection in human and dog population in Shiraz, Iran. *Journal of Applied Animal Research*. 3(2), 83-9.

Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM, 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2749-61.

Silva NM, Lourenco EV, Silva DA, Mineo JR, 2002. Optimisation of cut-off titres in *Toxoplasma gondii* specific ELISA and IFAT in dog sera using immunoreactivity to SAG-1 antigen as a molecular marker of infection. *Vet J*, 163 (1), 94-8.

Singh H, Tewari AK, Mishra AK, Maharana B, Sudan V, Raina OK, Rao JR, 2015. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domesticated ruminants by

recombinant truncated SAG2 enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod*, 47(1), 171-8.

Sonar SS, Brahmhatt MN, 2010. Toxoplasmosis: an important protozoan zoonosis. *Veterinary World*, 3(9), 436-9.

Spano F, Ricci I, Di Cristina M, Possenti A, Tinti M, Dendouga N, Tomavo S, Crisanti A, 2002. The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. *Int J Parasitol*, 32(2), 121-31.

Speer CA, Dubey JP, 2005. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradizoites. *Int J Parasitol*, 35(2), 193-206.

Sudan V, Tewari AK, Singh H, 2015. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in bovines from Kerala, India using a recombinant surface antigen 1 ELISA. *Biologicals*, 43(4), 250-5.

Sullivan Jr WJ, Jeffers V, 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*, 36(3), 717-33.

Switzer AD, McMillan-Cole AC, Kasten RW, Stuckey MJ, Kass PH, Chomel BB, 2013. Bartonella and *Toxoplasma* infections in stray cats from Iraq. *Am J Trop Med Hyg*, 89(6), 1219-24.

Şahal M, Gazyagci S, Kilic S, Babur C, Ural K, 2009. Investigation of *Toxoplasma gondii* in stray dogs of Ankara province. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 4(3), 185-9.

Şimşek S, Utuk AE, Babur C, Köroğlu E, 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in the province of Kocaeli. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(3), 171-4.

Taques II, Barbosa TR, de Cássia Martini A, Pitchenin LC, Braga ÍA, de Melo AL, Nakazato L, Dutra V, de Aguiar DM, 2016. Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 49, 47-50.



Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM, 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, 30, 1217-58.

Tinti M, Possenti A, Cherchi S, Barca S, Spano F, 2003. Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 33(14), 1605-16.

Udonsom R, Lekkla A, Chung PT, Cam PD, Sukthana Y, 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibody in Vietnamese villagers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39(1), 14-8.

Udonsom R, Buddhirongawatr R, Sukthana Y, 2010. Is Sabin-Feldman dye test using *T. gondii* tachyzoites from animal inoculation still the best method for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies? *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 41(5), 1059-64.

Velge-Roussel F, Chardes T, Mevelec P, Brillard M, Hoebeke J, Bout D, 1994. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66, 31-8.

Verma SK, Calero-Bernal R, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OC, Dudley M, Jiang T, Su C, Hill D, Dubey JP, 2016. Toxoplasmosis in geese and detection of two new atypical *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected Canada geese (*Branta canadensis*). *Parasitol Res*, 115 (5), 1767-72.

Veronesi F, Santoro A, Milardi GL, Diaferia M, Morganti G, Ranucci D, Gabrielli S, 2017. Detection of *Toxoplasma gondii* in faeces of privately owned cats using two PCR assays targeting the B1 gene and the 529-bp repetitive element. *Parasitol Res*, 116(3), 1063-69.

Vilares A, Gargaté MJ, Ferreira I, Martins S, Júlio C, Waap H, Ângelo H, Gomes JP, 2014. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from pigeons and stray cats in Lisbon, Portugal. *Vet Parasitol*, 205(3-4), 506-11.

Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW. 1997. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding

the micronemal protein MIC21. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 84(2), 203-14.

Wang Y, Wang G, Zhang D, Yin H, Wang M, 2013. Screening and identification of novel B cell epitopes of *Toxoplasma gondii* SAG1. *Parasites and Vectors*, 6(1), 125, 1-5.

Wang Y, Wang G, Zhang D, Yin H, Wang M, 2013. Identification of novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA1. *Exp Parasitol*, 135(3), 606-10.

Wang Y, Yin H, 2014. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites and Vectors*, 7(180), 1-9.

Wang Y, Yin H, 2015. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. *Parasites and Vectors*, 8(384), 1-12.

Wang Y, Wang G, Cai JP, 2016. Identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA6. *Korean J Parasitol*, 54(4), 431.

Wang Y, Wang G, Cai J, Yin H, 2016. Review on the identification and role of *Toxoplasma gondii* antigenic epitopes. *Parasitol Res*, 115, 459-68.

Weiss LM, Kim K. 2007. Bradyzoite development. In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan-perspectives and methods*. Eds: Weiss LM, Kim K, 2 ed. United Kingdom: Academic Press, 341-366.

Weiss LM, Dubey JP, 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*, 39(8), 895-901.

Yan C, Fu LL, Yue CL, Tang RX, Liu YS, Lv L, Shi N, Zeng P, Zhang P, Wang DH, Zhou DH, 2012. Stray dogs as indicators of *Toxoplasma gondii* distributed in the environment: the first report across an urban-rural gradient in China. *Parasites and Vectors*, 5(1), 5.

Yan H, Yan H, Tao Y, Chen H, Li G, Gong W, Jiao H, Tian F, Ji M, 2012. Application and expression of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) and rhoptry protein 2 (ROP2) from recombinant *Escherichia coli* strain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 106(6), 356-62.

Yang N, Mu M, Li H, Hu J, Gao W, Yang S, He J, 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pet dogs in Shenyang, northeastern China. *J Parasitol*, 99(1), 176-77.

Yang Y, Ying Y, Verma SK, Cassinelli AB, Kwok OC, Liang H, Pradhan AK, Zhu XQ, Su C, Dubey JP, 2015. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. *Vet Parasitol*, 211(3-4), 283-8.

Yildiz K, Duru SY, Yagci BB, Babur C, Ocal N, Gurcan S, Karaca S, 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Coexistence* with *Toxoplasma gondii* in dogs. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (2), 116-9.

Yücel SY, Yaman M, Kurt C, Babür C, Çelebi B, Kiliç S, Özen D, 2014. Seroprevalance of brucellosis, listeriosis and toxoplasmosis in cattle in Adana province of Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 38(2), 91-6.

Zarra-Nezhad F, Borujeni MP, Mosallanejad B, Hamidinejat H, 2017. A seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in referred dogs to Veterinary Hospital of Ahvaz, Iran. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5(2), 148-51.

Zhang H, Zhou DH, Chen YZ, Lin RQ, Yuan ZG, Song HQ, Li SJ, Zhu XQ, 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray and household dogs in Guangzhou, China. *J Parasitol*, 96(3), 671-2.

Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Liu M, Wang G, Moumouni PFA, Jirapattharasate C, Suzuki H, Nishikawa Y, Xuan X, 2016. Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*-specific antibodies in domestic animals in Turkey. *J Vet Med Sci*, 78(12), 1877-81.

Zhuo X, Sun H, Zhang Z, Luo J, Shan Y, Du A, 2017. Development and application of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant Mag1 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in dogs. *J Parasitol*, 103(3), 237-42.

Zhou DH, Zheng WB, Hou JL, Ma JG, Zhang XX, Zhu XQ, Cong W, 2017. Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in farmed raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Shandong province, eastern China. *Acta Tropica*, 172, 143-6.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Firas Auda Khdier ALALİ

**Doğum yeri ve Tarihi:** Kerbala, 27.10.1980

**Medeni Durumu, çocuk sayısı:** Evli ve iki çocuk babası

**Bildiği Yabancı Diller:** Türkçe ve İngilizce

<b>Eğitimi:</b>	<b>Mezuniyet</b>
İlkokul (Altaff İlkokul, Irak)	1992
Ortaokul (Fetih Ortaokul, Irak)	1995
Lise (Alhusynia Lisesi, Irak)	1999
Baghdad Üniversitesi Veteriner Fak. (lisans, Irak)	2004
Baghdad Üniversitesi Veteriner Fak.(yüksek lisans, Irak)	2008

### **Çalıştığı Kurumlar:**

- 2009 yılından bu yana Kerbala Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında çalışmaktadır.
- 13 Şubat 2014 tarihinden itibaren Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine devam ediyor.